



**UCAM**

UNIVERSIDAD CATÓLICA  
DE MURCIA

ESCUELA INTERNACIONAL DE DOCTORADO  
Programa de Doctorado Nutrición y Seguridad Alimentaria

Estudio de las propiedades analíticas de los métodos  
inmunoquímicos aplicados a la determinación de  
sulfonamidas en mieles

Autora:

Isabel Guillén Guillén

Director:

Dr. D. José Antonio Gabaldón Hernández

Murcia, 27 de julio de 2016





**UCAM**

UNIVERSIDAD CATÓLICA  
DE MURCIA

ESCUELA INTERNACIONAL DE DOCTORADO  
Programa de Doctorado Nutrición y Seguridad Alimentaria

Estudio de las propiedades analíticas de los métodos  
inmunoquímicos aplicados a la determinación de  
sulfonamidas en mieles

Autora:

Isabel Guillén Guillén

Director:

Dr. D. José Antonio Gabaldón Hernández

Murcia, 27 de julio de 2016





**UCAM**  
UNIVERSIDAD CATÓLICA  
DE MURCIA

**AUTORIZACIÓN DEL DIRECTOR DE LA TESIS  
PARA SU PRESENTACIÓN**

El Dr. D. José Antonio Gabaldón Hernández como Director de la Tesis Doctoral titulada “Estudio de las propiedades analíticas de los métodos inmunoquímicos aplicados a la determinación de sulfonamidas en mieles” realizada por D<sup>a</sup>. Isabel Guillén Guillén en el Departamento de Tecnología de la Alimentación y Nutrición, **autoriza su presentación a trámite**, dado que reúne las condiciones necesarias para su defensa.

Lo que firmo, para dar cumplimiento a los Reales Decretos 99/2011, 1393/2007, 56/2005 y 778/98, en Murcia a 26 de julio de 2016.

Dr. D. José Antonio Gabaldón Hernández



## **TESIS DOCTORAL DE**

D<sup>a</sup>. Isabel Guillén Guillén

## **DIRECTOR**

Dr. D. José Antonio Gabaldón Hernández

## **TÍTULO**

“Estudio de las propiedades analíticas de los métodos inmunoquímicos aplicados a la determinación de sulfonamidas en mieles”

## **RESUMEN**

La presencia de contaminantes en alimentos constituye un riesgo para la salud de los consumidores, pudiendo producir toxicidad aguda o crónica, efectos mutagénicos y carcinogénicos, desórdenes en el desarrollo corporal, reacciones alérgicas y fenómenos de resistencia bacteriana, entre otros. Uno de los grupos de contaminantes que más preocupa es el de las sustancias con actividad farmacológica, entre los que encontramos a los antibióticos.

En apicultura, el uso de antibióticos se ha generalizado para el tratamiento de enfermedades como la Loque Americana y Loque Europea, que afectan principalmente a la cría de la abeja, lo que provoca la aparición de residuos de estos contaminantes en la miel. La presencia de residuos de antibióticos en los productos de la colmena deriva habitualmente de una mala praxis del apicultor, siendo un problema global de solución difícil, con graves repercusiones para la salud de los seres vivos terrestres y acuáticos que generan desequilibrios en los compartimentos ambientales, lo que ha dado lugar a la aparición de trabas al comercio de miel y pérdida de confianza del consumidor.

En base a todo lo expuesto anteriormente, el principal objetivo de esta Tesis doctoral ha sido la evaluación de las propiedades analíticas de los métodos inmunoquímicos, aplicados a la determinación de sulfonamidas en mieles, con el fin de diseñar una estrategia de análisis aplicable in situ y en laboratorio, que permita procesar un elevado número de muestras de forma rápida, garantizando la seguridad de la miel que entra al mercado alimentario.

En primer lugar se desarrolló y validó un método de cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas, que permita detectar y confirmar de forma inequívoca, la presencia de nueve sulfonamidas en muestras de miel. Optimizado el protocolo de extracción se procedió a validar el método cromatográfico, determinando los parámetros que establece la Decisión de la Comisión 2002/657/EC: selectividad y especificidad, límite de decisión ( $CC\alpha$ ) y límite de detección ( $CC\beta$ ), robustez y linealidad, con la finalidad de poder ser usado como método de referencia y confirmación.

En segundo lugar, la investigación se centró en la puesta a punto de dos tipos de sistemas inmunoanalíticos. Por un lado, se han desarrollado tres ELISAs en formato placa para ensayos en laboratorio, dos específicos para sulfatiazol, y otro genérico capaz de detectar seis sulfonamidas. Por otro lado, para agilizar y reducir el tiempo de análisis, se desarrolló una herramienta analítica (inmunoensayo en flujo lateral) a utilizar como criterio de compra de miel bruta aplicable in situ, con un cut off muy inferior a los niveles recomendados para residuos de sulfonamidas en miel.

Para cada metodología de análisis se realizó un estudio minucioso de la metodología experimental, con la finalidad de optimizar las condiciones de trabajo. Se prestó especial atención al tratamiento de la muestra, ya que dada la complejidad de la matriz objeto de estudio, se requiere una hidrólisis previa para recuperar la mayor cantidad de residuos de sulfonamidas.

Los inmunoensayos desarrollados se aplicaron a la determinación de residuos de sulfonamidas en miel, obteniendo buena correlación con la metodología de referencia, apoyando así su incorporación como métodos de cribado, a los Planes de Vigilancia y Control de Residuos, reduciendo tiempo y costes de ensayo.

*“Mira a la abeja y aprende; observa su diligencia y con que seriedad realiza su trabajo. El fruto de sus esfuerzos es provechoso para la salud, tanto de reyes como de gente sencilla”*

*Libro de los Proverbios 6,8<sup>a</sup>c*



## **Agradecimientos**

Poder terminar hoy esta tesis doctoral, ha sido gracias a muchas horas de trabajo, estudio y sacrificio. Pero sin duda, este éxito no hubiera sido posible sin el apoyo y esfuerzo de la gente que me rodea. Poder estar hoy sentada escribiendo estos agradecimientos, es una tarea reconfortante a la vez que complicada.

En primer lugar, quiero agradecer a mi director de tesis, el Dr. D. José Antonio Gabaldón Hernández, el tiempo y la dedicación prestada durante estos años. Gracias por animarme a realizar esta investigación y continuar con ella, dándome todo tipo de facilidades para conseguirlo. Si tengo que quedarme con lo mejor de estos años, me quedo con tu forma de trabajar, ¡Y TRABAJAR BIEN!.

El pasar mucho tiempo en un laboratorio no es en ocasiones fácil, pero siempre hay gente que conoce el poder de una sonrisa y unos "buenos días". Gracias a mis compañeros del Centro Tecnológico Nacional de la Conserva y Alimentación, por los buenos ratos y por hacer este trabajo más fácil. José, Bárbara, Chiti, M<sup>a</sup> Elena, Miriam, Lucía, Lola†, Laura, Marian, Ángel, Paco, Lorenzo, Lolia, Gloria, Miguel, Sese... Gracias por los buenos momentos.

También quiero agradecer a la UCAM que me permitiese formar parte de esta gran familia. A mis compañeros de la Cátedra de Fisiología del Ejercicio por hacerme hueco y dejarme aprender de vosotros. También a mis compañeros de docencia, Lola, Juana, Antonio e Isabel, gracias por facilitarme el trabajo en estos meses para acabar este proyecto. No me puedo olvidar del Departamento de Nutrición, gracias por vuestro optimismo y alegría.

En este camino se han incorporado nuevos amigos, ¡como disfruto con vuestro entusiasmo! Gracias Pepe por esas excursiones mensuales, en la última me puse una meta y ya la he conseguido, que buenos consejos! Y cuando piensas que todo se vuelve gris aparece mi "Equipo", gracias Carmen, pusiste tu granito de arena en este trabajo.

Y llega la parte más complicada de escribir, es una mezcla de sentimientos difícil de expresar.

He podido llegar hasta aquí gracias a mis padres, todo lo que soy es gracias a vosotros. Gracias por mantenerme la ilusión por alcanzar esta meta. Mi padre, ejemplo de fortaleza y perseverancia en su trabajo. Mi madre, prudente, diligente en su día a día, y AMOR. Siempre he podido contar con ellos, lo dan todo por sus hijos y nietos.

Mis hermanos, Pedro y Tomás, sois mi apoyo incondicional. Mis cuñadas, sobrinos, tíos, primos, abuelo..., gracias por los ánimos dados a lo largo de estos años.

Y dejo para el final mi otro gran proyecto.

Mi marido. Gracias Fernando por estos años, el camino no ha sido fácil pero hoy conseguimos cerrar esta etapa. Gracias por tu apoyo, cariño, amistad y paciencia.

A mis hijos, Fernando, Isabel y Elena, con vosotros la vida es diferente. Sois mi motor para continuar. Gracias por vuestra comprensión, por el tiempo que os he robado, este trabajo es de todos.

Seguimos caminando juntos.

Gracias a todos y cada uno de vosotros.

*“Ama hasta que te duela; si te duele es buena señal”*

*Madre Santa Teresa de Calcuta*

## ÍNDICE GENERAL

|   |    |
|---|----|
| <b>CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN</b> .....   | 29 |
| 1. APICULTURA.....  | 31 |
| 1.1. LA APICULTURA A LO LARGO DE LA HISTORIA .....  | 31 |
| 1.2. EL MERCADO MUNDIAL DE LA MIEL .....  | 33 |
| 1.3. IMPORTANCIA DE LA APICULTURA EN LA ECONOMÍA ESPAÑOLA.....  | 34 |
| 1.4. AGENTES NOSÓGENOS DE APIS MELLÍFERA.....   | 36 |
| 1.4.1. Agentes nosógenos bióticos (de origen parasitario o infeccioso).....                             | 36 |
| 1.4.2. Agentes nosógenos abióticos: residuos de medicamentos veterinarios y plaguicidas .....           | 38 |
| 2. ANTIBIÓTICOS .....   | 39 |
| 2.1. IMPORTANCIA Y EVOLUCIÓN HISTÓRICA .....  | 39 |
| 2.2. CLASIFICACIÓN .....  | 42 |
| 2.3. SULFONAMIDAS .....   | 43 |
| 2.3.1. Evolución histórica.....   | 43 |
| 2.3.2. Características y estructura general.....  | 46 |
| 2.3.3. Mecanismos de acción .....   | 48 |
| 2.3.4. Actividad antibacteriana y aparición de resistencias .....                                       | 49 |
| 3. EMPLEO DE ANTIBIÓTICOS EN MEDICINA VETERINARIA.....  | 50 |
| 3.1. CONSECUENCIAS DE LA UTILIZACIÓN DE ANTIMICROBIANOS EN ANIMALES DESTINADOS AL CONSUMO HUMANO .....  | 52 |
| 3.1.1. Presencia de antibióticos en alimentos de origen animal .....                                    | 52 |
| 3.1.2. Relación entre el uso de antibióticos en animales y la aparición de resistencias en humanos..... | 53 |
| 3.1.3. Consecuencias directas para la salud humana.....   | 56 |
| 3.1.4. Problemas tecnológicos .....   | 56 |

|  |    |
|--|----|
| 3.1.5. Problemas en el medio ambiente.....   | 57 |
| 4. INOCUIDAD DE LA MIEL. LEGISLACIÓN APLICABLE .....   | 58 |
| 4.1. MARCO LEGAL .....   | 61 |
| 5. MÉTODOS ANALÍTICOS PARA LA DETERMINACIÓN DE RESIDUOS DE TRATAMIENTOS VETERINARIOS EN LA MIEL..... | 66 |
| 5.1. MÉTODOS DE EXTRACCIÓN.....  | 68 |
| 5.2. MÉTODOS DE CONFIRMACIÓN .....   | 73 |
| 5.2.1. Cromatografía líquida (LC).....   | 74 |
| 5.2.2. Espectrometría de masas .....   | 77 |
| 5.3. NECESIDAD DE NUEVAS METODOLOGÍAS. MÉTODOS DE CRIBADO.....                                       | 79 |
| 5.3.1. Características generales de los métodos de <i>screening</i> y clasificación.....             | 79 |
| 5.3.2. Métodos microbiológicos.....  | 81 |
| 5.3.3. Métodos cromatográficos. Cromatografía en capa fina .....                                     | 82 |
| 5.3.4. Métodos inmunoquímicos.....   | 83 |
| 6. INMUNOENSAYOS.....  | 84 |
| 6.1. COMPONENTES CLAVE DE LOS INMUNOENSAYOS .....  | 85 |
| 6.1.1. Producción de anticuerpos.....  | 87 |
| 6.2. TIPOS DE INMUNOENSAYOS.....   | 87 |
| 6.2.1. Inmunoensayos competitivos y no competitivos.....   | 90 |
| 6.2.2. Inmunoensayos homogéneos y heterogéneos .....   | 91 |
| 6.2.3. Inmunoensayos en formato ELISA .....  | 91 |
| 6.2.3.1. <i>ELISA competitivo directo (CD)</i> .....   | 92 |
| 6.2.3.2. <i>ELISA competitivo indirecto (CI)</i> .....   | 92 |
| 6.2.3.3. <i>ELISA sandwich</i> .....   | 92 |
| 6.2.4. Características de los inmunoensayos competitivos .....                                       | 92 |
| 6.2.5. Formatos inmunoquímicos aplicados al análisis de antibióticos.....                            | 95 |
| 6.2.6. Inmunoensayos en flujo lateral.....   | 96 |
| 6.2.6.1. <i>Aspectos a tener en cuenta en el desarrollo de tiras reactivas</i> .....                 | 99 |

---

|  |            |
|--|------------|
| 6.2.7. Antecedentes del empleo de inmunoensayos para la detección de sulfonamidas.....   | 104        |
| 7. VALIDACIÓN.....   | 107        |
| 7.1. EXACTITUD.....  | 111        |
| 7.1.1. Veracidad.....  | 111        |
| 7.1.2. Precisión.....  | 111        |
| 7.1.2.1. <i>Reproducibilidad interlaboratorio</i> .....  | 112        |
| 7.1.2.2. <i>Reproducibilidad intralaboratorio</i> .....  | 113        |
| 7.1.2.3. <i>Repetibilidad</i> .....  | 113        |
| 7.2. LÍMITE DE DECISIÓN.....   | 113        |
| 7.2.1. Sustancias con LMR .....  | 115        |
| 7.2.2. Sustancias sin LMR (prohibidas).....  | 115        |
| 7.3. CAPACIDAD DE DETECCIÓN .....  | 116        |
| 7.4. CURVA DE CALIBRACIÓN.....   | 116        |
| 7.5. ESPECIFICIDAD .....   | 117        |
| 7.6. ESTABILIDAD .....   | 118        |
| 7.7. ROBUSTEZ.....   | 118        |
| 8. BIBLIOGRAFÍA.....   | 119        |
| <b>CAPÍTULO II. OBJETIVOS Y PLANTEAMIENTOS GENERALES .....</b>   | <b>145</b> |
| <b>CAPÍTULO III. DESARROLLO Y VALIDACIÓN DE UN MÉTODO DE CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA, ACOPLADA A ESPECTROMETRÍA DE MASAS, PARA LA DETERMINACIÓN DE RESIDUOS DE SULFONAMIDAS EN MUESTRAS DE MIEL.....</b> | <b>151</b> |
| 3.1. OBJETIVOS.....  | 152        |
| 3.2. PARTE EXPERIMENTAL.....   | 152        |
| 3.2.1. Reactivos químicos.....   | 152        |
| 3.2.2. Instrumentación y equipamiento utilizados en la preparación de la muestra .....   | 153        |
| 3.2.3. Preparación de las disoluciones estándar .....  | 154        |
| 3.2.3.1. <i>Disoluciones de los patrones de sulfonamidas</i> .....   | 154        |

|   |     |
|---|-----|
| 3.2.3.2. <i>Disoluciones tampón</i> .....   | 154 |
| 3.2.3.3. <i>Eluyentes de cromatografía</i> .....  | 154 |
| 3.3. TRATAMIENTO DE MUESTRA. PROCEDIMIENTO DE EXTRACCIÓN DE SULFONAMIDAS EN MIEL .....  | 155 |
| 3.4. CONDICIONES CROMATOGRÁFICAS PARA EL ANÁLISIS DE SULFONAMIDAS   | 157 |
| 3.4.1. Condiciones de la cromatografía líquida de alta resolución .....   | 157 |
| 3.4.2. Condiciones del espectrómetro de masas .....   | 157 |
| 3.5. ESTUDIO DE LA VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO .....  | 158 |
| 3.5.1. Especificidad o Selectividad.....  | 159 |
| 3.5.2. Exactitud .....  | 159 |
| 3.5.3. Estabilidad y Robustez.....  | 160 |
| 3.5.4. Límite de decisión ( $CC\alpha$ ) y Capacidad de detección ( $CC\beta$ ) .....   | 161 |
| 3.5.5. Respuesta lineal .....   | 161 |
| 3.6. ESTUDIO DEL POSIBLE EFECTO DE LA MATRIZ. PROBLEMÁTICA EN LA DETERMINACIÓN DE SULFONAMIDAS EN MUESTRAS DE MIEL POR LC-MS..... | 162 |
| 3.7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....   | 164 |
| 3.7.1. Optimización del tratamiento de la muestra .....   | 164 |
| 3.7.2. Desarrollo de la metodología LC-MS .....   | 165 |
| 3.7.3. Validación del método analítico .....  | 167 |
| 3.7.3.1. <i>Especificidad del método</i> .....  | 167 |
| 3.7.3.2. <i>Exactitud y precisión</i> .....   | 168 |
| 3.7.3.3. <i>Estabilidad y Robustez</i> .....  | 170 |
| 3.7.3.4. <i>Límite de decisión y Capacidad de detección</i> .....   | 170 |
| 3.7.3.5. <i>Respuesta lineal</i> .....  | 172 |
| 3.7.4. Estudio del efecto de la matriz.....   | 173 |
| 3.7.5. Aplicación de la metodología optimizada a muestras reales .....  | 175 |
| 3.8. CONCLUSIONES .....   | 179 |
| 3.9. BIBLIOGRAFÍA.....  | 180 |

---

|   |            |
|---|------------|
| <b>CAPÍTULO IV. DESARROLLO DE MÉTODOS INMUNOQUÍMICOS PARA EL ANÁLISIS DE SULFONAMIDAS EN MUESTRAS DE MIEL</b>                       | <b>185</b> |
| 4.1. OBJETIVOS.....   | 189        |
| 4.2. PARTE EXPERIMENTAL.....  | 189        |
| 4.2.1. Reactivos químicos.....  | 189        |
| 4.2.2. Instrumentación.....   | 190        |
| 4.2.3. Preparación de las disoluciones de trabajo.....  | 190        |
| 4.2.3.1. <i>Disoluciones de los patrones de sulfonamidas</i> .....  | 190        |
| 4.2.3.2. <i>Disoluciones reguladoras</i> .....  | 190        |
| 4.2.4. Inmunorreactivos .....   | 191        |
| 4.3. DESARROLLO DE ELISAS.....  | 191        |
| 4.3.1. Soportes.....  | 191        |
| 4.3.2. Procedimiento de inmovilización .....  | 192        |
| 4.3.3. Protocolos de Inmunoensayo. Selección de variables .....   | 192        |
| 4.3.3.1. <i>Protocolo de ensayo competitivo para sulfonamidas</i> .....   | 192        |
| 4.4. OPTIMIZACIÓN DE LOS PARÁMETROS FÍSICO QUÍMICOS DEL ELISA .....   | 194        |
| 4.5. ESTIMACIÓN DE LAS CARACTERÍSTICAS DE LOS INMUNOENSAYOS .....   | 195        |
| 4.5.1. Parámetros de la curva estándar: procesamiento de la señal y curvas de inhibición.....                                       | 195        |
| 4.5.2. Especificidad. Estudios de reactividad cruzada .....   | 195        |
| 4.6. APLICACIÓN DE LOS IAs PARA EL ANÁLISIS DE SULFONAMIDAS EN MUESTRAS DE MIEL .....   | 196        |
| 4.6.1. Tratamiento de muestras de miel.....   | 197        |
| 4.6.2. Análisis de muestras de miel enriquecidas. Estudios de Recuperación.....   | 197        |
| 4.6.3. Estudio del efecto matriz.....   | 198        |
| 4.7. ANÁLISIS DE MUESTRA REALES: ESTUDIO COMPARATIVO CON CROMATOGRAFÍA LC-MS. FIABILIDAD DE LA METODOLOGÍA ANALÍTICA PROPUESTA..... | 198        |
| 4.8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....   | 198        |

|  |            |
|--|------------|
| 4.8.1. Optimización del ensayo .....   | 199        |
| 4.8.1.1. <i>Influencia de la fuerza iónica</i> .....   | 199        |
| 4.8.1.2. <i>Influencia del pH</i> .....  | 201        |
| 4.8.1.3. <i>Influencia de la concentración de Tween 20</i> .....   | 202        |
| 4.8.2. Características analíticas de los inmunoensayos propuestos .....  | 203        |
| 4.8.2.1. <i>Especificidad. Estudios de reactividad cruzada</i> .....   | 205        |
| 4.8.3. Aplicación de los inmunoensayos al análisis de sulfonamidas en<br>muestras de miel. Tratamiento de la muestra .....                   | 206        |
| 4.8.3.1. <i>Estudio del efecto de la matriz</i> .....  | 207        |
| 4.8.3.2. <i>Análisis de muestras de miel fortificadas</i> .....  | 209        |
| 4.8.4. Análisis de muestra reales: estudio comparativo con cromatografía<br>LC-MS. Fiabilidad de la metodología analítica propuesta .....    | 210        |
| 4.9. CONCLUSIONES .....  | 214        |
| 4.10. BIBLIOGRAFÍA .....   | 215        |
| <b>CAPÍTULO V. DESARROLLO DE UN INMUNOENSAYO EN FLUJO<br/>LATERAL PARA LA DETERMINACIÓN DE SULFATIAZOL EN<br/>MUESTRAS DE MIEL .....</b>     | <b>223</b> |
| 5.1. OBJETIVOS.....  | 224        |
| 5.2. PARTE EXPERIMENTAL .....  | 225        |
| 5.2.1. Reactivos químicos .....  | 225        |
| 5.2.2. Instrumentación.....  | 226        |
| 5.2.3. Inmunorreactivos.....   | 226        |
| 5.2.4. Preparación de las disoluciones de trabajo .....  | 226        |
| 5.2.4.1. <i>Preparación de los patrones de sulfonamidas</i> .....  | 226        |
| 5.2.4.2. <i>Tratamiento de la muestra</i> .....  | 227        |
| 5.2.4.3. <i>Preparación de las nanopartículas de oro coloidal: sistema de<br/>amplificación de la señal</i> .....                            | 227        |
| 5.2.4.4. <i>Funcionalización de las nanopartículas. Conjugación del<br/>anticuerpo (suero), con las nanopartículas de oro coloidal</i> ..... | 229        |
| 5.3. DESARROLLO DE LA TIRA REACTIVA.....   | 230        |

---

|   |            |
|---|------------|
| 5.3.1. Componentes para el desarrollo de un inmunoensayo en flujo lateral.....                                  | 230        |
| 5.3.2. Inmovilización de los reactivos de captura .....   | 233        |
| 5.3.3. Optimización de las concentraciones de inmunorreactivos.....   | 235        |
| 5.3.4. Fundamentos operacionales de una tira en flujo lateral.....  | 237        |
| 5.4. CARACTERÍSTICAS DEL ENSAYO Y VALIDACIÓN .....  | 238        |
| 5.5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....  | 242        |
| 5.5.1. Selección del marcador, optimización y caracterización de las nanopartículas (NPs) de oro coloidal ..... | 242        |
| 5.5.2. Selección de los materiales y optimización de la velocidad de flujo.....                                 | 247        |
| 5.5.3. Optimización de las concentraciones de inmunorreactivos.....   | 249        |
| 5.5.4. Características analíticas del inmunoensayo en flujo lateral optimizado. Validación .....                | 251        |
| 5.6. CONCLUSIONES.....  | 262        |
| 5.7. BIBLIOGRAFÍA.....  | 263        |
| <b>CAPÍTULO VI. RECOPIACIÓN DE CONCLUSIONES.....</b>  | <b>275</b> |
| <b>CONCLUSIONES .....</b>   | <b>277</b> |
| <br><b>APÉNDICE</b>   |            |
| Publicaciones derivadas .....   | 281        |



## ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

### CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN

|  |    |
|--|----|
| <b>Tabla I.1.:</b> Principales plagas y enfermedades de las abejas .....   | 37 |
| <b>Tabla I.2.:</b> Clasificación general de los antibióticos.....  | 42 |
| <b>Tabla I.3.:</b> Valores de pKa, estructura y pesos moleculares de las sulfonamidas objeto de estudio.....                 | 47 |
| <b>Tabla I.4.:</b> Organizaciones internacionales relacionadas con la seguridad alimentaria.....                             | 62 |
| <b>Tabla I.5.:</b> Sustancias farmacológicamente activas prohibidas .....  | 64 |
| <b>Tabla I.6.:</b> Soportes disponibles para la extracción en fase sólida. ....  | 72 |
| <b>Figura I.1.:</b> Producción mundial de miel.....  | 33 |
| <b>Figura I.2.:</b> Distribución del censo apícola español .....   | 35 |
| <b>Figura I.3.:</b> Cronología de aparición de los antibióticos. ....  | 41 |
| <b>Figura I.4.:</b> Sitios de acción de los antimicrobianos pertenecientes a diferentes familias de antibióticos.....        | 41 |
| <b>Figura I.5.:</b> Transformación metabólica del Prontosil en sulfanilamida, su metabolito activo.....                      | 44 |
| <b>Figura I.6.:</b> Estructura general de las sulfonamidas.....  | 47 |
| <b>Figura I.7.:</b> Mecanismo de acción de las sulfonamidas.....   | 49 |
| <b>Figura I.8.:</b> Desarrollo de técnicas analíticas para la identificación de residuos ...                                 | 67 |
| <b>Figura I.9.:</b> Representación esquemática del proceso de extracción SPE.....  | 70 |
| <b>Figura I.10.:</b> Distribución de las técnicas analíticas usadas para la determinación de antibióticos en alimentos ..... | 78 |
| <b>Figura I.11.:</b> Cromatografía en capa fina.....   | 83 |
| <b>Figura I.12.:</b> Estructura básica de las inmunoglobulinas G (IgGs) .....  | 86 |
| <b>Figura I.13.:</b> Curva sigmoide típica dosis-respuesta .....   | 93 |

|  |     |
|--|-----|
| <b>Figura I.14.:</b> Estructura básica y modo operativo de una tira reactiva en flujo lateral. ....  | 98  |
| <b>Figura I.15.:</b> Interpretación de resultados en un inmunoensayo en flujo lateral...   | 99  |
| <b>Figura I.16.:</b> Lector colorimétrico de tiras reactivas. ....   | 102 |
| <b>Figura I.17.:</b> Izquierda: partícula coloidal de oro unida a anticuerpos. Derecha: Diferencia de tamaño entre una partícula de oro y un anticuerpo (IgG)..... | 103 |
| <b>Figura I.18.:</b> Establecimiento de $CC\alpha$ y $CC\beta$ para sustancias permitidas con LMR establecido y para sustancias prohibidas. ....                   | 114 |
| <b>Figura I.19.:</b> Relación entre los límites establecidos (LMR y MRPL) y los parámetros límite de decisión $CC\alpha$ y capacidad de detección $CC\beta$ . .... | 117 |

### CAPÍTULO III. DESARROLLO Y VALIDACIÓN DE UN MÉTODO DE CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA ACOPLADA A ESPECTROMETRÍA SIMPLE DE MASAS PARA LA DETERMINACIÓN DE RESIDUOS DE SULFONAMIDAS EN MUESTRAS DE MIEL

|   |     |
|---|-----|
| <b>Tabla III.1.:</b> Gradiente utilizado en el método de determinación de sulfonamidas en miel .....  | 157 |
| <b>Tabla III.2.:</b> Valores de los parámetros seleccionados en el espectrómetro de masas .....   | 158 |
| <b>Tabla III.3.:</b> Resultados obtenidos en el estudio de exactitud y precisión. ....  | 169 |
| <b>Tabla III.4.:</b> Resultados de $CC\alpha$ y $CC\beta$ . ....  | 171 |
| <b>Tabla III.5.:</b> Estudio de la respuesta lineal del método analítico.....   | 173 |
| <b>Figura III.1.:</b> Propiedades anfóteras de las sulfonamidas. ....   | 164 |
| <b>Figura III.2.:</b> Patrón de fragmentación tentativo de las sulfonamidas ensayadas, en base al espectro de iones obtenido. ....                | 167 |
| <b>Figura III.3.:</b> Cromatograma correspondiente a una muestra de miel enriquecida con las nueve sulfonamidas a $100 \text{ mg kg}^{-1}$ . .... | 168 |
| <b>Figura III.4.:</b> Rectas de calibrado obtenidas en matriz y en fase móvil . . ....  | 174 |

**CAPÍTULO IV. DESARROLLO DE MÉTODOS INMUNOQUÍMICOS PARA EL ANÁLISIS DE SULFONAMIDAS EN MUESTRAS DE MIEL**

|   |     |
|---|-----|
| <b>Tabla IV.1.:</b> <i>Inmunoensayos en diferentes formatos, descritos en la bibliografía para la determinación de sulfonamidas en muestras de miel</i> .....                     | 188 |
| <b>Tabla IV.2.:</b> <i>Valores paramétricos de las curva de calibrado de los ELISAs optimizados para STZ (A y B) y genérico (C) para varias sulfonamidas.</i> .....               | 204 |
| <b>Tabla IV.3.:</b> <i>Valores de reactividad cruzada para compuestos relacionados con el STZ en formato directo e indirecto</i> .....  | 206 |
| <b>Tabla IV.4.:</b> <i>Estudio de recuperación de STZ en muestras de miel</i> .....   | 209 |
| <b>Tabla IV.5.:</b> <i>Determinación de STZ en muestras de miel reforzadas. Comparación de los resultados obtenidos mediante ELISA y Cromatografía</i> .....                      | 211 |
| <b>Tabla IV.6.:</b> <i>Parámetros de la recta de regresión de Deming obtenidos al comparar los valores de STZ detectados por ELISA y LC-MS en muestras de miel</i> .....          | 212 |
| <b>Figura IV.1.:</b> <i>Influencia de la fuerza iónica del tampón (PBS) sobre las características analíticas del ensayo</i> .....   | 200 |
| <b>Figura IV.2.:</b> <i>Influencia del pH del tampón PBS sobre las características analíticas del ensayo</i> .....  | 201 |
| <b>Figura IV.3.:</b> <i>Influencia del % Tween 20 (v/v) sobre las características analíticas del ensayo</i> .....   | 203 |
| <b>Figura IV.4.:</b> <i>Curva de calibrado media (n=50) para STZ en formato directo y formato indirecto</i> .....   | 204 |
| <b>Figura IV.5.:</b> <i>Influencia del efecto matriz la miel sobre los inmunoensayos desarrollados</i> .....  | 208 |
| <b>Figura IV.6.:</b> <i>Análisis de regresión Deming entre los resultados obtenidos por ELISA BSA-S /OVA-S2 y por LC-MS para las muestras de miel fortificadas con STZ.</i> ..... | 212 |

## CAPÍTULO V. DESARROLLO DE UN INMUNOENSAYO EN FLUJO LATERAL PARA LA DETERMINACIÓN DE SULFATIAZOL EN MUESTRAS DE MIEL

|  |     |
|--|-----|
| <b>Tabla V.1.:</b> <i>Inmunoensayos en flujo lateral (LFIA) descritos en la bibliografía para la determinación de sulfonamidas en alimentos y fluidos biológicos</i> .....   | 224 |
| <b>Tabla V.2.:</b> <i>Concentraciones ensayadas de inmunorreactivos</i> .....  | 235 |
| <b>Tabla V.3.:</b> <i>Cantidades de peso de muestra ensayadas</i> .....  | 235 |
| <b>Tabla V.4.:</b> <i>Volumen de muestra ensayado</i> .....  | 236 |
| <b>Tabla V.5.:</b> <i>Esquema de trabajo para la optimización</i> .....  | 236 |
| <b>Tabla V.6.:</b> <i>Tabla de doble entrada</i> .....   | 239 |
| <b>Tabla V.7.:</b> <i>Variación del diámetro de las NPs en función del volumen de citrato sódico adicionado</i> .....  | 243 |
| <b>Tabla V.8.:</b> <i>Concentración óptima de inmunorreactivos en LFIA que condujo al ensayo más sensible para STZ en tampón de ensayo</i> .....                             | 250 |
| <b>Tabla V.9.:</b> <i>Resultados obtenidos aplicando la metodología desarrollada (LFIA) y la de referencia (HPLC-MS), en las muestras de miel enriquecidas con STZ</i> ..... | 254 |
| <b>Tabla V.10.:</b> <i>Datos estadísticos de los resultados de la Tabla V.9.</i> .....   | 255 |
| <b>Tabla V.11.:</b> <i>Tabla de doble entrada para VLD 10 ng/g.</i> .....  | 256 |
| <b>Tabla V.12.:</b> <i>Tabla de doble entrada para VLD 15 ng/g.</i> .....  | 257 |
| <b>Tabla V.13.:</b> <i>Grado de reconocimiento del LFIA desarrollado frente a diferentes sulfonamidas.</i> .....   | 258 |
| <b>Figura V.1.:</b> <i>Esquema general de los principales componentes de un inmunoensayo en flujo lateral.</i> .....   | 231 |
| <b>Figura V.2.:</b> <i>Diseño de la carcasa de plástico</i> .....  | 232 |
| <b>Figura V.3.:</b> <i>Equipo de impresión Isoflow dispenser</i> .....   | 233 |
| <b>Figura V.4.:</b> <i>Esquema general de trabajo para el desarrollo de tiras reactivas</i> ....   | 234 |
| <b>Figura V.5.:</b> <i>LFA competitivo para la detección de STZ usando NPs de Oro como marcador</i> .....  | 237 |
| <b>Figura V.6.:</b> <i>Esquema de trabajo para estudiar la fiabilidad de la nueva metodología desarrollada</i> .....   | 241 |

**Figura V.7.:** *Dimensiones óptimas para el laminado y solapamiento de las almohadillas* ..... 249

**Figura V.8.:** *Fotografía representativa de los resultados obtenidos al aplicar el sistema LFIA a extractos de miel.* ..... 252



## ABREVIATURAS

|                  |   |
|------------------|---|
| Ab               | Anticuerpo  |
| Ag               | Antígeno  |
| Ag*              | Antígeno marcado  |
| AI               | Anticuerpo inmovilizado   |
| B                | Señal debida a los estándares   |
| $B_0$            | Absorbancia máxima  |
| CB               | Tampón carbonato-bicarbonato sódico 50 mM, pH 9,6                             |
| CC $\alpha$      | Límite de decisión  |
| CC $\beta$       | Capacidad de detección  |
| CE               | Electroforesis capilar  |
| EFSA             | Autoridad Europea de seguridad alimentaria                                    |
| ELISA            | Enzyme-Linked immunorbent assay / inmunoensayo enzimático en fase heterogénea |
| EM               | Efecto matriz   |
| EMEA             | Comité de Medicamentos Veterinarios de la Agencia Europea del Medicamento     |
| ESI              | Ionización por electrospray   |
| FAO              | Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación     |
| FECFA            | Comité Mixto FAO/OMS de expertos en aditivos Alimentarios                     |
| FN               | Falsos negativos  |
| FP               | Falsos positivos  |
| GAR              | Anticuerpos de cabra anti-conejo  |
| GAR-HRP          | Inmunoglobulina G de cabra anti-conejo marcada con HRP                        |
| HPLC             | Cromatografía Líquida de Alta Eficacia  |
| HRP              | Enzima peroxidasa de rábano picante   |
| IAs              | Técnicas inmunoquímicas   |
| IC <sub>50</sub> | Concentración de analito que reduce el 50% de los sitios                      |

---

|            |  |
|------------|--|
|            | específicos de unión del anticuerpo  |
| IPs        | Puntos de identificación   |
| LC         | Cromatografía líquida  |
| LD         | Límite de detección  |
| LFIA       | Inmunoensayos en flujo lateral   |
| m/z        | Relación masa /carga   |
| mAbs       | Anticuerpos monoclonales   |
| MAGRAMA    | Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente                                       |
| MPC        | Concentración mínima de anticuerpo   |
| MS         | Espectrometría de Masas  |
| NPs        | Nanopartículas   |
| OMS        | Organización Mundial de la Salud   |
| OPD        | o-fenilendiamina   |
| OVA        | Ovoalbúmina  |
| pAbs       | Anticuerpos policlonales   |
| PBS        | Tampón fosfato salino (10 mM fosfato, 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, pH 7,4)                         |
| PBS-T      | PBS conteniendo 0,05% de Tween 20  |
| PSTZ       | N-ftalilsulfatiazol  |
| R.A.S.F.F. | Sistema de Alerta Rápida para Alimentos y Piensos de la Dirección General de Sanidad y Consumo |
| rAb        | Anticuerpos recombinantes  |
| RC         | Reactividad cruzada  |
| RD         | Intervalo de trabajo   |
| RIA        | Radioinmunoensayo  |
| RPA        | Valores de referencia a efectos de intervención  |
| RSD        | Desviación estándar relativa   |
| SAM        | Sulfacetamida  |
| SCP        | Sulfacloropiridazina   |
| SDG        | Sulfaguanidina   |
| SDM        | Sulfadimetoxina  |

---

|          |                                   |
|----------|-----------------------------------|
| SDX      | Sulfadoxina                       |
| SDZ      | Sulfadiazina                      |
| SMDZ     | Sulfametoxidiazina                |
| SMM      | Sulfamonometoxina                 |
| SMP      | Sulfametoxipiridazina             |
| SMT      | Sulfametizol                      |
| SMTZ     | Sulfametazina                     |
| SMX      | Sulfametoxazol                    |
| SMZ      | Sulfamerazina                     |
| SNL      | Sulfanilamida                     |
| SPD      | Sulfapiridina                     |
| SPE      | Extracción en fase sólida         |
| SPY      | Sulfapiridina                     |
| SQX      | Sulfaquinoxalina                  |
| SRM      | Reacción de monitorización        |
| SSX      | Sulfasalazina                     |
| STZ      | Sulfatiazol                       |
| SXZ      | Sulfisoxazol                      |
| TN       | Verdadero negativo                |
| TP       | Verdadero positivo                |
| Tween 20 | Polioxietilensorbitan monolaurato |
| UE       | Unión Europea                     |
| VLD      | Límite de detección visual        |



**CAPÍTULO I**  
**INTRODUCCIÓN**



## 1. APICULTURA

Etimológicamente, apicultura es una palabra que proviene del latín, Apis (abeja) y Cultura (cultivo), es decir, la ciencia que se dedica al cultivo o a la cría de las abejas, ya que se trata de animales. La apicultura es definida por la Real Academia de la Lengua Española como el arte de criar abejas para aprovechar sus productos, por lo que hay que prestar unos cuidados mínimos a las abejas con el fin de satisfacer las necesidades que el hombre tiene de sus productos.

La apicultura es una actividad agropecuaria orientada a la cría de abejas, para obtener dos tipos de beneficios, los directos -derivados de los productos apícolas, miel principalmente junto a polen y ceras-, y los indirectos -debidos a la acción polinizadora en los cultivos-.

El Real Decreto 1049/2003, por el que se aprueba la Norma de calidad relativa a la miel, define a ésta como “la sustancia natural dulce producida por la abeja Apis mellifera a partir del néctar de plantas o de secreciones de partes vivas de plantas o bien, de excreciones de insectos chupadores presentes en las partes vivas de plantas que las abejas recolectan, transforman combinándolas con sustancias específicas propias, depositan, deshidratan, almacenan y dejan en colmenas para que madure” (Boletín Oficial del Estado, 2003).

### 1.1. LA APICULTURA A LO LARGO DE LA HISTORIA

Es una actividad milenaria con más de 7000 años de historia, tal y como queda reflejado en las pinturas rupestres de la Cueva de Araña en Bicorp (Valencia), en las que queda plasmado como el hombre prehistórico recolectaba miel de colmenas silvestres para utilizarla como alimento. Al principio, el hombre prehistórico obtenía la miel de colmenas silvestres, y poco a poco esta actividad fue evolucionando para convertirse en una actividad más sedentaria. Los egipcios empezaron a fabricar colmenas de arcilla y a proporcionar a las abejas un habitáculo dónde pudieran anidar y

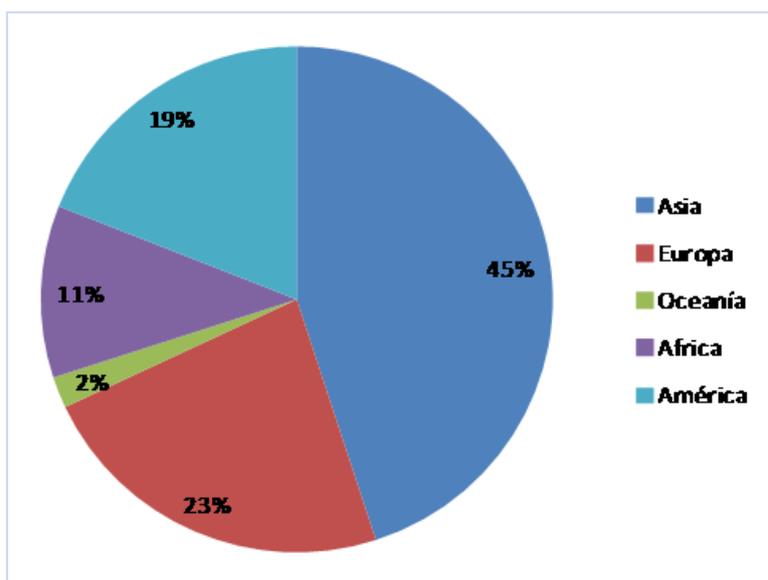
construir panales en su interior, génesis de los primeros asentamientos apícolas. Con la civilización egipcia comienza a extenderse el uso de la miel, no sólo como alimento, sino que también comienza a ser empleada en medicina por sus múltiples efectos terapéuticos (Molan, 2006; Eteraf-Oskouei y Najafi, 2013;). Poco a poco, la apicultura fue avanzando geográficamente, extendiéndose desde Egipto a Grecia, y de allí a Roma, hasta alcanzar toda la zona del Mediterráneo.

A lo largo de la historia, se han ido atribuyendo a la miel nuevas propiedades, utilizándose en la conservación de frutas, elaboración de bebidas alcohólicas, preparación de aceites aromáticos, y el tratamiento de heridas o envenenamientos, además de las aplicaciones ya conocidas en medicina (Mandal y Mandal, 2011). Sin embargo, a pesar de todos los beneficios atribuidos al uso de la miel, la apicultura sufrió un importante abandono, motivado por la irrupción en el mercado del azúcar de caña (siglo XVI), y posteriormente del azúcar de remolacha. No es hasta mediados del siglo XIX cuando se observa un nuevo resurgir de esta ciencia, impulsada por: (1) los grandes avances en técnicas apícolas, (2) la difusión de la abeja melífera por todo el mundo, y (3) los descubrimientos sobre la biología de la abeja (Benedetti y Pieralli, 1990).

Actualmente, el sector apícola es un modelo de producción sostenible, donde convergen intereses económicos (beneficios directos), y sociales (beneficios indirectos). La apicultura se ha convertido en una actividad agropecuaria de gran relevancia en los últimos años, no sólo por su repercusión económica en el sector de la producción de miel y otros productos de la colmena, sino también por contribuir al desarrollo rural de zonas donde el desempeño de otras actividades es complicado, así como por ser imprescindible para la conservación y diversidad de las plantas que dependen de la polinización, contribuyendo de esta forma al equilibrio ecológico y a la mejora y mantenimiento de la biodiversidad (Boletín Oficial del Estado, 2002; Patricio-Roberto y Campos, 2014). Así, la apicultura es un claro ejemplo de producción sostenible en la que existe una armonía entre producción y medio natural (Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino, 2010).

## 1.2. EL MERCADO MUNDIAL DE LA MIEL

En los últimos diez años, la tendencia en la producción mundial de miel se ha caracterizado por un ligero ascenso, y solamente Asia ha experimentado un crecimiento espectacular. Los últimos datos de producción de miel sitúan a China como el primer productor mundial, con 446.000 toneladas (27,3 % del total mundial), seguido de la Unión Europea (UE), con 217.000 toneladas (13,3 %). Países como Turquía, Ucrania y los Estados Unidos, muestran una tendencia ascendente en la producción de miel, mientras que Argentina registra un descenso en su producción, originando que las cifras totales de producción de Sudamérica hayan disminuido. Desde hace cuatro años, China se ha convertido en el principal exportador mundial, siendo la UE y los EEUU, los dos principales importadores de miel (**Figura I.1**).



**Figura I.1:** Producción mundial de miel (Fuente: Coordinadora de organizaciones de agricultores y ganaderos, 2013).

Los tres principales productores apícolas de la UE, según un ranking que elabora la Comisión Europea, son: España (34.000 toneladas), Alemania (25.831 toneladas) y Rumanía (24.127 toneladas), seguidos de Hungría,

Francia, Grecia y Polonia. La producción de la UE cubre tan sólo el 61 % de su consumo, por lo que debe importar miel para satisfacer su demanda interna. Las importaciones de miel de la UE proceden principalmente de China, Argentina, México y Ucrania. No obstante, los problemas sanitarios detectados en mieles procedentes de los principales países exportadores, han provocado cambios en los flujos comerciales, de forma que países que no tenían un carácter exportador, se están consolidando como importantes mercados de exportación. Las importaciones mundiales no han dejado de aumentar, debido al incremento del consumo de productos naturales y dietéticos, así como al aumento de la utilización industrial de la miel. En la UE, Alemania y España son los dos principales exportadores de la UE (COAG, 2013).

Cada país usa canales comerciales distintos, de forma que en aquellos países donde la actividad apícola no está muy profesionalizada, la venta de miel es directa del apicultor al consumidor, mientras que los países con un mayor grado de profesionalización, como ocurre en España, la producción se destina al sector de la transformación y el envasado (Comisión Europea, 2013).

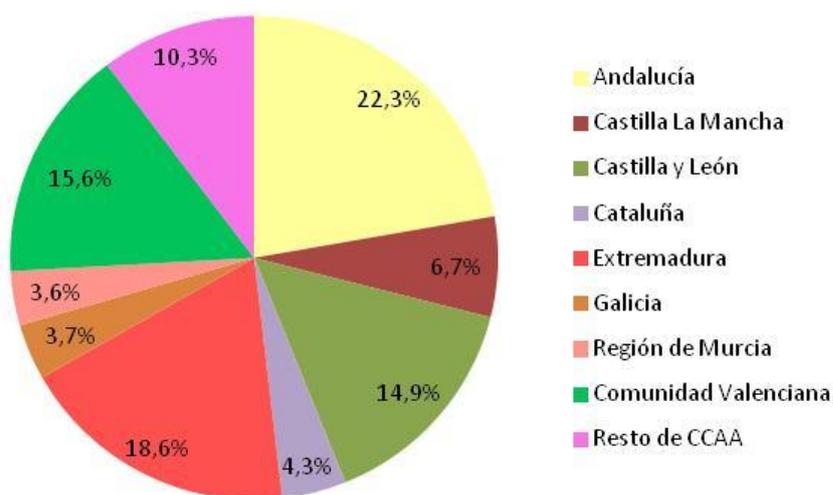
### 1.3. IMPORTANCIA DE LA APICULTURA EN LA ECONOMÍA ESPAÑOLA

Las condiciones climáticas y bondades de la geografía española, han contribuido a que la apicultura sea una de las actividades con mayor historia en el conjunto del sector agropecuario de nuestro país. De hecho, la producción y consumo de miel ocupa un lugar destacado tanto en la actividad agraria como en la cultura gastronómica española. Según los datos del “Panel de Consumo Alimentario” del Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente (MAGRAMA), el consumo medio de miel por habitante y año en los hogares españoles a lo largo del ejercicio 2013, fue de 460 gramos (ligero ascenso respecto al año anterior). Desde las agrupaciones profesionales de apicultores, se pide la realización de campañas para aumentar el consumo global de los productos procedentes de la colmena, destacando sus características organolépticas, bromatológicas y nutricionales.

El conjunto de la actividad apícola española, centrado en la producción de miel, polen y cera, representa en conjunto el 0,44 % de la producción final ganadera y el 0,17 % de la producción final agraria, con un valor estimado anual próximo a los 62 millones de euros (Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente, 2012).

De los países miembros de la UE, España es el que tiene el mayor censo apícola con 2,5 millones de colmenas, y una producción de miel de 33.000 toneladas (**Figura I.2**). Por comunidades autónomas, Andalucía, Extremadura y Valencia, se sitúan a la cabeza en el ranking de producción nacional, y entre las tres suman el 56.5 % de la producción nacional (MAGRAMA, 2013).

La miel producida mayoritariamente en el Estado español es la denominada “milflores” (46 % del total), siendo importantes las producciones de otros tipos de miel como la de azahar y de bosque.



**Figura I.2:** Distribución del censo apícola español (Fuente: MAGRAMA, 2013).

En cuanto al comercio exterior, las exportaciones totales del Estado español en 2012 aumentaron un 11 % respecto a 2006. El 75 % de la miel que entra en nuestro país corresponde a miel importada procedente de terceros

países, principalmente China, mientras que el 25 % restante procede de otros socios comunitarios que conforman el mercado único. El 83 % de la miel que sale de España tiene como destino el comercio intracomunitario, principalmente Francia, Alemania, Italia y Portugal (Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino, 2010).

#### 1.4. AGENTES NOSÓGENOS DE APIS MELLÍFERA

Las abejas son los insectos más organizados del mundo animal, son animales sociales que viven y trabajan en comunidad. Se estima que existen más de 30.000 especies de abejas, de las que sólo están reconocidas unas 17.000 especies en todo el mundo, destacando las abejas sociales *Apis* (Abejas melíferas), *Bombus* (abejorros) y *Meliponini* (abejas sin aguijón). Una abeja individual es incapaz de sobrevivir en solitario, sólo pueden existir en colonias, que a su vez se asientan formando el colmenar. Cuando los veterinarios tratan a la abeja no lo hacen individualmente, sino que los tratamientos van dirigidos a la colonia.

Al igual que el resto de animales, las abejas también son atacadas por plagas que pueden acortar su ciclo vital, de forma que los apicultores y agricultores verán disminuidas sus producciones y por tanto, sus ingresos económicos.

En general, la producción apícola puede verse afectada por la presencia indeseable de agentes nosógenos bióticos como parásitos, bacterias y virus (Ritter, 2014), y abióticos del tipo plaguicidas o residuos de tratamientos con medicamentos veterinarios.

##### 1.4.1. Agentes nosógenos bióticos (de origen parasitario o infeccioso)

Una colonia de abejas es un lugar idóneo para cualquier agente patógeno, ya que alberga en su interior una reserva importante de nutrientes, y a la vez es un hábitaculo estable desde el punto de vista ambiental. El Código Sanitario para los Animales Terrestres, redactado por la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE, 2014), tiene como finalidad establecer un conjunto de normas para la mejora mundial de la

sanidad y el bienestar de los animales terrestres, así como de la salud pública veterinaria. En el Capítulo 9 recoge los principales agentes etiológicos capaces de producir enfermedades en la Familia Apidae, centrándose principalmente en los agentes patógenos que afectan a *Apis mellifera*, que es la abeja más extendida por todos los países del mundo.

Las abejas pueden ser atacadas en su fase de cría o en su estado adulto, y el Código Terrestre se centra en estudiar seis de las principales plagas y enfermedades reconocidas de las abejas (**Tabla I.1**). Algunas de estas enfermedades, como la Loque americana y europea, o incluso la Varroosis, están ampliamente distribuidas a nivel mundial, mientras que otras como la infestación por el género *Tropilaelaps*, está muy localizada en Asia, de ahí la importancia de establecer medidas legislativas y sanitarias que controlen el tráfico y desplazamiento de abejas melíferas entre continentes. Por ello, la preservación de la salud de las abejas, no sólo tendrá repercusiones económicas relacionadas directamente con los productos derivados de la apicultura, sino que también las tiene a nivel medioambiental y agronómico.

**Tabla I.1:** Principales plagas y enfermedades de las abejas (Fuente: Código sanitario para los animales terrestres, 2015).

| Enfermedad              |            | Agente causal                                      | Zona geográfica                      |
|-------------------------|------------|--|--------------------------------------|
| <b>Loque americana</b>  | Bacteria   | <i>Paenibacillus larvae</i><br>(larvas)            | Distribución mundial                 |
| <b>Loque europea</b>    | Bacteria   | <i>Melissococcus pluton</i><br>(larvas y pupas)    | Distribución mundial                 |
| <b>Varroosis</b>        | Ácaro      | <i>Varroa Spp.</i> (larvas y pupas)                | Distribución mundial                 |
| <b>Acarapisosis</b>     | Ácaro      | <i>Acarapis woodi</i><br>(abeja adulta)            | América, Europa, y Oriente Medio     |
| <b>Tropilaelapsosis</b> | Ácaro      | <i>Tropilaelaps Spp.</i><br>(Abeja adulta y crías) | Asia                                 |
| <b>Aethinosis</b>       | Escarabajo | <i>Aethina tumida</i><br>(crías)                   | África Subsahariana, EEUU, Australia |

#### **1.4.2. Agentes nosógenos abióticos: residuos de medicamentos veterinarios y plaguicidas**

La lucha química contra las plagas y las enfermedades, principalmente mediante la aplicación de plaguicidas y tratamientos con medicamentos veterinarios, ha permitido mejorar los rendimientos de las cosechas y controlar la salud de los animales. Sin embargo, el uso de estos productos provoca efectos adversos en el medio ambiente, cosechas, animales, y finalmente, en el hombre.

Además, la movilidad de éstos a través del aire o agua y su acumulación o transformación en el medio donde se aplican, ha provocado que se alcancen niveles elevados en alimentos y en el agua, que son las principales vías de llegada al consumidor.

Los medicamentos veterinarios forman un grupo complejo de sustancias que se administran (1) con fines terapéuticos o profilácticos, (2) como favorecedores del desarrollo o (3) como aditivos al pienso para hacerlo más atractivo al paladar animal, y conseguir así un mayor rendimiento en los animales de abasto (Boletín Oficial del Estado, 2008). El uso de plaguicidas, entendidos como agentes químicos para proteger los cultivos, se ha visto generalizado por la necesidad de producir más cantidad de alimentos. Sin embargo, su empleo no está exento de riesgos, ya que pueden ser tóxicos no sólo para los organismos diana, sino también para los no-diana, llegando a ser tóxicos para los seres humanos si están expuestos a estos productos.

En el apiario se realizan en otoño y primavera dos controles sanitarios, que pueden consistir en una limpieza y desinfección de la colmena afectada cuando se tratan enfermedades como micosis y polilla, o bien, la administración de medicamentos para varroosis, loques y noseosis. Para el tratamiento de las bacteriosis de las abejas los dos antibióticos más empleados son tetraciclinas y sulfonamidas (Clément, 2012).

## 2. ANTIBIÓTICOS

### 2.1. IMPORTANCIA Y EVOLUCIÓN HISTÓRICA

Durante miles de años, al igual que el resto de enfermedades, las infecciones fueron tratadas con sustancias de origen natural que tenían atribuidas propiedades antiinfecciosas. El primer biocida conocido para el tratamiento de las infecciones de la piel data de 500 años a. C. en China, donde se utilizaba soja cuajada con moho para el tratamiento de las dermatitis; la civilización egipcia empleaba mirra junto con incienso para el tratamiento de las heridas; los médicos de la Antigua Grecia, incluyendo a Hipócrates, prescribían frecuentemente sustancias con actividad antimicrobiana como vino, mirra y sales inorgánicas (Ji, Li, y Zhang, 2009). A la vez que avanzaba el conocimiento sobre los microorganismos, también lo hacía el conocimiento empírico de la efectividad de determinadas sustancias naturales.

El descubrimiento de agentes antiinfecciosos efectivos en la década de los años 30, constituye uno de los hitos más importantes de la medicina moderna, considerándose uno de los avances más importantes. El empleo de antibióticos con fines terapéuticos, ha supuesto una disminución significativa de la morbilidad y mortalidad asociadas a enfermedades devastadoras hasta entonces (Cohen, 2000).

La utilidad de los antibióticos no se reduce sólo al campo de la práctica médica, también son utilizados en el sector ganadero (Landers, Cohen, Wittum y Larson, 2012), tanto para profilaxis (Wegener, 2003) como para el tratamiento de enfermedades (Chopra y Roberts, 2001), y en agricultura (Stockwell y Duffy, 2012).

El término antibiótico (del griego *αντι* -anti, "en contra" + *βιοτικός* -biotikos, "dado a la vida"), literalmente significa contra la vida, y originariamente se utilizó para definir a sustancias químicas producidas por varias especies de microorganismos (bacterias, hongos y actinomicetos), que suprimen o impiden el crecimiento de otras clases de microorganismos sensibles -acción bacteriostática- ó bien, originan la destrucción de los

microorganismos –acción bactericida-, ó también pueden generar ambos efectos (Florez, 1997).

Esta definición se ha ampliado, y actualmente el término antibiótico se utiliza para definir a cualquier sustancia química producida por un ser vivo o fabricada por síntesis, capaz de inhibir el desarrollo de ciertos microorganismos patógenos debido a su acción bacteriostática o bactericida.

Según esta definición, los antibióticos se clasifican en: (1) *antibióticos naturales*, que son los producidos directamente por microorganismos, como la penicilina, estreptomina, cloranfenicol, tetraciclinas y macrólidos; (2) *antibióticos semisintéticos*, que son obtenidos a partir de los antibióticos naturales, realizando en ellos pequeñas modificaciones a nivel estructural, por ejemplo la cloxacilina y nafcilina; (3) *antibióticos sintéticos*, que son fármacos de síntesis creados en el laboratorio, como las quinolonas, nitrofuranos y sulfonamidas, que también presentan actividad antibacteriana (Fernández, 2009).

La génesis de los antibióticos tiene lugar en el año 1877, cuando Pasteur y Joubert observaron que los cultivos del bacilo de ántrax contaminados con mohos no crecían, evidenciando así el potencial terapéutico de ciertas sustancias segregadas por microorganismos. Años más tarde (1928), Alexander Fleming descubrió los antibióticos  $\beta$ -lactámicos, observando el efecto bactericida de compuestos segregados por el hongo *Penicillium notatum* sobre el crecimiento del *Staphylococcus aureus*.

Con el empleo clínico de las sulfonamidas (1936), comienza la era de la quimioterapia antimicrobiana, alcanzando su mayor hito en 1941, con la producción a gran escala de la penicilina. Desde entonces, los antibióticos han sido utilizados para el tratamiento de diversas infecciones bacterianas (Mendoza, 2006), y en pocos años aparecieron nuevos antibióticos como la estreptomina, tetraciclina y las quinolona, utilizados para tratar infecciones que causaban un gran número de muertes (**Figura I.3**). La aparición de los antibióticos hizo suponer que con ellos llegaría el final de las enfermedades infecciosas.

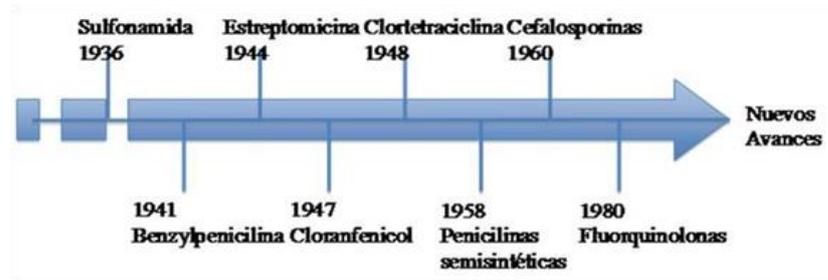


Figura I.3: Cronología de aparición de los antibióticos.

Diferentes antibióticos interfieren en procesos esenciales para el crecimiento o replicación de las bacterias, ejerciendo su efecto sobre la pared celular, la membrana plasmática, la síntesis de ácidos nucleicos o las funciones de los ribosomas (Neu, 1996), actuando de manera selectiva al interferir en las funciones vitales de las bacterias, sin afectar a las células del organismo huésped (Figura I.4).

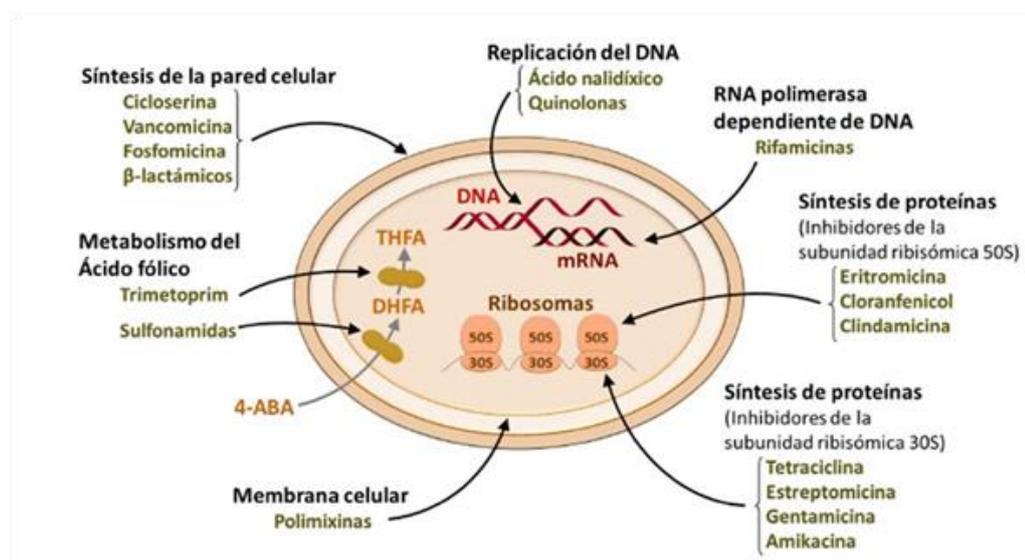


Figura I.4: Sitios de acción de los antimicrobianos pertenecientes a diferentes familias de antibióticos. 4-ABA: ácido 4-aminobenzoico; DHFA: ácido dihidrofólico; THFA: ácido tetrahidrofólico (Fuente: Neu, 1996).

## 2.2. CLASIFICACIÓN

Aunque los antibióticos están constituidos por clases muy diversas de compuestos, a menudo se clasifican en diferentes grupos. Habitualmente, se utilizan diversos criterios para clasificarlos, por tal motivo es difícil determinar cuál es la ideal.

De ellas, las más utilizadas son las que se describen a continuación: (1) en función de su estructura química, (2) espectro bacteriano, (3) por el tipo de actividad antimicrobiana (bactericida, bacteriostático), y (4) por su mecanismo de acción (**Tabla I.2**).

**Tabla I.2:** Clasificación general de los antibióticos.

|                       |   |   |
|-----------------------|---|---|
| Estructura química    | <b>Sulfonamidas, tetraciclinas, <math>\beta</math>-Láctamicos, quinolonas, aminoglucósidos, macrólidos,</b> |   |
| Espectro de acción    | Amplio espectro   | Tetraciclinas, cloranfenicol, y algunos $\beta$ -Láctamicos   |
|                       | Espectro intermedio   | Macrólidos, aminoglucósidos   |
|                       | Espectro reducido   | Glucopéptidos   |
| Efecto antimicrobiano | Bacteriostáticos  | Tetradiciinas, sulfonamidas, trimetropina, cloranfenicol, macrólidos, lincosamidas                                    |
|                       | Bactericidas  | $\beta$ -Láctamicos, aminoglucósidos, fosfomicina, nitrofurantoína, polipéptidos, quinolona, rifampicina, vancomicina |
| Mecanismo de acción   | Inhibidores de la síntesis de la pared celular  | Fosfomicina, cicloserina, bacitracina, glucopéptidos, $\beta$ -Láctamicos   |
|                       | Inhibidores de la permeabilidad de la membrana plasmática   | Polimixinas, antifúngicos   |
|                       | Inhibidores de la síntesis proteica   | Macrólidos, lincosamidas, tetraciclinas, aminoglucósidos, cloranfenicol   |
|                       | Inhibidores de la síntesis de ácidos nucleicos  | Quinolonas, rifamicinas, nitroimidazoles  |
|                       | Inhibidores de las vías metabólicas   | Sulfonamidas, trimetroprima, PAS, sulfonas  |

*Adaptado de: M. Flórez, J.A. Armijo, A. Mediavilla, Farmacología humana, Eunsa. Barcelona (España), 1989.*

## 2.3. SULFONAMIDAS

### 2.3.1. Evolución histórica

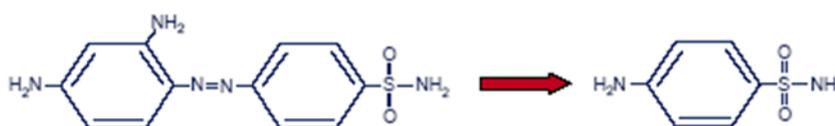
Las sulfonamidas, sulfamidas o drogas sulfas, fueron los primeros agentes quimioterápicos usados en la prevención y el tratamiento de enfermedades bacterianas, y su utilización supuso una disminución drástica de la morbilidad y mortalidad por enfermedades infecciosas. Con el desarrollo de los antibióticos, la utilidad médica de las sulfonamidas se ha visto reducida, pero todavía ocupan un lugar importante en la terapéutica antibacteriana (Fernández, 2009).

El descubrimiento de las sulfonamidas (1932) ocurrió por casualidad en una fábrica de tintes perteneciente a la empresa IG Farbenindustrie, cuando el científico alemán Gerhard Domagk observó que un azoderivado al que posteriormente se denominaría Prontosil Rubrum, usado como colorante en la tinción de lana presentaba actividad antibacteriana frente a *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus*, que evidenció *in vivo* en tejidos de los animales de experimentación (ratones y conejos), pero no *in vitro* (Domagk, 1935). Domagk albergó ciertas dudas sobre la extrapolación de estos resultados a los seres humanos, que esclareció más tarde al experimentar con su propia hija, gravemente enferma a causa de una infección estafilocócica; comprobando que tras administrarle una dosis de Prontosil ésta se recuperó completamente. Por sus investigaciones, Domagk recibió el premio Nobel de Medicina y Fisiología en 1938 (Korolkovas y Burckhalter, 1983).

Los trabajos realizados posteriormente en el Instituto Pasteur por el equipo de Ernest Fourneau y colaboradores (Tréfouëls, Nitti y Bovet), demostraron que la actividad antimicrobiana del Prontosil en animales era atribuible a un metabolito incoloro, la sulfanilamida (*p*-aminofenilsulfonamida), que posee actividad antimicrobiana tanto *in vitro* como *in vivo*, y por tanto responsable de la acción quimioterápica. La **Figura I.5** esquematiza como el metabolismo del animal rompe el Prontosil Rubrum, que por sí solo es inactivo contra las bacterias, generando un compuesto activo con efecto antibacteriano, conocido como sulfanilamida.

Durante los años previos al descubrimiento de la penicilina y a su aplicación clínica, las sulfonamidas fueron los primeros fármacos de síntesis usados en el tratamiento de enfermedades bacterianas en medicina humana y veterinaria, y continuaron administrándose en los primeros años de la Segunda Guerra Mundial. Así, las sulfonamidas jugaron un papel destacado en la prevención de infecciones durante la guerra, y el polvo de “sulfas” era parte del botiquín de primeros auxilios de los soldados estadounidenses y éstos lo esparcían sobre cualquier herida abierta.

El uso hospitalario del Prontosil se inició en 1936, obteniéndose buenos resultados sobre enfermedades de origen infeccioso (neumonía, meningitis, gonorrea, infecciones del aparato urinario, entre otras). La efectividad antimicrobiana de esta sustancia, estimuló el desarrollo de nuevos derivados a partir de la sulfanilamida, por sustitución de uno de los hidrógenos del grupo sulfonamida, y al conjunto de todos ellos se les designó con el nombre genérico de “sulfonamidas o sulfamidas”. En 1940, Woods descubre el mecanismo de acción de las sulfonamidas, y es en estos años cuando se realizan numerosos estudios en torno a estos fármacos, originando un gran desarrollo de esta familia, dando lugar a que esta época sea conocida como la “Edad de oro de la Quimioterapia de síntesis”.



**Figura I.5:** Transformación metabólica del Prontosil (izquierda), en sulfanilamida, su metabolito activo (derecha).

Aunque esta época dorada de las sulfonamidas ya ha pasado, todavía siguen empleándose debido a su amplio espectro de actividad antibacteriana en el tratamiento de infecciones, prevención de brotes de enfermedades y la mejora en la eficiencia alimentaria y promoción del crecimiento (Pérez, 2004). Por ello, a pesar del descubrimiento y uso de otros antibióticos, las sulfonamidas están entre los agentes antibacterianos más ampliamente empleados tanto en medicina humana como veterinaria,

con fines profilácticos y terapéuticos debido a su bajo coste y eficacia en el tratamiento de enfermedades bacterianas (Braga, Campestrini, Vieira y Spinelli, 2010).

En humanos, las sulfonamidas son utilizadas habitualmente en el tratamiento de infecciones del tracto urinario, bronquitis crónica y enfermedad inflamatoria intestinal. Así, la sulfadiazina se emplea en el tratamiento de la toxoplasmosis, y en la prevención de ciertos tipos de meningitis meningocócica; también la prescriben los oftalmólogos a pacientes sensibles a la penicilina (Almeida y *col.*, 2011). El sulfametoxazol ha sido aplicado para el tratamiento de infecciones bacterianas, incluyendo las del tracto respiratorio y urinario, así como en el tratamiento de malaria, infecciones oportunistas en trasplantes y por complicaciones relacionadas con el VIH (Arvand y Alirezanejad, 2011).

En medicina veterinaria, al uso de la sulfanilamida para el tratamiento de la mastitis bovina y artritis en equinos, o de la sulfaguanidina para el tratamiento de la coccidiosis aviar, le siguieron la sulfapirimidina, sulfadimidina, sulfameracina y sulfadiacina para el tratamiento de diversas infecciones bacterianas (Boggio, 2007). En la actualidad, el empleo de sulfonamidas es en piensos con fines terapéuticos y profilácticos está generalizado (Wang, Zhang, Wang, Duan y Kennedy, 2006; Cai, Zhang, Pan, Tie, y Ren, 2008; Zheng, Zhang, Peng, y Feng, 2008), debido a su bajo coste y amplio espectro de actividad, estando prohibidas para su uso como promotores del crecimiento (Mohamed y *col.*, 2007).

A pesar de ello, son utilizadas en ocasiones como aditivos en piensos debido a que una ingesta prolongada de sulfonamidas puede tener un efecto promotor del crecimiento e incrementar la producción en vacas, cerdos y aves de corral. Sin embargo, si los períodos de retirada apropiados no se cumplen correctamente, la carne o la leche de estos animales pueden estar contaminadas con residuos de sulfonamidas.

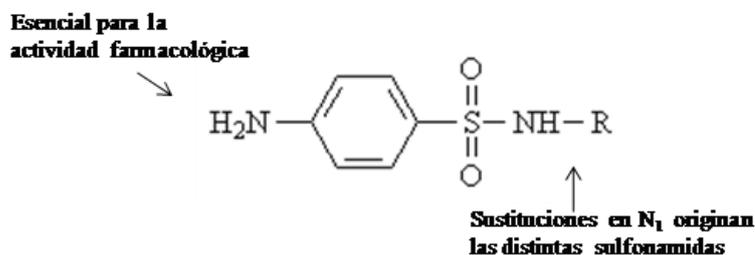
Aunque estos antibióticos son eficientes clínicamente, ocasionan problemas serios en la salud humana, como reacciones alérgicas o tóxicas y pueden causar efectos secundarios dando lugar a hepatitis, artritis y reacciones de hipersensibilidad (Won, Chandra, Hee y Shim, 2013). Así, se ha evidenciado que residuos de sulfametoxazol en alimentos de origen

animal pueden producir cáncer tiroideo y otras enfermedades. (Cai y *col.*, 2012). Además, se ha descrito que algunas sulfonamidas pueden ser potencialmente carcinogénicas (Stolker y Brinkman, 2005; Wang, 2006). Sulfadimetoxina, sulfametazina y sulfatiazol, se encuentran entre las sulfonamidas más empleadas en el tratamiento de animales. La mayoría de las sulfonamidas presentan una vida media relativamente larga, ocasionando la entrada de residuos a la cadena alimenticia (Pastor-Navarro, Maquieira y Puchades, 2009). El uso no autorizado de estos fármacos puede llevar a la presencia no deseada de los mismos en alimentos, por lo que sus residuos en leche, carne, huevo y otros alimentos como la miel, pueden poner en peligro la salud humana (Kaufmann, Roth, Ryser, Widmer y Guggisberg, 2002; Stolker y Brinkman, 2005; Zotou y Vasiliadou, 2006; Sheridan, Policastro, Thomas y Rice, 2008; Zheng y *col.*, 2008).

### 2.3.2. Características y estructura general

Aunque cada sulfonamida posee características farmacocinéticas particulares, la mayoría de ellas se presentan bajo la forma de polvos blancos o amarillentos, cristalinos, de sabor amargo, poco solubles en agua, algo más en alcohol etílico, acetona, e insolubles en cloroformo y éter sulfúrico. Son sustancias de naturaleza anfótera, el grupo amino les confiere carácter básico, mientras que el grupo sulfona les aporta características ácidas.

Las sulfonamidas son compuestos sintéticos derivados de la sulfanilamida (*p*-aminobencenosulfonamida). Su estructura química se caracteriza por un anillo benceno, un grupo sulfonamida (-SO<sub>2</sub>-NH-R) y un grupo amino (-NH<sub>2</sub>) libre (**Figura I.6**), que es fundamental para su acción farmacológica, así que las sulfonamidas que tienen sustituciones en este nitrógeno deben desdoblarse, liberándolo para poder actuar, tal y como sucede con el Prontosil y con las sulfonamidas no absorbibles (por ejemplo el Ftalilsulfatiazol). En consecuencia, la acetilación de este grupo produce la pérdida de la actividad antimicrobiana.



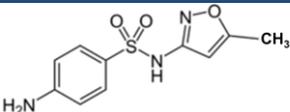
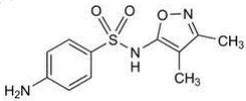
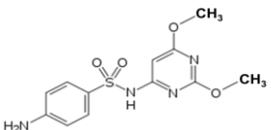
**Figura I.6:** Estructura general de las sulfonamidas.

El grupo NH-R, admite sustituciones con distintos radicales dando lugar a los distintos tipos de sulfonamidas con diferentes propiedades antibacterianas. El grupo amino sólo puede sustituirse por radicales que se transformen in vivo en un grupo amino libre. A partir de esta estructura general, la sustitución de los hidrógenos aminados por radicales, da lugar a numerosos derivados.

En la **Tabla I.3** se muestra la estructura y constantes macroscópicas de acidez de las sulfonamidas objeto de estudio en esta tesis.

**Tabla I.3:** Valores de  $pK_a$ , estructura y pesos moleculares de las sulfonamidas objeto de estudio.

| Sulfonamidas                | Estructura | Peso Molecular | $pK_a$ (25 °C)                    |
|-----------------------------|------------|----------------|-----------------------------------|
| Sulfadiazina (SDZ)          |            | 251            | $pK_{a1} = 1,6$ ; $pK_{a2} = 6,5$ |
| Sulfatiazol (STZ)           |            | 256            | $pK_{a1} = 2,4$ ; $pK_{a2} = 7,1$ |
| Sulfapiridina (SPD)         |            | 250            | $pK_{a1} = 2,9$ ; $pK_{a2} = 8,5$ |
| Sulfamerazina (SMZ)         |            | 265            | $pK_{a1} = 1,6$ ; $pK_{a2} = 7,0$ |
| Sulfametizol (SMT)          |            | 271            | $pK_{a1} = 1,9$ ; $pK_{a2} = 5,3$ |
| Sulfametoxipiridazina (SMP) |            | 281            | $pK_{a1} = 2,2$ ; $pK_{a2} = 7,2$ |

| Sulfonamidas          | Estructura  | Peso Molecular | pKa (25 °C)                                      |
|-----------------------|---|----------------|--|
| Sulfametoxazol (SMX)  |  | 254            | pKa <sub>a1</sub> = 1,6; pKa <sub>a2</sub> = 6,4 |
| Sulfasoxazol (SSX)    |  | 268            | pKa <sub>a1</sub> = 1,5; pKa <sub>a2</sub> = 5,0 |
| Sulfadimetoxina (SMD) |  | 311            | pKa <sub>a1</sub> = 2,9; pKa <sub>a2</sub> = 8,4 |

Las sulfonamidas contienen un grupo amino alcalino (-NH<sub>2</sub>) capaz de ganar un protón (pKa<sub>1</sub>) y un grupo amida ácido (-NH-R) capaz de ceder un protón (pKa<sub>2</sub>), bajo condiciones de pH específicas.

### 2.3.3. Mecanismos de acción

Las sulfonamidas son fármacos con un mecanismo de acción bacteriostático frente a la mayoría de las bacterias, es decir, detienen el crecimiento de las colonias bacterianas interfiriendo en la ruta metabólica de las mismas. Su mecanismo de acción antibacteriano se debe a que funcionan como análogos estructurales del ácido para-aminobenzoico (PABA), lo que permite a las sulfonamidas desplazar al PABA en la vía de producción del ácido fólico, comportándose como inhibidores metabólicos competitivos, al impedir la síntesis de ácido fólico (**Figura I.7**).

Así, al inhibirse la formación de ácido fólico, se altera la síntesis de ácidos nucleicos, proteínas y mecanismos de replicación microbiana, inhibiéndose así el crecimiento y reproducción del microorganismo.

Si bien las células de los mamíferos no son atacadas porque no pueden sintetizar ácido fólico, que obtienen a través de la ingesta dietética, la mayoría de células bacterianas sintetizan su propio ácido fólico ya que carecen de un sistema transportador que les permita emplearlo del medio (Souza, Braga, Vieira y Spinelli, 2008), por lo que las sulfonamidas actúan inhibiendo competitivamente la conversión del 4-ABA a 7,8-dihidropteroato, haciendo que las bacterias empleen el fármaco como

sustrato en vez del 4-ABA en la biosíntesis de ácido fólico catalizada enzimáticamente, por lo que éste no se puede formar, inhibiendo así el crecimiento normal de la bacteria.

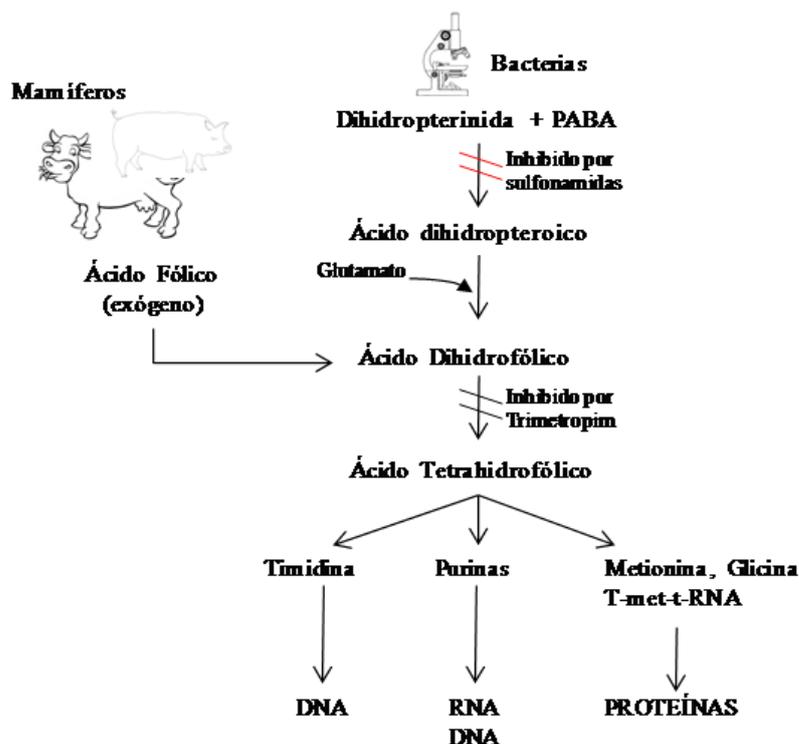


Figura I.7: Mecanismo de acción de las sulfonamidas (Fuente: Fernández, 2009).

#### 2.3.4. Actividad antibacteriana y aparición de resistencias

Las sulfonamidas son antibióticos de amplio espectro de acción, si bien son activas especialmente frente a bacterias Gram negativas, también lo son frente a Gram positivas, clamidias y algunos protozoos (Fernández, 2009).

Debido a su amplio perfil farmacocinético y espectro antibacteriano, las sulfonamidas han sido utilizadas en medicina veterinaria para el tratamiento de diversas infecciones bacterianas, que afectan tanto al aparato respiratorio, urinario, gastrointestinal y sistema nervioso central (Costa-

Batlori, 1996). Se ha evidenciado que la combinación de sulfonamidas con diaminopirimidinas (como el trimetoprim) aumenta el espectro de acción, por lo que es una práctica terapéutica habitual en clínica veterinaria (Brumfitt y Hamilton-Miller, 1993).

Como consecuencia de su prolongado uso, muchos de los organismos que eran susceptibles a sulfonamidas se están haciendo resistentes, estimándose en un 20-40 % la aparición de resistencias bacterianas a las sulfonamidas (Fernández, 2009).

En apicultura, las sulfonamidas se han utilizado habitualmente “sin medida” para controlar las infecciones bacterianas, pero con el riesgo de contaminar los productos de la colmena, especialmente la miel (Zotou y Vasiliadou, 2006). Si bien los residuos que aparecen en miel están a concentraciones muy por debajo de las permitidas para otros alimentos, no debemos despreocuparnos del tema, ya que la presencia de residuos de sulfonamidas en miel, especialmente sulfatiazol, representa un grave problema desde el punto de vista toxicológico, puesto que pueden desencadenar reacciones tóxicas o alérgicas, con la aparición de resistencias en humanos.

### **3. EMPLEO DE ANTIBIÓTICOS EN MEDICINA VETERINARIA**

Los medicamentos veterinarios son sustancias o combinaciones de las mismas, destinadas a ser utilizadas en los animales, dotadas de propiedades curativas o preventivas con respecto a las enfermedades de los mismos, o que pueden administrarse al animal con el fin de restablecer, corregir o modificar las funciones fisiológicas, ejerciendo una acción farmacológica, inmunológica o metabólica. El medicamento de uso animal ha de ser seguro, eficaz, de calidad, ha de estar correctamente identificado y debe ir acompañado por la información precisa con el fin de garantizar su utilización racional (Boletín Oficial del Estado, 2008). En general, el uso de medicamentos veterinarios en los nuevos sistemas de producción intensiva

de animales ha aumentado de forma paralela al incremento de la cabaña ganadera (Sarmah, Meyer, y Boxall, 2006; Van Boeckel y *col.*, 2015).

El empleo de agentes antibacterianos, ha aportado numerosos beneficios económicos a la agricultura y ganadería al evitar fluctuaciones, aumentando la producción y sirviendo para tratar importantes enfermedades infecciosas. Desde la introducción de los antibióticos en la práctica clínica, en la década de los años 40, éstos se han convertido en medicamentos indispensables para el tratamiento de la mayoría de los procesos infecciosos bacterianos, tanto en el hombre como en los animales. Un informe elaborado por la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico (OCDE), señala que el uso de antibióticos que se hace en España es excesivo e inadecuado, tanto en atención primaria como hospitalaria. En salud animal los datos de consumo de antibióticos del año 2011 sitúan a España como el tercer país de la UE, tan sólo por detrás de Alemania y Francia (EMA/333921, 2014).

Como se ha descrito anteriormente, en veterinaria los antibióticos se utilizan habitualmente como agentes profilácticos y terapéuticos en la cría de ganado y en piensos, con la finalidad de estimular el crecimiento. Con el fin de erradicar estas prácticas, desde el año 2006 está prohibida la aditivación de piensos con antibióticos en la UE, a excepción de algunos coccidiostáticos e histomonostáticos (Official Journal of the European Union, 2003).

La cifra global del número de medicamentos veterinarios administrados a los animales destinados a la producción se desconoce, y las que se conocen se refieren más al volumen de ventas que al consumo efectivo (Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios, 2014).

En el año 2006, la Organización Mundial de la Salud (OMS) junto con la Organización Mundial de Sanidad Animal (*World Organization for Animal Health* (OIE)), emitieron un informe para definir y designar cuales eran los antimicrobianos veterinarios de importancia crítica (con las siglas en inglés VCIA por "*Veterinary Critically Important Antimicrobials*"). El informe recoge que los VCIA son los antimicrobianos utilizados para el tratamiento, prevención y control de infecciones graves en animales que pueden tener consecuencias relevantes en la salud y el bienestar de los animales, la salud

pública o consecuencias económicas importantes, y donde las alternativas son muy pocas o inexistentes.

Estos antimicrobianos estarán disponibles en cantidades y formas farmacéuticas adecuadas, de calidad y económicamente accesibles. Se designaron como VCIA a 122 antimicrobianos de 25 familias entre los que se encuentran las tetraciclinas y sulfonamidas (OIE, 2007).

### 3.1. CONSECUENCIAS DE LA UTILIZACIÓN DE ANTIMICROBIANOS EN ANIMALES DESTINADOS AL CONSUMO HUMANO

A pesar de los efectos beneficiosos que tiene su empleo en agricultura y ganadería en la lucha contra determinadas infecciones, el abuso indiscriminado y mala praxis, unido a la elevada persistencia de muchos de ellos en el medio ambiente, ha originado la aparición de resistencias a los antimicrobianos, promoviendo así la supervivencia de bacterias resistentes, con el riesgo que supone para la humanidad regresar a la época de las grandes pandemias (Walsh, 2000).

Es posible encontrar residuos de antibióticos en aguas, suelos, carnes, pescados y miel, entre otros, como consecuencia de su utilización en actividades agrícolas y ganaderas, industriales y domésticas. Un residuo se define literalmente como “algo que está de más”, y es considerado como un desecho que hay que eliminar.

El término residuo de medicamento veterinario hace referencia a “todas las sustancias farmacológicamente activas, ya sean principios activos, excipientes o productos de degradación, y sus metabolitos, que permanezcan en los productos alimenticios obtenidos a partir de animales a los que se les hubiese administrado el medicamento veterinario de que se trate” (Diario Oficial de la Unión Europea, 2009).

#### 3.1.1. Presencia de antibióticos en alimentos de origen animal

La presencia de residuos de antibióticos en los productos alimenticios de origen animal se debe al uso generalizado en la cría de ganado. Otra razón importante es la contaminación cruzada de los piensos no medicados.

En las fábricas de piensos, tras la preparación de alimento medicado, es habitual producir piensos no medicados en la misma línea de fabricación, con el consiguiente riesgo de contaminación.

En estas contaminaciones cruzadas, aunque los antibióticos estén a concentraciones bajas, se detectan en la carne, huevos o la leche de animales que ingieren el alimento contaminado (Kennedy, Cannavan, y McCracken, 2000; McEvoy, 2002). Aunque las concentraciones sean bajas, no debemos despreocuparnos del tema, ya que la ingestión continuada de pequeñas cantidades provoca efectos acumulativos que, a la larga, provocan efectos tóxicos en el hombre.

### **3.1.2. Relación entre el uso de antibióticos en animales y la aparición de resistencias en humanos**

La introducción de los agentes antibacterianos supuso una revolución en el tratamiento de las infecciones bacterianas. Sin embargo, la creciente resistencia a los antibióticos se ha convertido en una amenaza para la salud pública en el mundo, y 80 años después de su introducción, nos enfrentamos a la posibilidad de un futuro sin antibióticos eficaces para luchar contra las bacterias que causan infecciones en el ser humano. La resistencia a los antibióticos es un problema grave y en continua evolución, que si no se evita, podría conducir a una crisis de salud global (OMS, 2015).

La resistencia a antibióticos es la capacidad de un microorganismo para resistir los efectos de un antibiótico. Cuando aparecen resistencias, la efectividad de los fármacos se ve reducida o incluso eliminada, y las bacterias sobreviven y se multiplican causando más daño, convirtiéndose así en un problema de salud pública (ECDC, 2005).

Según un informe publicado por el Centro Europeo para la Prevención y control de enfermedades (ECDC) y la Agencia Europea de Medicamentos (EMA), cada año mueren 25.000 pacientes en la UE por infecciones causadas por microorganismos resistentes a los medicamentos, lo que supone unas pérdidas productivas y unos costes sanitarios adicionales de más de 1.500 millones de euros por año (ECDC/EMA Joint Technical Report, 2009).

Aunque la resistencia a los antimicrobianos es un fenómeno biológico natural, se convierte en un problema de salud pública cuando se ve exacerbado por el abuso y mala praxis de los antibióticos en el tratamiento de las enfermedades humanas, así como por su empleo indiscriminado en la ganadería o la agricultura.

Entre los principales factores relacionados con el mal uso de los antibióticos que contribuyen al aumento de resistencias de los microorganismos podemos señalar los siguientes:

- Prescripción innecesaria (Reyes y *col.*, 1997).
- Empleo de antibióticos en los países en vías de desarrollo. Por paradójico que parezca, contribuye a la aparición y desarrollo de resistencias por varios motivos: uso de productos falsificados (Couper, 1997), mal cumplimiento de los tratamientos (Strand, 1996), malas condiciones de almacenamiento y conservación de los antibióticos que contribuyen a su degradación y pérdida de actividad terapéutica (Taylor, Shakoore, y Behrens, 1995), y la rapidez de propagación de cepas entre los países por los viajes (Galán Montemayor, Moreno Bofarull, y Baquero Mochales, 2014).
- Empleo en veterinaria. España es el cuarto país en volumen de ventas, por detrás de Chipre, Italia y Hungría. En 2012 se vendieron en España 1694 Tm, lo que muestra un ligero descenso con respecto a años anteriores. Aproximadamente el 80 % del total de las ventas corresponden a cuatro grupos de antimicrobianos: tetraciclinas, sulfonamidas y trimetoprim,  $\beta$ -lactámicos y lincosamidas (EMA/333921/, 2014).

La resistencia bacteriana es un grave problema de la sociedad, que afecta a diversos sectores como los de la medicina, veterinaria, la cría de animales, la agricultura, el medio ambiente y el comercio, por lo que las medidas establecidas para reducir el uso de antibióticos requieren de un planteamiento holístico (Comisión Europea, 2011). El uso apropiado de los

antibióticos es esencial para reducir y prevenir la resistencia bacteriana, y sobre esta premisa gira toda la política de la Unión Europea tanto en la práctica humana como en veterinaria. Desde que en noviembre del 2001, el Consejo hizo pública una Recomendación sobre la utilización prudente de los agentes antimicrobianos en la medicina humana, los distintos Estados miembros han adoptado medidas en torno a esas recomendaciones que giran alrededor de seis ejes principales: la vigilancia, el control, la prevención, la educación, la información y la investigación (COM, 2005).

Durante los últimos años, la utilización de antibióticos en producción animal, especialmente la administración de estos compuestos a bajas dosis durante períodos de tiempo relativamente largos, ha sido tema de debate para verificar si ha contribuido a la aparición de cepas bacterianas resistentes a los antibióticos (Salisbury, Nicholls, Lammerding, Turnidge y Nunn, 2002), ejerciendo una presión selectiva y promoviendo la diseminación de bacterias resistentes en el medio ambiente y en los sistemas gastrointestinales de los animales (Tollefson y Karp, 2004; Nunnery, Angulo y Tollefson, 2006), con el riesgo de poder afectar a los humanos si son patógenas o bien transferir genes de resistencia a patógenos humanos (Nunnery, Angulo y Tollefson, 2006).

Este problema ya fue debatido en 1969 en el Reino Unido por un Comité científico presidido por el profesor Swann, que estudió estos efectos tras relacionar la aparición de un brote de salmonelosis en humanos, con el tratamiento de terneras con antibióticos (Swann y *col.*, 1969). El Comité recomendó abandonar el uso en piensos de los antimicrobianos de uso terapéutico, o con análogos empleados en medicina humana, y utilizar para los animales de producción antibióticos no utilizados en medicina humana y sólo bajo prescripción veterinaria. En 1998, un Comité de la Organización Mundial de la Salud (OMS) concluyó que el uso de fluoroquinolonas en animales de producción había contribuido a la aparición de cepas de *Salmonella* y *Campylobacter* resistentes a las quinolonas, y en 2003 otro Comité formado por la *Food and Drug Administration* (FDA), la Organización Mundial de la Sanidad Animal (OIE) y la Organización Mundial de la Salud (OMS), concluyó que existía una evidencia clara de efectos adversos para la salud humana debido al incremento de microorganismos resistentes a

algunos antibióticos como consecuencia de la utilización de antimicrobianos en animales de abasto (WHO, 2003).

### **3.1.3. Consecuencias directas para la salud humana**

Los efectos adversos que pueden aparecer en el consumidor como consecuencia del empleo de antimicrobianos en animales de producción, están relacionados con la propia toxicidad del antimicrobiano.

Los efectos tóxicos son habitualmente poco probables, ya que los residuos estarán presentes en pequeñas cantidades. Sin embargo, pueden producir reacciones alérgicas en individuos que estén especialmente sensibilizados a algún tipo de antibióticos. Se han descrito una gran cantidad de casos de personas que han manifestado reacciones inmunopatológicas ocasionadas por la exposición a residuos de antibióticos en alimentos, siendo las penicilinas los antimicrobianos que más efectos alérgenos producen, tanto en medicina humana como veterinaria. El cloranfenicol se ha asociado con el desarrollo de anemias aplásicas en individuos susceptibles después del consumo de carnes obtenidas de animales tratados con este compuesto (Page, 1991). Como consecuencia, y al no poder establecer límites máximos de residuos (LMRs) seguros para este compuesto, la utilización de cloranfenicol en producción animal está prohibida (CVMP, 2002). También se han descrito casos de reacciones alérgicas atribuidas al consumo de carnes contaminadas con estreptomicina (Tinkelman y Bock, 1984) y penicilina (Kanny, Puygrenier, Beaudoin y Moneret-Vautrin, 1994; Raison-Peyron, Messaad, Bousquet y Demoly, 2001). Se sospecha que muchos casos pasan inadvertidos porque dan lugar a reacciones secundarias con sintomatología menos aguda, como son reacciones de fotosensibilización y picores, atribuibles a otras causas.

### **3.1.4. Problemas tecnológicos**

La presencia de residuos de antibióticos en alimentos, además de suponer un posible riesgo para la salud del consumidor, puede ocasionar también problemas tecnológicos como alteraciones en la textura y sabor del producto final, o la inhibición del crecimiento en los productos que

requieren especies vivas (como levaduras), para obtener alimentos como el queso o el yogurt.

Afortunadamente, se ha evidenciado que los procesos tecnológicos, sobre todo los térmicos, pueden disminuir las concentraciones residuales de estos compuestos en alimentos (Moats, 1999).

### 3.1.5. Problemas en el medio ambiente

El consumo europeo de antibióticos es similar al de los productos fitosanitarios, es decir, varios miles de toneladas anuales. El potencial contaminante de los antimicrobianos es obvio, ya que son biocidas. Además, algunos antibióticos tienen carácter lipófilo (bioacumulables) y pueden llegar a ser persistentes, lo que agrava su capacidad contaminante.

Como resultado del uso generalizado de antibióticos en ganadería y acuicultura, así como por su empleo para prevenir daños por bacterias en cultivos vegetales, una gran cantidad y variedad de antibióticos van a parar a los ecosistemas de todo el mundo, alcanzando incluso aguas subterráneas y potables (US EPA, 2012). Hay que resaltar que los efectos negativos atribuidos a éstos no solo derivan de su concentración individual, sino también, de los generados por la presencia de combinaciones de antibióticos (González-Pleiter y col., 2013).

Dadas las repercusiones que ocasiona su presencia en el medio ambiente, hay un interés creciente en conocer y combatir la presencia de los denominados productos farmacéuticos y de uso personal (PPCPs, *Pharmaceuticals and Personal Care Pollutants*, en versión anglosajona), entre los que se encuentran los antibióticos; que si bien son introducidos a concentraciones no muy altas, su vertido es regular y continuo, a diferencia de los vertidos industriales o los plaguicidas, que son puntuales aunque en grandes cantidades.

De entre todos los contaminantes PPCPs, los fármacos son los que han despertado un mayor interés debido al uso cotidiano que se hace de ellos. Su uso habitual a las dosis prescritas en humanos son prácticamente inocuas para el hombre y esto ha hecho que a nivel medioambiental sus cantidades hayan pasado desapercibidas. Sin embargo, su detección en

aguas continentales ha despertado el interés científico, y esto ha ido acompañado del desarrollo de nuevas tecnologías en los últimos años.

En la última década se han publicado un gran número de estudios de investigación sobre la presencia de fármacos en todo tipo de matrices ambientales, principalmente agua, provocando el desarrollo de cepas medioambientales resistentes a dichos compuestos que afectan peligrosamente a los ecosistemas (Heberer, 2002; Sarmah y *col.*, 2006), las repercusiones para los organismos que habitan en estos ecosistemas, (Fent, Weston y Caminada, 2006; Stancova y *col.*, 2014), y los problemas de salud pública que pueden ocasionar (Pal, He, Jekel, Reinhard y Gin, 2014). Así, la situación actual requiere el desarrollo de un sistema de farmacovigilancia, que abarque tanto la caracterización de los residuos ambientales, como los niveles de resistencia, por su incidencia a corto o medio plazo sobre la salud pública.

#### 4. INOCUIDAD DE LA MIEL. LEGISLACIÓN APLICABLE

La preocupación por la inocuidad y calidad de los alimentos se remonta a las más antiguas civilizaciones. En el código babilónico de Hammurabi ya se hacía referencia a los fraudes de los alimentos, y las primeras religiones establecieron preceptos y prohibiciones religiosas en forma de legislación alimentaria. Desde las antiguas civilizaciones de Grecia y Roma y a lo largo de la historia, se han castigado a los culpables de poner en circulación alimentos adulterados, malsanos, insalubres o corrompidos, con la finalidad de intentar preservar la calidad e inocuidad de los mismos (Mangas, 2009).

En fechas recientes, las fuertes crisis alimentarias vividas por la sociedad europea han provocado que el conjunto de los sistemas existentes de producción, industriales, comerciales y de seguridad, hayan sido puestos en duda y sometidos a presiones sin precedentes, con repercusiones en todos los operadores, sectores económicos, administrativos y políticos.

Así, se han creado un conjunto de normas coherentes y transparentes, siempre con la finalidad de conseguir el más alto nivel de protección de la salud de los consumidores, respetando además la salud y el bienestar de los animales productores de alimentos. En el Libro Blanco sobre Seguridad Alimentaria (1999), se recogen los pilares de este nuevo ordenamiento político europeo sobre alimentación, siendo el principio por excelencia de la nueva política de seguridad alimentaria europea “de la granja a la mesa”, con una política reguladora a lo largo de todas y cada una de las etapas de la cadena alimentaria (Comisión de las Comunidades Europeas, 1999).

La protección de la salud del consumidor es el centro de cualquier acción en materia de seguridad alimentaria, siendo ésta un derecho de todos los seres humanos que ha de ser garantizado por los países donde viven. La Declaración Universal de Derechos Humanos recoge el derecho a una alimentación suficiente y sana. Nuestra Constitución, reconoce también el derecho a la protección de la salud y obliga a los poderes públicos a garantizar la defensa de los consumidores y usuarios, protegiendo mediante procedimientos eficaces, la seguridad y la salud de los mismos.

Según la FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura), existe seguridad alimentaria cuando todas las personas tienen en todo momento acceso físico, social y económico a suficientes alimentos inocuos y nutritivos para satisfacer sus necesidades alimenticias y sus preferencias en cuanto a los alimentos a fin de llevar una vida activa y sana (Comisión de las Comunidades Europeas, 1999).

Esta definición implica un doble punto de vista del concepto de seguridad de los alimentos: por una parte relativo a la ingesta suficiente y por otra a la inocuidad. Está claro que según el área geográfica donde nos encontremos, preocupa más el cumplimiento de un aspecto que el otro. Así, en países desarrollados si bien el acceso a los alimentos no constituye generalmente un problema, adquiere especial relevancia todo lo relacionado con la inocuidad y salubridad de los alimentos.

La presencia de contaminantes (entre ellos medicamentos veterinarios) en los alimentos, puede tener su origen en la contaminación medioambiental, medio el cual se encuentran ampliamente distribuidos debido a su amplio uso, o ser consecuencia de “malas” prácticas agrícolas,

de producción, transformación, almacenamiento, empaquetado, transporte o actividades fraudulentas; dando lugar a una gran alarma social traducida en una pérdida de confianza del consumidor en los productos alimenticios. Para solucionarlo, la Administración Sanitaria ha aumentado la frecuencia y tipo de controles en toda la cadena alimentaria, debiendo cumplirse el principio de “trazabilidad”.

En estas últimas décadas, es el consumidor quien reclama productos seguros, de forma que decide “qué” productos y “cómo” producirlos y comercializarlos. Podríamos señalar que estamos asistiendo al cambio del concepto de “la granja a la mesa” por el de “la mesa a la granja”, dónde todo va a girar en torno a la salud del consumidor y se trabaja por y para el desarrollo de cadenas alimentarias más seguras (AESA/Genoma España, 2005)

Todavía no se conocen con exactitud los efectos que pueden producir en el hombre, exposiciones a niveles bajos de residuos de antibióticos durante periodos largos o ingestas continuas. La detección de estos residuos constituye uno de los principales objetivos de las autoridades sanitarias, por lo que se hace necesario el desarrollo de métodos analíticos sensibles que permitan detectarlos a niveles traza, y que puedan ser usados en los programas de control y vigilancia de residuos.

En esta tesis, se ha revisado la repercusión que tiene el uso de medicamentos en veterinaria, centrándonos en estudiar el uso de antibióticos en apicultura con sus consecuencias tanto a nivel de seguridad alimentaria, como social y económicas, con el objetivo de desarrollar métodos analíticos rápidos y fiables para velar por la seguridad de la miel que llega al consumidor.

La miel es un producto completamente natural y la presencia de residuos de antibióticos en la miel ha generado una creciente preocupación, además de ser una amenaza para esta imagen positiva que se tiene de ella.

#### 4.1. MARCO LEGAL

La UE dispone de una extensa serie de normas, que cubren tanto la producción primaria como la producción industrial de alimentos transformados, con el objetivo de proteger a los consumidores de prácticas comerciales fraudulentas o engañosas. El conjunto de todas las disposiciones legales, reglamentarias y administrativas, aplicables a los alimentos en general y a la seguridad de los alimentos en particular, en todo el territorio de la UE, constituyen la legislación alimentaria. Todas estas normas tienen en común un único objetivo: asegurar un nivel elevado de protección de la salud de las personas, verificando la calidad de los alimentos destinados al consumo humano y de los piensos, y permitiendo la libre circulación de alimentos seguros en el mercado interior (Diario Oficial de las Comunidades Europeas, 2002b).

Para alcanzar este objetivo es necesario un acercamiento entre las políticas de los distintos gobiernos a nivel internacional, consensuando las estrategias en los programas de vigilancia y control de residuos de antibióticos en alimentos, de forma que los sistemas de control gocen de un reconocimiento mutuo y se favorezcan los intercambios comerciales. Son muchas las organizaciones a nivel internacional que tienen líneas de trabajo centradas en establecer programas de vigilancia para luchar contra el problema de las resistencias a antimicrobianos, y velar por el cumplimiento de las normas en materia de seguridad alimentaria (**Tabla I.4**).

La complejidad de la cadena de producción de alimentos es cada vez mayor, y una política efectiva de seguridad alimentaria debe poder determinar y supervisar los riesgos para la salud de los consumidores vinculados con las materias primas, las prácticas agrícolas y las actividades de procesamiento de alimentos. Son necesarias medidas reglamentarias eficaces para gestionar estos riesgos, lo que se traduce en el establecimiento y funcionamiento de sistemas de control para supervisar y garantizar la aplicación de dichas reglamentaciones. Con la Directiva 96/23/CE, la UE armoniza las medidas relativas a los controles efectuados para buscar ciertas sustancias (sustancias con efecto anabolizante, sustancias no autorizadas, medicamentos veterinarios y contaminantes) o sus residuos, en

los animales de explotación, la carne y los productos primarios de origen animal (huevos, leche y miel) (Diario Oficial de la Comunidad Europea, 1996).

**Tabla I.4:** Organizaciones internacionales relacionadas con la seguridad alimentaria.

| <b>Organización</b>                                | <b>Página web</b>  |
|--|--|
| Organización Mundial de la Salud (OMS)             | <a href="http://www.who.int">www.who.int</a>                   |
| Comisión Europea (EC)                              | <a href="http://www.ec.europa.eu">www.ec.europa.eu</a>         |
| European Medicines Agency (EMA)                    | <a href="http://www.ema.europa.eu">www.ema.europa.eu</a>       |
| European Food Safety Authority (EFSA)              | <a href="http://www.efsa.europa.eu">www.efsa.europa.eu</a>     |
| International Federation for Animal Health (IFAH)  | <a href="http://www.ifahsec.org">www.ifahsec.org</a>           |
| Centre for Disease Control and Prevention (CDC)    | <a href="http://www.cdc.gov">www.cdc.gov</a>                   |
| Food and Drug Administration (FDA)                 | <a href="http://www.fda.gov">www.fda.gov</a>                   |
| US Environmental Protection Agency (USEPA)         | <a href="http://www.epa.gov">www.epa.gov</a>                   |
| Alliance for the Prudent Use of Antibiotics (AUPA) | <a href="http://www.tufs.edu/med/apu">www.tufs.edu/med/apu</a> |

Para contribuir a lograr un nivel elevado de protección de la salud de los consumidores, la UE crea en el año 2002 la Agencia Europea de Seguridad alimentaria (EFSA) (Diario Oficial de las Comunidades Europeas, 2002b), un organismo científico independiente, y que tiene entre sus funciones las de evaluar y comunicar los riesgos, y proporcionar asesoramiento científico en relación con la alimentación y la seguridad alimentaria. Entre sus objetivos está lograr un nivel elevado de protección de la vida y la salud de las personas, garantizando la trazabilidad de todos los productos por los responsables de producción y puesta en el mercado, para conseguir así aumentar la confianza de los consumidores (European Food Safety Authority, 2009).

Lo anterior no significa que la UE sea la única responsable de todos los aspectos de seguridad alimentaria, cada estado miembro debe aplicar la legislación de la UE de conformidad con el principio de subsidiariedad. La responsabilidad de la garantía de la aplicación de las disposiciones corresponde en primer término a las instancias nacionales, regionales y locales, y cada Estado miembro está obligado respecto a todos los

ciudadanos de la Unión Europea, no sólo respecto a sus propios ciudadanos, de todos los alimentos producidos en su territorio (Comisión de las Comunidades Europeas, 1999).

A lo largo de estos últimos años se ha visto la necesidad de armonizar criterios sobre los medicamentos veterinarios. La Directiva 2004/28/CE actualiza la definición de medicamento veterinario, “toda sustancia o combinación de sustancias, *a*) que se presente como poseedora de propiedades curativas con respecto a las enfermedades animales; o *b*) que pueda administrarse al animal con el fin de restablecer, corregir o modificar las funciones fisiológicas del animal ejerciendo una acción farmacológica, inmunológica o metabólica, o de establecer un diagnóstico médico”. Para cualquier medicamento veterinario, la relación beneficio/riesgo tiene que ser favorable, de forma que se garantice no sólo el bienestar de los animales productores de alimentos, sino también, que se garantice un nivel elevado de protección de los consumidores (Diario Oficial de la Unión Europea, 2004).

Así, antes de ser aprobado el uso de un nuevo medicamento en la cadena alimentaria, es sometido a estudios de calidad, seguridad y eficacia, y es evaluado para fijar un límite máximo de residuo (LMR) de medicamento veterinario en alimentos de origen animal, incluidos carne, pescado, leche, huevos y miel, destinados al hombre. Se entiende por LMR el contenido máximo de residuo resultante de la utilización de un medicamento veterinario (expresado en mg/kg o en µg/kg sobre la base del peso en fresco) autorizado en la Comunidad o reconocido como admisible en un producto alimenticio.

Dicho límite se basará en el tipo y en la cantidad de residuos que se considere que no constituyen ningún riesgo toxicológico para la salud humana, y sirve también para determinar el tiempo de espera que debe transcurrir desde la administración del fármaco hasta el sacrificio del animal. Actualmente, la norma básica que regula y recoge estos LMRs es el Reglamento (CE) N° 470/2009 del Parlamento Europeo y del Consejo (Diario Oficial de la Unión Europea, 2009), que deroga el Reglamento (CEE) n° 2377/90 del Consejo, y ha sido complementado por el Reglamento (UE) N° 37/2010 (Diario Oficial de la Unión Europea, 2010). Este último

Reglamento actualiza y unifica los listados de sustancias farmacológicamente activas, creándose únicamente dos listas, una para LMRs de sustancias permitidas y otra lista de sustancias prohibidas para las que no puede establecerse un límite máximo seguro para el consumidor (Tabla I.5).

**Tabla I.5:** *Sustancias farmacológicamente activas prohibidas*

| <b>Sustancias prohibidas para tratamiento de abejas/colmenas</b> |               |
|--|---------------|
| Aristolochia spp. y sus formulaciones                            | Cloranfenicol |
| Cloroformo   | Clorpromacina |
| Colchicina   | Dapsona       |
| Dimetridazol   | Metronidazol  |
| Nitrofuranos (incluida furazolidona)                             | Ronidazol     |

(Fuente: Reglamento (UE) N° 37/2010).

Dado que la lista de sustancias permitidas es una lista positiva, la administración a animales productores de alimentos de medicamentos veterinarios que contengan sustancias farmacológicamente activas, que no figuran en la tabla de sustancias permitidas, está prohibida. Esto es lo que ocurre con la miel, para la que no se han establecido LMR para residuos de sustancias farmacológicamente activas. Así, el uso de medicamentos antimicrobianos y antibióticos no están autorizados para el tratamiento de las abejas melíferas en la UE debido a que no existen LMR comunitarios. Para sustancias sin LMR, los laboratorios comunitarios de referencia (CRL) han distribuido un documento de orientación que proporciona concentraciones recomendadas con el fin de mejorar y armonizar el funcionamiento de los métodos analíticos para los planes nacionales de control de residuos. Aunque este documento no tiene validez legal, su único objetivo es servir de orientación técnica para los métodos analíticos de control de residuos (Community Reference Laboratorie, 2007).

El problema aparece porque algunos medicamentos antimicrobianos que sí están autorizados para el tratamiento de las abejas melíferas fuera de la UE, lo que genera un problema importante con las importaciones de miel. Esto hace que sea imprescindible que los países elaboren y lleven a cabo planes de control de residuos, por lo que necesitan disponer de

metodologías analíticas que sean sensibles y fiables, de forma que se pueda garantizar que la miel importada de terceros países a la UE y la producida en la UE, cumple con las normas comunitarias. Estas metodologías analíticas tienen que estar validadas y cumplir con los criterios de funcionamiento establecidos por la Decisión 2002/657/CE de la Comisión, y que posteriormente ha sido modificada en parte por la Decisión 2003/181/CE y la Decisión 2004/25/CE de la Comisión, todas ellas unificadas en un texto consolidado (Diario Oficial de las Comunidades Europeas, 2002a).

El objetivo que se persigue con esta reglamentación es garantizar la calidad y validez de los resultados analíticos entre los distintos laboratorios. Para ello se requiere de métodos validados de acuerdo con procedimientos y criterios de funcionamiento comunes, tanto para los métodos de cribado como los de confirmación.

La Decisión 2002/657/CE introduce varias novedades, sustituye los conceptos de métodos de rutina y métodos de referencia por los de métodos *screening* y métodos de confirmación, incluyendo además los criterios y procedimientos para la validación de ambos métodos. También aparecen las definiciones de “*compliant*” and “*no compliant*” para sustituir los resultados dados como “positivos” o “negativos”. Otra novedad importante es el concepto de Límite mínimo de funcionamiento exigido (MRPL) de los métodos analíticos, aplicables a sustancias para las que no se ha establecido un límite máximo de residuo, y también para aquellas sustancias cuya utilización no ha sido autorizada ni prohibida específicamente en la UE. Así, se define MRPL como la cantidad más pequeña de un analito contenida en una muestra, que puede ser detectado por el método analítico.

Para facilitar el cumplimiento de esta legislación comunitaria, cada uno de los estados miembros de la UE debe promulgar leyes que ayuden a los productores de alimentos a cumplir con ella. En España, con la entrada en vigor del Real Decreto 1749/1998 se transpone la Directiva 96/23/CE, estableciéndose las medidas de control relativas a las sustancias o sus metabolitos que pueden ser administrados a los animales, para su detección en cualquier fase (Boletín Oficial del Estado, 1998).

En España existe una Comisión Nacional de Coordinación de la Investigación y Control de Residuos o Sustancias en animales vivos y sus productos, creada al amparo del Real Decreto 1749/1998 y presidida por la Agencia Española de Consumo, Seguridad Alimentaria y Nutrición (AECOSAN), y entre sus funciones tiene las de designar los laboratorios Nacionales de referencia y describir los procedimientos de toma de muestra y las medidas a tomar en caso de infracción (Boletín Oficial del Estado, 1998).

De acuerdo con la Directiva 96/23/CE, cada Estado miembro de la UE debe aprobar un plan de control oficial de residuos que en España se conoce como "Plan Nacional de Investigación de Residuos" (PNIR), y que tiene entre sus objetivos: (1) detectar cualquier tratamiento ilegal medicamentoso en animales; (2) comprobar que los residuos de los medicamentos veterinarios cumplen con los límites máximos fijados y; (3) examinar y desvelar las razones de la presencia de residuos en alimentos de origen animal, (Agencia Española de Consumo, Seguridad Alimentaria y Nutrición, PNIR) (Diario Oficial de la Comunidad Europea, 1996).

Para proteger la salud humana, los límites máximos de residuos deben fijarse de acuerdo con los principios reconocidos de evaluación de la seguridad, teniendo en cuenta los riesgos toxicológicos, la contaminación medioambiental y los efectos microbiológicos y farmacológicos no deseados de los residuos.

Gracias a los avances científicos y técnicos es posible detectar la presencia de residuos de medicamentos veterinarios en los alimentos a niveles cada vez más bajos.

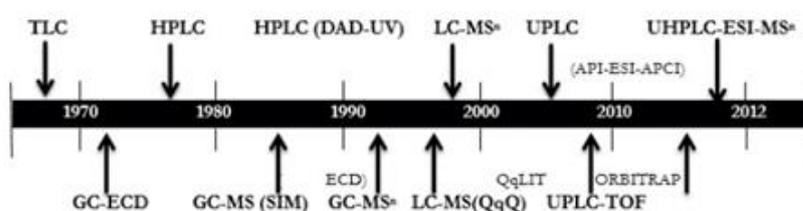
## **5. MÉTODOS ANALÍTICOS PARA LA DETERMINACIÓN DE RESIDUOS DE TRATAMIENTOS VETERINARIOS EN LA MIEL**

La presencia de residuos de antibióticos en muestras de alimentos genera una gran preocupación en la población, por lo que es necesario disponer de metodologías analíticas fiables, sensibles y selectivas, que

permitan la determinación eficaz de estos residuos en distintas matrices de forma que los alimentos que lleguen al consumidor sean seguros. La detección de residuos de medicamentos veterinarios es una tarea compleja por varios factores: (1) existen un gran número compuestos de la misma familia que pueden estar presentes, incluso a veces lo que pueden aparecer son metabolitos del compuesto original, (2) la gran variedad de alimentos susceptibles de contener residuos de antibióticos, (3) a lo que hay que añadir el corto periodo de tiempo para dar resultados, (4) y todo ello combinado con la búsqueda de concentraciones de sustancias lo más bajas posibles.

Desde la segunda mitad del siglo veinte, se ha producido un gran avance en el desarrollo de nuevos métodos analíticos o modificaciones de los ya existentes para aumentar la sensibilidad y selectividad (**Figura I.8**) (Talero-Pérez, Medina y Rozo-Núñez, 2014).

Los métodos de análisis usados actualmente para la detección de residuos de antibióticos en muestras de alimentos y medioambientales, se dividen en dos grandes grupos: métodos cromatográficos, considerados como las técnicas de referencia, y métodos no cromatográficos que engloban los distintos tipos de ensayos de barrido (screening methods).



**Figura I.8:** Desarrollo de técnicas analíticas para la identificación de residuos.

QqQ: triple cuadrupolo; QTI: cuadrupolo con trampa de iones; TOF: tiempo de vuelo; QqTOF: cuadrupolo tiempo de vuelo; TLC: cromatografía en capa fina.

La Decisión de la Comisión 2002/657/CE establece los procedimientos a emplear y los criterios que deben cumplir los métodos de análisis para poder ser utilizados para el control de residuos, y en su anexo, clasifica los métodos analíticos para la detección de residuos en dos grupos en función de sus características y utilidad (Diario Oficial de las Comunidades Europeas, 2002a).

Hace una primera distinción entre: (1) *métodos cualitativos*, englobando aquellos que identifican sustancias basándose en sus propiedades químicas, biológicas o físicas y; (2) *métodos cuantitativos*, aquellos que determinan la cantidad o fracción de masa de una sustancia de forma que pueda expresarse como un valor numérico de unidades apropiadas.

A su vez, dicha Decisión, basándose en la Directiva 96/23/CE, realiza otra clasificación de los métodos de detección en función de su utilidad: (1) *métodos de cribado o screening*, utilizados para detectar la presencia de una sustancia o tipo de sustancias, al nivel de interés. Sirven para analizar muchas muestras simultáneamente en busca de posibles resultados no conformes y; (2) *métodos de confirmación*, a los que proporcionan información total o complementaria que permite identificar y, en su caso, cuantificar de manera inequívoca la sustancia al nivel de interés.

El proceso de análisis se define como “el conjunto de operaciones comprendidas entre la muestra –sin tomar, sin medir, sin tratar- y los resultados expresados según los requerimientos” (Valcárcel Cases y Gómez Hens, 1990). Dentro del mismo, se distinguen tres grandes etapas: las operaciones previas que preparan a la muestra para la medición analítica en sí, la medición y la transducción de la señal analítica, y la toma y el tratamiento de los datos. En la mayoría de los procesos analíticos actuales, más del 80 % del tiempo de análisis se invierte prácticamente en la toma y acondicionamiento de la muestra.

### 5.1. MÉTODOS DE EXTRACCIÓN

La preparación y extracción del analito de la muestra a analizar (que se enmarcan en las operaciones previas), constituyen una etapa clave en el

proceso analítico. Generalmente se trabaja con muestras complejas, y la concentración del residuo contaminante es relativamente baja, por lo que hay que utilizar métodos de tratamiento de muestra que permitan la extracción selectiva, preconcentración y la purificación del compuesto/s de interés, para posteriormente llevar a cabo la determinación analítica. Durante esta etapa hay que reducir la manipulación de la muestra con la finalidad de evitar contaminaciones con residuos, incluso evitar pérdidas del analito presente en la muestra si el protocolo tiene varias etapas.

El objetivo de la preparación de la muestra es transformar los analitos en formas medibles (IUPAC). El procedimiento consiste en poner en contacto la muestra con el extractante, que puede ser un sólido, líquido o fluido supercrítico, en unas condiciones de pH, temperatura y fuerza iónica adecuadas, para conseguir un doble objetivo, por un lado, debilitar las interacciones que mantienen unido el analito a la matriz, y por otro, aumentar las interacciones analito-extractante, consiguiendo finalmente la separación “selectiva” del analito objeto de estudio de la matriz de la muestra, eliminando posibles sustancias interferentes. Por lo tanto, no sólo hay que estudiar la naturaleza del analito, sino también las características de la matriz para alcanzar el máximo rendimiento en esta etapa.

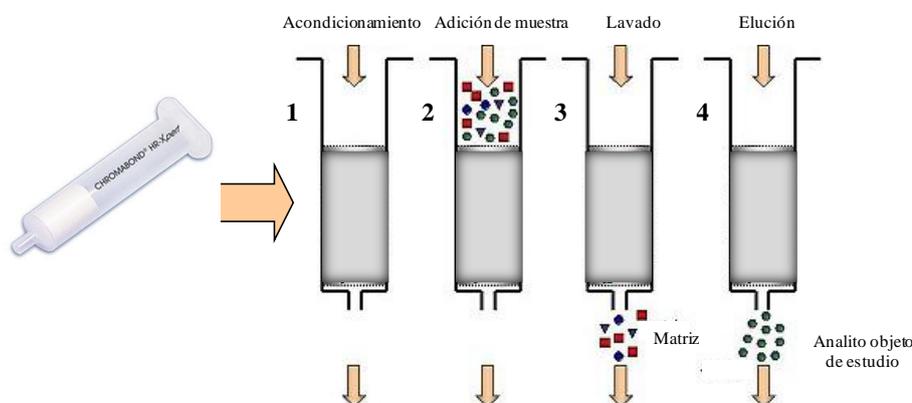
Generalmente el proceso de preparación de la muestra incluye las siguientes etapas: aislamiento, purificación y preconcentración del analito, y en ocasiones, si la técnica de detección lo requiere para un analito concreto, como por ejemplo la cromatografía, es necesaria una etapa de derivatización que convierta al analito en un compuesto medible.

A lo largo de los años se han ido desarrollado numerosas técnicas de extracción, como la extracción líquido-líquido (LLE), extracción en fase sólida (SPE), microextracción en fase sólida (SPME), extracción con fluidos supercríticos (SFE), extracción con líquidos presurizados (PLE), extracción asistida por microondas (MAE), extracción asistida por ultrasonido (UAE), cromatografía de exclusión molecular (GPC), polímeros impresos molecularmente (MIPs), dispersión de matriz en fase sólida (MSPD), QuEChERS (acrónimo en inglés de rápido, fácil, barato, eficaz, robusto y seguro), y microextracción en fase líquida (LPME) (Rodríguez-Gonzalo, García-Gómez, y Carabias-Martínez, 2010; Zhang y *col.*, 2012).

De todas las metodologías descritas, la SPE tiene una gran relevancia en el procesado de muestras (Buszewski y Szultka, 2012), no en vano se han desarrollado una gran cantidad de métodos basados en SPE para determinar residuos de contaminantes en distintos tipos de alimentos, que han sido evaluados en numerosos trabajos de investigación (Stolker y Brinkman, 2005; Toldrá y Reig, 2006; Rial-Otero, Gaspar, Moura, y Capelo, 2007; Ramos, 2012).

En la SPE se hace pasar la muestra a través de una fase sólida (polar, apolar, intercambio iónico, etc.), quedando retenidos algunos de los compuestos y el resto pasan inalterados. Los analitos de interés que han quedado retenidos se eluyen posteriormente con un pequeño volumen de disolvente. De esta forma se consigue concentrar y purificar los analitos (Berrueta, Gallo, y Vicente, 1995; Simpson, 2000).

El típico protocolo de una extracción SPE consta de las siguientes etapas (**Figura I.9**):



**Figura I.9:** Representación esquemática del proceso de extracción SPE.

1) **Acondicionamiento:** consiste en acondicionar la fase estacionaria con un disolvente adecuado en función del tipo de adsorbente, y después se hace pasar una cantidad del disolvente que contiene la muestra.

2) *Adición de la muestra*: los analitos de interés quedan retenidos en la fase estacionaria o adsorbente.

3) *Proceso de lavado*: con la finalidad de eliminar sustancias que puedan interferir.

4) *Elución de los analitos*: para ello hay que seleccionar un disolvente adecuado, que permita romper las uniones entre el analito de interés y el adsorbente, de forma que se consiga una elución selectiva del compuesto de interés.

La eficacia del proceso de extracción, depende de las características químicas del analito, del sólido extractante, del disolvente original y del disolvente que actúa como eluyente. Si el analito es de carácter poco polar, y está disuelto en un disolvente original de carácter polar (agua en la mayoría de los casos), un extractante cuya superficie sea apolar interaccionará fuertemente con el analito, adsorbiéndolo eficazmente. La elución se deberá realizar utilizando un disolvente apolar (por ejemplo hexano), pues el eluyente interaccionará muy bien con el analito y será capaz de separarlo de la fase sólida. Análogamente, para extraer compuestos polares que inicialmente están contenidos en disolventes poco polares, emplearemos una fase sólida de carácter polar, y el eluyente a usar deberá ser también polar.

Actualmente, las firmas comerciales ofrecen una amplia variedad de cartuchos para la extracción de compuestos o familias de compuestos contenidos en diferentes matrices, y en la ficha técnica del producto indica el eluyente a aplicar y el modo de operar para conseguir la selectividad y el enriquecimiento adecuados. Las características de los sólidos empleados en SPE se muestran en la **Tabla I.6**.

La capacidad de los cartuchos comerciales depende de la capacidad de retención de la fase sólida y de la cantidad de la misma contenida en el cartucho. Los adsorbentes suelen tener una capacidad que varía entre 10 y 50 mg de analito por gramo de adsorbente, por lo que un cartucho típico que contenga 100 mg de adsorbente, es capaz de retener entre 1 y 5 mg de analito. Aunque esta cantidad parezca pequeña, es suficiente cuando la SPE

se aplica a la separación y purificación de sustancias que están inicialmente en concentraciones del nivel de los  $\mu\text{g/L}$  o inferiores.

**Tabla I.6:** Soportes disponibles para la extracción en fase sólida.

| Nombre                       | Estructura   | Características   | Aplicaciones  |
|------------------------------|--|---|---|
| Octadecil (C <sub>18</sub> ) | -C <sub>18</sub> H <sub>37</sub>   | Hidrofóbico, No polar   | Especies hidrofóbicas en disoluciones acuosas: productos orgánicos  |
| Octilo (C <sub>8</sub> )     | -C <sub>8</sub> H <sub>17</sub>  | Hidrofóbico   | Especies hidrofóbicas en disoluciones acuosas (menos fuerza que C <sub>18</sub> )   |
| Sílice                       | $\begin{array}{c} \text{OH} \quad \text{OH} \\   \quad   \\ -\text{O}-\text{Si}-\text{O}-\text{Si}-\text{O}- \\   \quad   \end{array}$ | Hidrofílica, Polar, Neutra  | Especies de polaridad baja a moderada en disoluciones no acuosas: vitaminas liposolubles  |
| Florisil                     | Silicato de magnesio   | Hidrofílica<br>Polar<br>Levemente básica                            | Especies de polaridad baja a moderada en disoluciones no acuosas: grasas, bifenilos policlorados  |
| Alúmina A (ácida)            | $\begin{array}{c} \text{OH} \quad \text{OH} \\   \quad   \\ -\text{O}-\text{Al}-\text{O}-\text{Al}-\text{O}- \end{array}$              | Hidrofílica, Polar, Ácida<br>Enlaza cationes                        | Especies hidrofílicas en disoluciones no acuosas: antibióticos, cafeína   |
| Alúmina N (neutra)           | $\begin{array}{c} \text{OH} \quad \text{O}^- \\   \quad   \\ -\text{O}-\text{Al}-\text{O}-\text{Al}-\text{O}- \end{array}$             | Hidrofílica, Polar<br>Neutra  | Especies hidrofílicas en disoluciones no acuosas: metilterbutiléter, metanol, acetona.  |
| Alúmina B (básica)           | $\begin{array}{c} \text{O}^- \quad \text{O}^- \\   \quad   \\ -\text{O}-\text{Al}-\text{O}-\text{Al}-\text{O}- \end{array}$            | Hidrofílica, Polar, Básica, Enlaza cationes                         | Especies hidrofílicas en disoluciones no acuosas: esteroides, glifosato.  |
| Aminopropilo                 | -C <sub>3</sub> H <sub>6</sub> NH <sub>2</sub>   | Hidrofílico, Polaridad moderada, Ligeramente básico, Enlaza aniones | Especies de polaridad moderada en disolventes acuosos u orgánicos: fenoles, petróleo, sacáridos   |
| Cianopropilo                 | -C <sub>3</sub> H <sub>6</sub> CN  | Hidrofóbico, Casi apolar<br>Neutro                                  | Especies en disolventes acuosos u orgánicos: plaguicidas, péptidos hidrofóbicos   |
| Diol                         | $\begin{array}{c} \text{OH} \quad \text{OH} \\   \quad   \\ -\text{CH}_2-\text{CH}_2- \end{array}$                                     | Hidrofóbico, Casi apolar<br>Neutro                                  | Trazas de elementos en agua; proteínas y péptidos en disolventes acuosos u orgánicos  |
| Estireno divinilbenceno      |  | Hidrofóbico, Neutro   | Productos orgánicos en agua: PAHs, Vitamina B <sub>12</sub>   |
| Intercambio aniónico fuerte  | -CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> -<br>*N(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub>  | Hidrofílica,<br>Enlaza aniones                                      | Aniones en agua o disolventes mixtos acuosos, por ejemplo Cl <sup>-</sup> , SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> , PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> |

Un aspecto a considerar es el caudal de entrada de la muestra al cartucho, ya que si éste es excesivo la retención del analito no será efectiva, pero si es muy bajo la operación se realizará de modo muy lento. En general, los fabricantes recomiendan un caudal entre 5 y 10 mL/min. Esto implica que a un caudal máximo, una muestra de agua de 2 L tardaría 200 minutos en percolarse a través del cartucho, pero si el analito contenido en la misma es eluido con 2 mL de disolvente orgánico, el factor de

enriquecimiento obtenido es 1000, es decir, el analito se habrá concentrado 1.000 veces.

## 5.2. MÉTODOS DE CONFIRMACIÓN

Los métodos de confirmación deben proporcionarnos información para la cuantificación e identificación inequívoca del analito, y tienen que cumplir con los requisitos de sensibilidad y selectividad marcados en las normas reguladoras. La Directiva 96/23/CEE establece que *“los métodos basados en el análisis cromatográfico, sin el empleo de detección espectrométrica molecular, no son adecuados para su uso como métodos confirmatorios”* (Diario Oficial de la Comunidad Europea, 1996). Más tarde, la Decisión 2002/657/CE señala que si una técnica no tiene suficiente especificidad, debe combinarse con otra que se la aporte, lo que ha originado un gran desarrollo de métodos de cromatografía líquida (LC), y en menor medida de cromatografía de gases (GC), acoplados a espectrometría de masas (MS) (Diario Oficial de las Comunidades Europeas, 2002a).

La cromatografía es una técnica analítica de separación en la que una muestra compleja se desplaza en una fase móvil, que puede ser un gas, un líquido o un fluido supercrítico, a través de una fase estacionaria, fijada a una columna o a una superficie sólida. Ambas fases son seleccionadas de modo que los componentes de la muestra se distribuyan de modo distinto entre ellas.

En los últimos años, los avances de las técnicas cromatográficas han hecho que la LC acoplada a MS (LC-MS), sea el método oficial de confirmación en el campo del análisis de residuos de antibióticos en distintas matrices alimentarias (Kennedy, McCracken, Cannavan, y Hewitt, 1998; Niessen, 1998; Stolker y Brinkman, 2005; M. Stolker y *col.*, 2008), encontrando en la literatura científica numerosas publicaciones y revisiones que lo avalan (Bogialli y Di Corcia, 2009; Le Bizec, Pinel y Antignac, 2009; Malik, Blasco y Picó, 2010; Di Stefano y *col.*, 2012)

Cuando se analiza una muestra, se buscan unos determinados compuestos, pero no debemos olvidar que pueden estar presentes otros contaminantes, no objeto de análisis, que pueden pasar desapercibidos. Por

eso, se hace necesario realizar análisis que permitan determinar el número máximo de compuestos de una misma familia o diversas familias de forma simultánea (Di Stefano y *col.*, 2012). Una virtud muy importante de las técnicas cromatográficas es su capacidad para realizar análisis multianalito, convirtiéndolas en una potente herramienta para los laboratorios de análisis de residuos en alimentos (Almeida, Rezende, Souza, y Brito, 2012; Lehotay y *col.*, 2012; Geis-Asteggiante y *col.*, 2012) y aguas (Heberer, 2002; Robles-Molina, Lara-Ortega, Gilbert-López, García-Reyes y Molina-Díaz, 2014).

La combinación de LC con MS ha permitido reunir en una sola técnica herramientas muy útiles, al poder de separación que aporta la LC se le une la universalidad, sensibilidad y selectividad que aporta la detección por MS, convirtiéndola en una técnica de referencia para el análisis de sustancias con actividad farmacológica en alimentos, ya que la naturaleza polar, no volátil y termoestabilidad de los antibióticos limita las aplicaciones de la GC, pues sería necesario recurrir a procesos de derivatización que aumentarían la complejidad, coste y tiempo del análisis.

### 5.2.1. Cromatografía líquida (LC)

La cromatografía líquida de alta resolución -HPLC- (*High Performance Liquid Chromatography*) es una potente herramienta para la separación de analitos en muestras complejas. La capacidad de separación se basa en las interacciones de estos analitos con el relleno o fase estacionaria contenida en la columna, y en la solubilidad de los mismos en la fase móvil líquida. Si atendemos a la fase móvil, la LC presenta una ventaja significativa sobre la GC, como es la de poder disponer de múltiples fases móviles mediante la mezcla de uno a cuatro disolventes. Atendiendo a la composición de la fase móvil durante el proceso cromatográfico se distingue, a su vez, entre separación isocrática o bien, utilizando gradiente de composición.

En el primer caso, la composición de la fase móvil no varía a lo largo de todo el proceso separativo, mientras que en el segundo la composición de la fase móvil varía de forma programada a lo largo del tiempo.

El tipo o naturaleza del relleno de la columna, permite ampliar notablemente la capacidad separativa atendiendo al tamaño de la partícula

y a su composición. En base a este último criterio, se pueden clasificar las distintas columnas en base al tipo de relleno utilizado en el empaquetamiento de las mismas y a su correspondiente aplicación analítica (ver **Tabla I.6**).

En cuanto a los sistemas de detección de los analitos, la familia de detectores comerciales disponibles ha ido aumentando de forma progresiva a partir del más sencillo y universal, el detector Ultravioleta/Visible (UV/Vis), pudiendo emplear detectores de fotodiodos (*Diode Array Detector*, DAD); de índice refracción (*Refractive Index Detector*, RID); fluorescencia (*Fluorescence Detector*, FD); luz dispersa (*Evaporative Light Scattering Detector*, ELSD); aerosol cargado (*Charged Aerosol Detector*, CAD) y espectrómetros de masas (MSD).

El detector DAD es una evolución del UV/Vis y mediante la utilización de una matriz de diodos sensibles a diferentes longitudes de onda, permite obtener en línea y en tiempo real los espectros de los analitos. El detector RID es adecuado para aquellas sustancias que no presentan adecuada absorbancia UV/Vis (por ejemplo carbohidratos) pero que causan variación en el índice de refracción de la fase móvil. El detector FD es aplicable para aquellas sustancias que son capaces de emitir fluorescencia tras ser excitadas; su sensibilidad es mucho más alta que en UV/Vis o DAD. El detector ELSD permite detectar la señal de analitos que no presentan absorbancia UV/Vis (detección por DAD) o que no se ionizan fácilmente (detección por MS), por lo que es considerado como universal; el flujo de la columna se atomiza para evaporar la fase móvil y los analitos se detectan al dispersar un haz de luz o láser. El detector CAD es una evolución del ELSD en el que el aerosol formado para la evaporación de la fase móvil se carga eléctricamente y se detecta posteriormente esta carga. El detector MS, en sus distintas variantes, permite obtener sensibilidades extremadamente bajas, además de proporcionar información para la identificación estructural de los analitos. A pesar de sus excelentes ventajas, el acoplamiento de LC a MS no está exento de dificultades, que han de solventarse optimizando: (1) el elevado flujo de fase móvil a introducir en un sistema de detección que requiere alto vacío para evitar distorsiones de picos; (2) la pérdida de afinidad que se produce en el detector de MS con las fases móviles no

volátiles que se emplean habitualmente en LC, así como conseguir ionizar analitos no volátiles o térmicamente lábiles, ya que los detectores de MS miden relaciones masa-carga ( $m/z$ ).

Para solventar estos inconvenientes, el sistema de nebulización térmica (TS) se ha ido reemplazando por las interfases basadas en ionizaciones más suaves, donde la ionización se realiza a presión atmosférica (API), pasando a continuación los iones a las zonas del espectrómetro de masas sometidas a un elevado vacío (Fenn, Mann, Meng, Wong y Whitehouse, 1990; García, Huang y Stansbury, 1996). Habitualmente, se utilizan tres métodos de ionización API: la ionización por electronebulización (ESI), la ionización química (APCI) y la fotoionización (APPI).

En la interfase ESI, los analitos disueltos en la fase móvil pasan al detector de MS a través de un capilar de acero inoxidable a presión atmosférica sometido a un alto voltaje (entre 3-5 KV). La corriente de líquido, se dispersa al fluir a través del capilar y las moléculas de los analitos y del disolvente forman un spray de pequeñas gotas cargadas en un proceso de nebulización. Las moléculas de disolvente se evaporan al atravesar, a presión atmosférica, la región de la fuente del espectrómetro de masas (120 °C) (desolvatación), a lo que también contribuye la corriente de nitrógeno (350 °C). Las gotas cada vez se hacen más pequeñas conforme aumenta la evaporación del disolvente, hasta producirse la ruptura final de la gota, originando iones en fase gaseosa (explosión de Coulomb). Así, se generan iones con una o más cargas eléctricas, que se introducen en el analizador de masas.

El mecanismo en la interfase APCI se basa en un proceso de ionización química. El flujo proveniente de LC se nebuliza en un tubo de sílice fundida caliente, donde el disolvente se evapora casi por completo. La mezcla gas-vapor entra en la fuente, a presión atmosférica, donde se produce la ionización química al ser sometida a una descarga. Entre las moléculas del analito y las de la fase móvil ocurren reacciones de transferencia protónica en fase vapor y como resultado, se pueden obtener moléculas de analito protonadas, desprotonadas y también aductos con moléculas de solvente de la propia fase móvil.

La APPI es muy similar a la APCI, la principal diferencia es que emplea fotones para ionizar las moléculas de la muestra, teniendo que aplicar mayores energías de ionización.

Las interfase ESI se ha convertido en la técnica de ionización de referencia en la mayoría de laboratorios, debido a que pueden generarse iones poli-cargados. De este modo, mientras que con APCI tan sólo se pueden evaluar moléculas de bajo peso molecular (hasta aprox. 600) no termolábiles, con ESI el abanico de posibilidades se amplía, abarcando sustancias de bajo y elevado peso molecular y termolábiles, pudiendo ampliar así el rango de masas del equipo en un factor equivalente al número de cargas de la molécula de analito.

### 5.2.2. Espectrometría de masas

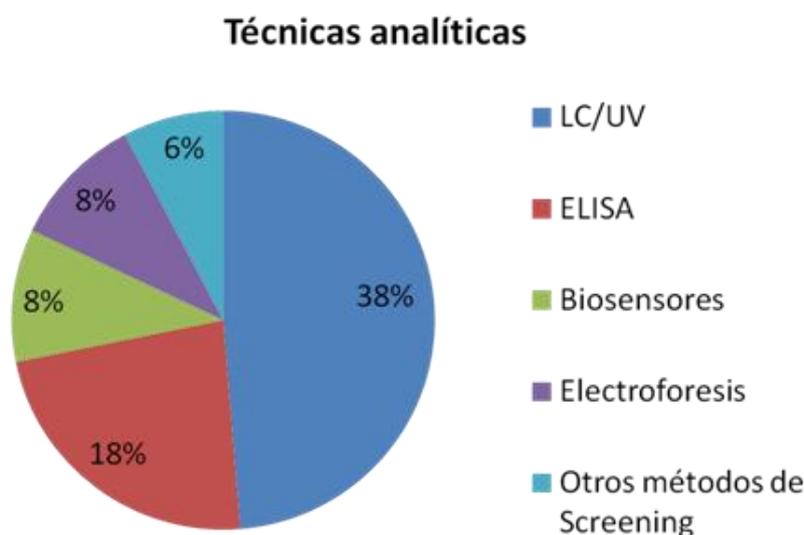
Un espectrómetro de masas es un equipo en el que las moléculas de una mezcla se bombardean (fuente de ionización) con un haz de electrones, produciéndose la pérdida de un electrón y la formación de un ión molecular. Los distintos tipos de espectrómetros de masas que se conocen actualmente, se diferencian por el tipo de analizador utilizado. El analizador es el responsable de separar los iones en fase gaseosa que se han formado en la fuente de ionización, en función de su relación masa/carga ( $m/z$ ). Los analizadores más usados son el cuadrupolo (Q), tiempo de vuelo (TOF), trampa de iones (IT, LIT), sector magnético y resonancia ciclotrónica con transformada de Fourier (FT-ICRMS). El equipo incorpora un transductor (canales multiplicadores de electrones, copa de Faraday, o centelleo), capaz de transformar los iones procedentes del analizador de masas (una magnitud física), en una señal eléctrica que puede ser procesada y almacenada, para ser sometida mas tarde a tratamiento de datos.

Sin embargo, a pesar de las numerosas ventajas que presentan las técnicas cromatográficas (fiabilidad, reproducibilidad, sensibilidad), éstas no están exentas de inconvenientes: instrumentación compleja y de elevado coste, personal cualificado para su manejo, preparación laboriosa de la muestra (extracción, purificación y preconcentración), tiempos largos de análisis, uso de grandes volúmenes de disolventes orgánicos, entre otros.

Además, con estos métodos es imposible realizar determinaciones *in situ*, no pudiendo ser utilizados para comprobar el cumplimiento de las condiciones sanitarias en determinadas situaciones.

Todo esto ha contribuido al desarrollo de otras técnicas analíticas, como los métodos inmunoquímicos, que han experimentado un crecimiento muy rápido en los últimos años para intentar dar solución a estos inconvenientes, permitiendo detectar analitos -a concentraciones similares o inferiores a las alcanzadas con las técnicas cromatográficas de referencia-, en muestras de alimentos sin la necesidad de un amplio y costoso laboratorio, y de una forma rápida.

Los principales métodos de análisis, agrupados por el tipo de técnica empleada, usados para la determinación de antibióticos en alimentos son los métodos cromatográficos, seguidos por los inmunoquímicos (**Figura I.10**) (Cháfer-Pericás, Maquieira y Puchades, 2010).



**Figura I.10:** Distribución de las técnicas analíticas usadas para la determinación de antibióticos en alimentos.

### 5.3. NECESIDAD DE NUEVAS METODOLOGÍAS. MÉTODOS DE CRIBADO

Para dar respuesta a las exigencias del consumidor, preocupado por ingerir alimentos saludables e inocuos, las normas de legislación alimentaria son cada vez más estrictas y establecen controles más rigurosos para comprobar y asegurar, que el uso de medicamentos veterinarios se realiza de una manera adecuada y que no van a aparecer residuos de ellos en los alimentos de origen animal una vez han llegado al consumidor.

Pero para cumplir con los requisitos reguladores y proteccionistas, se requieren metodologías analíticas rápidas, sensibles, selectivas, de bajo coste; que permitan procesar un gran número de muestras y con un sencillo aparataje, y siempre que sea posible, que permitan realizar determinaciones en el sitio donde pueda presentarse el problema, de forma que ayuden a verificar el cumplimiento de las normativas vigentes, y en los casos que sea necesario, se puedan eliminar del mercado de forma rápida los alimentos que no cumplan con ella, impidiendo que lleguen al consumidor.

Los nuevos métodos desarrollados no sólo mejoran las prestaciones de eficiencia y sensibilidad, menor coste y mayor número de muestras analizadas por unidad de tiempo, sino que también contribuyen a mejorar la seguridad alimentaria y la distribución de alimentos. Por todo ello, son muchas las investigaciones que se están llevando a cabo para mejorar el análisis en campo o en la propia línea de fabricación, desarrollando y optimizando técnicas de *screening*, y nuevos métodos de tratamiento de la muestra, ya que como se ha descrito anteriormente, esta etapa es crucial en todo el proceso analítico.

#### 5.3.1. Características generales de los métodos de *screening* y clasificación

La importancia y el potencial de estos ensayos se ponen de manifiesto en el considerable incremento de trabajos científicos relacionados con estas metodologías analíticas en los últimos treinta años. El interés de estos métodos analíticos es doble: en primer lugar, por la necesidad de abaratar los costes de los programas de vigilancia y control; en segundo lugar, por la necesidad de conocer el origen, vías de distribución y destino de los

contaminantes que pueden ser perjudiciales para la salud y el medio ambiente.

Un ensayo de barrido o test de *screening* se define como *“aquel 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”* (Valcárcel, Cárdenas y Gallego, 1999). Por lo tanto, la aplicación de estos métodos permite identificar las muestras que probablemente están contaminadas las cuales serán sometidas a un análisis más exhaustivo permitiendo determinar la presencia cualitativa y cuantitativa fiable del residuo mediante un método analítico validado que, en la mayoría de los casos, es cromatográfico.

Entre las ventajas de los ensayos de barrido cabe destacar su rapidez, simplicidad y minimización de errores debido a la ausencia o aplicación de procedimientos sencillos de tratamiento de muestra. Otros factores son el ahorro de tiempo y dinero, ya que sólo las muestras que proporcionan una respuesta positiva al ensayo necesitarán ser confirmadas con otra técnica más sofisticada. Las características fundamentales que diferencian los análisis convencionales de los ensayos de barrido se resumen en los siguientes puntos:

- La respuesta que proporciona el ensayo permite tomar una decisión inmediata.
- Los resultados obtenidos mediante estos métodos a menudo necesitan ser confirmados mediante técnicas convencionales.
- Suelen proporcionar respuestas, fundamentalmente, cualitativas aunque, en menor medida, también pueden suministrar medidas cuantitativas.
- Requieren un escaso o nulo pretratamiento de muestra.
- Son ensayos rápidos.

No obstante, no es necesario que los métodos puestos a punto presenten todas las características descritas, sólo es necesario definirse por tres de ellas, para que un método analítico pueda ser considerado un ensayo de barrido.

Además, una de las características más relevantes de estos procedimientos es el tipo de respuesta binaria que proporcionan, tipo SI/NO, que resalta su carácter cualitativo. No obstante, hay que considerar que muchos de estos ensayos, como sucede para la mayoría de los sensores, poseen la capacidad de proporcionar resultados cualitativos y también cuantitativos con valores de exactitud y precisión adecuados. Por otro lado, del mismo modo que los resultados obtenidos mediante los métodos convencionales llevan asociados una incertidumbre debida al proceso de análisis, los ensayos que proporcionan respuestas binarias también se encuentra sometidos a errores, denominados: (1) *Falsos negativos*. Se producen cuando el resultado del test es NO pero debería ser SI. *Ejemplo* de esta circunstancia sería que una muestra de miel que contuviera residuos de antibióticos, diera una respuesta negativa en el ensayo, considerándose por tanto apta para consumo. (2) *Falsos positivos*. Se producen cuando el resultado del test es SI pero debería ser NO. *Ejemplo* de ello sería una muestra de miel que no contuviera ningún antimicrobiano y sin embargo el ensayo, confirmase la presencia de dichos analitos.

Los ensayos de barrido o “test de *screening*” pueden ser clasificados atendiendo a una gran variedad de criterios, tipo de respuesta binaria, relación señal-analito, estado agregación de las muestras, tratamiento de muestra, sistema de detección y formato de ensayo. Los métodos de análisis utilizados habitualmente con esta finalidad se basan en técnicas cromatográficas, microbiológicas e inmunoquímicas (Toldrá y Reig, 2006).

### 5.3.2. Métodos microbiológicos

Los primeros métodos de criba utilizados para detectar residuos de medicamentos veterinarios en los productos de origen animal, especialmente leche y tejidos, se basaban principalmente en pruebas de inhibición microbiana, y se conocen como ensayos microbiológicos o de inhibición bacteriana (Mitchell, Griffiths, McEwen, McNab y Yee, 1998). Estos métodos permiten detectar la presencia de numerosos compuestos antimicrobianos, pero carecen de especificidad al no discriminar entre

sustancias de una misma familia terapéutica (Aerts, Hogenboom y Brinkman, 1995).

Entre las ventajas de estos métodos podemos señalar que pueden procesar muchas muestras simultáneamente, requieren pequeñas cantidades de muestra, reducido equipamiento, y el coste es relativamente bajo (Nouws y *col.*, 1999). Los principales inconvenientes de estos métodos son que requieren largos periodos de incubación (cultivos) por lo que la presentación de resultados es lenta, así como su falta de poder de discriminación entre diferentes grupos de antimicrobianos y su escasa capacidad para detectar metabolitos microbiológicamente inactivos (Okerman, van Hoof y Debeuckelaere, 1998; Dey, Reamer, Thaker y Thaler, 2005). Además, la presencia de sustancias inhibidoras puede afectar a la exactitud del análisis, por lo que la etapa de preparación de la muestra puede ser problemática, especialmente en la miel, ya que este tipo de matriz presenta propiedades antimicrobianas y antibacterianas *per sé*.

### 5.3.3. Métodos cromatográficos. Cromatografía en capa fina

Además de los descritos anteriormente (GC y LC), se han aplicado otros métodos cromatográficos para la determinación de antibióticos en alimentos. Entre los métodos desarrollados para llevar a cabo el análisis múltiple de antibióticos de diversa polaridad en concentraciones ultratraza, destaca la cromatografía en capa fina (TLC, del inglés "*thin layer chromatography*") y su análogo, la cromatografía en capa fina de alta resolución (HPTLC, del inglés "*high performance thin layer chromatography*"). El proceso operativo requiere habitualmente de la extracción del analito de la matriz alimentaria, derivatización en ocasiones, purificación y preconcentración de la muestra, depositándola en una placa de gel de sílice o un cromatofolio, utilizando como fase móvil un disolvente orgánico. La fase móvil asciende a través de la capa fina por efecto de la capilaridad, y en su ascenso arrastra a los distintos componentes de la muestra, arrastrando mejor aquellos que interaccionen más con la fase móvil (**Figura I.11**).

Cuando el frente de la fase móvil llega hasta el borde superior de la capa fina, ésta se saca del recipiente, se deja evaporar el eluyente, y se identifican los distintos componentes de la muestra.

La variable cualitativa de la cromatografía en capa fina es el parámetro  $R_f$ , cociente entre la distancia recorrida por un componente de la muestra y la distancia recorrida por el frente del eluyente (disolvente). El valor de  $R_f$  permite identificar los analitos en una muestra desconocida; simplemente hay que cromatografiar, en la misma placa, la muestra y un patrón que contenga todos los analitos (si se desconoce cuál es el  $R_f$  de cada analito, en la placa se aplicará la muestra y una serie de patrones por separado, cada uno conteniendo a un analito).

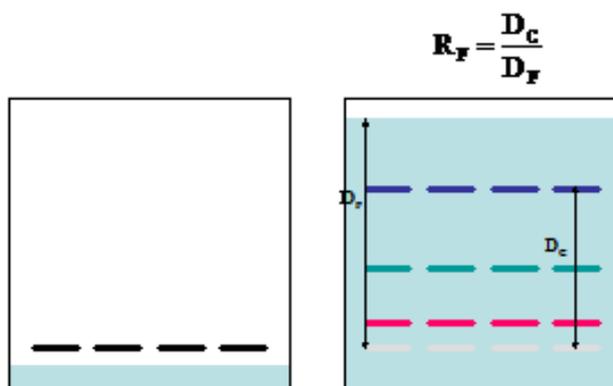


Figura I.11: Cromatografía en capa fina.

#### 5.3.4. Métodos inmunoquímicos

Entre las técnicas analíticas desarrolladas para estos propósitos se encuentran las inmunoquímicas (IA), que ya han comenzado a jugar un papel relevante en el *screening* de contaminantes orgánicos, como lo demuestran las diferentes revisiones aparecidas (Pastor-Navarro, Maquieira y Puchades, 2009; Suri y col., 2009; Zhang y Wang, 2009; Kim y col., 2011; Conzuelo y col., 2013)

Las principales razones de este auge se deben a la existencia de una extensa variedad de formatos, mayor número de reactivos y sobre todo, a su mayor distribución y acceso comercial. La determinación de residuos de

sustancias con actividad farmacológica mediante técnicas inmunoquímicas evita los largos periodos de incubación propios de los métodos de inhibición microbiológica, y es una alternativa que complementa, y en algunos aspectos supera, a las técnicas cromatográficas de referencia. Sin embargo, los inmunoensayos no quedan exentos de ciertos inconvenientes relacionados con la dificultad de su desarrollo, la estabilidad de los inmunorreactivos y la reproducibilidad e interferencia de compuestos con estructura similar. Además, son métodos unianálisis, lo que dificulta el análisis simultáneo de una familia de compuestos o sustancias de diferentes familias. Actualmente, muchas investigaciones se dirigen hacia la resolución de todas estas limitaciones y los resultados que se van obteniendo auguran soluciones viables a corto plazo (Lee y Kennedy, 2001; Kim y col., 2011).

## 6. INMUNOENSAYOS

Lo que hoy se conoce como técnicas inmunoquímicas o inmunoensayos tienen su origen en el área de la química clínica, y engloban todas aquellas herramientas analíticas que utilizan como principio básico la interacción anticuerpo-antígeno (Ab-Ag). En muchos casos, esta interacción es reversible, y está gobernada por la ley de acción de masas; en ella intervienen fuerzas electrostáticas, puentes de hidrógeno e interacciones hidrofóbicas y de Van der Waals.

El primer IA cuantitativo, un radioinmunoensayo (RIA) para el análisis de insulina humana a niveles de picogramos, fue descrito por Yalow y Berson en 1961. El desarrollo de los RIA abrió la posibilidad de que la reacción Ag-Ab pudiera ser utilizada como base para el desarrollo de nuevos métodos analíticos de alta sensibilidad y selectividad. Así, en la década de los 70, Ercegovich (1971) sugirió el empleo de métodos inmunoquímicos para el *screening* de residuos de plaguicidas, que sirvió de base para el desarrollo del primer radioinmunoensayo para los insecticidas aldrín y dieldrín (Langone y Van Vunakis, 1975), al que le siguieron otros basados en el mismo principio.

Sin embargo, la peligrosidad inherente al uso de isótopos radioactivos hacía necesario que los ensayos se realizaran en laboratorios especialmente equipados, lo que suponía un gran inconveniente. La solución definitiva a la intensa búsqueda de IA no radioactivos vino propiciada por la demostración de que las enzimas podían ser acopladas a Ab y Ag (Avrameas y Uriel, 1966), y por la observación de que los Ab y Ag podían ser fácilmente inmovilizados sobre soportes plásticos (Engvall y Perlmann, 1971), lo que propició el desarrollo de una nueva técnica conocida como ELISA (*Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay*).

Esta aportación, junto a la realizada por Hammock y Mumma en 1980, supuso la génesis del desarrollo de numerosos inmunoensayos enzimáticos (EIA) para una gran variedad de plaguicidas, aumentando espectacularmente su aceptación a partir de 1988 (Zulin y *col.*, 2002; Viñas y *col.*, 2002; Tadeo y *col.*, 2002; Caballo-López y Luque de Castro, 2003, Goto y *col.*, 2003; Piao y *col.*, 2009; Kim y *col.*, 2011; Wang y *col.*, 2013).

#### 6.1. COMPONENTES CLAVE DE LOS INMUNOENSAYOS

Las técnicas inmunoquímicas utilizan como reactivo principal los anticuerpos, que son proteínas que se producen en el sistema inmunológico de los animales vertebrados, en respuesta a la presencia en el organismo de moléculas o cuerpos extraños, uniéndose a estos agentes invasores neutralizando su actividad. Los anticuerpos se caracterizan por presentar sitios de reconocimiento que les permiten establecer interacciones altamente específicas con los antígenos, cuya extensión depende de la intensidad de la interacción antígeno/anticuerpo.

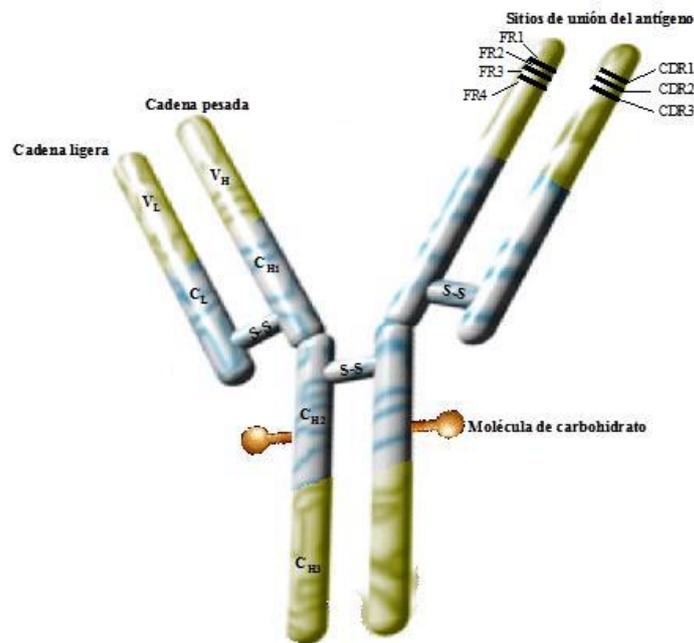
Los anticuerpos utilizados en los inmunoensayos son proteínas globulares (Ig) pertenecientes al grupo de las  $\gamma$ -globulinas, cuya masa molecular oscila entre 150.000 y 900.000 daltons. El 70-75% de las inmunoglobulinas del suero humano son inmunoglobulinas del tipo G (IgGs), con la estructura típica en forma de Y (**Figura I.12**).

Básicamente, las IgGs están compuestas por la asociación de cuatro cadenas polipeptídicas unidas entre sí mediante puentes disulfuro. Dos de las cadenas se denominan pesadas (H) y son idénticas, mientras que las

otras dos son ligeras (L) y también iguales; así pues, los anticuerpos son moléculas bifuncionales, es decir, poseen dos sitios de reconocimiento para el antígeno.

Fundamentalmente, las IgGs se dividen en dos regiones: (1) dominios de unión, responsables de la interacción con los antígenos y conocidas también como región variable (V) y (2) dominios efectores, que sirven de anclaje a los receptores de determinadas células y cuya secuencia de aminoácidos se mantiene constante (C) para cada especie animal.

Los sitios de reconocimiento específicos y activos del anticuerpo (parátomos) hacia el antígeno (epítipo) se forman por la asociación de fragmentos de la región variable de las cadenas H y L en el extremo amino terminal. Las regiones variables de ambas cadenas se organizan en tres regiones hipervariables o determinantes de complementariedad (CDRs), separadas por cuatro regiones estructurales (FR).



**Figura I.12:** Estructura básica de las inmunoglobulinas G (IgGs). V<sub>L</sub> región variable de la cadena ligera; V<sub>H</sub> región variable de la cadena pesada; CDR1, CDR2, CDR3 regiones hipervariables; FR1, FR2, FR3, FR4 regiones estructurales; C<sub>L</sub> región constante de la cadena ligera; C<sub>H1</sub>, C<sub>H2</sub>, C<sub>H3</sub> regiones constantes de la cadena pesada.

La modificación de la secuencia de aminoácidos ocurre dentro de las CDRs, lo que determina la enorme diversidad de anticuerpos, mientras que las regiones FR están más conservadas. En el extremo C-terminal de la molécula -porción de anticuerpo que contiene el fragmento cristalizable-, las cadenas pesadas (Fc) poseen una molécula de carbohidrato como grupo prostético (supone un contenido entre el 2-14%), responsable de algunas funciones biológicas importantes.

Se denomina antígeno a toda sustancia que tras ser inyectada en un organismo vertebrado induce la síntesis de un Ab específico. Así, los Ags son básicamente macromoléculas, por ejemplo proteínas, polisacáridos, ácidos nucleicos o incluso polímeros sintéticos.

Por otro lado, los haptenos son pequeñas moléculas, como los antibióticos, que por sí mismas no son capaces de inducir una respuesta inmune, pero que conjugadas a una macromolécula provocan y estimulan la producción de anticuerpos.

### **6.1.1. Producción de anticuerpos**

La producción de Abs se realiza fundamentalmente inmunizando animales de sangre caliente, como por ejemplo conejos, cabras, ratones o pollos (Hock y *col.*, 1995a; Liu y *col.*, 2009; Xu y *col.*, 2009).

Los anticuerpos aislados de muestras de sangre de animales inmunizados son por naturaleza policlonales (pAbs); consisten en una población heterogénea de inmunoglobulinas, algunas de las cuales reconocen los sitios antigénicos o epítopos del inmunógeno.

Por otro lado, los anticuerpos monoclonales (mAbs) son poblaciones homogéneas de inmunoglobulinas secretadas por clones de una célula de hibridoma, resultado de la fusión de una célula de mieloma inmortal con un linfocito B procedente de un animal inmunizado (Kölher y Milstein, 1975), garantizando la tecnología del hibridoma la producción ilimitada de mAbs con propiedades constantes (Hock y *col.*, 1995b). Sin embargo, la producción de mAbs necesita un equipamiento especial, material y medios de cultivo celulares bastante caros, además de personal altamente cualificado, por lo que en la mayoría de IAs se emplean pAbs.

Una tercera posibilidad surge de las aportaciones de la Biología Molecular y los avances en las técnicas de Ingeniería Genética, que han propiciado el desarrollo de anticuerpos recombinantes (rAb). Esta tecnología permite la expresión de regiones funcionales de los Abs en sistemas huésped -relativamente simples y baratos-, así como la modificación de las propiedades de unión del Ab por manipulación genética a nivel del ADN. Así, se pueden obtener nuevos Abs con diferentes propiedades de unión mediante nuevas inmunizaciones.

Aunque para producir rAbs se han utilizado como sistemas huésped levaduras, plantas y células de insectos, la técnica más extendida se basa en el empleo de la bacteria *Escherichia coli* (Hall y col., 1997; Kim y col., 2003; Brun y col., 2004; Choia y col., 2006), por lo que a los rAbs también se les llama Abs coliclinales.

En resumen, la producción de anticuerpos es, en la mayoría de los casos compleja, y comprende principalmente las siguientes etapas: (1) selección de la molécula de interés analítico, (2) diseño y síntesis del hapteno, que consiste en la preparación de un derivado de la molécula objeto de análisis, que contenga un grupo funcional apropiado para su unión a proteínas, (3) unión covalente del hapteno a la proteína deseada y, finalmente, (4) la inmunización del animal en función del anticuerpo deseado.

En los últimos años, también se han utilizado anticuerpos sintéticos conocidos como polímeros de impronta molecular (*molecularly imprinted polymers*, MIPs) (Kandimalla y Ju, 2004; Ye y Haupt, 2004). Se sintetizan mediante la polimerización de monómeros 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, coste, tiempo y reproducibilidad en la síntesis, capacidad de carga de muestra y vida útil.

Además, algunos de estos polímeros presentan elevada selectividad y afinidad, comparable 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 (Walsh, 2000; Luliński, 2013).

Los MIPs se han usado ampliamente en la determinación de residuos de antibióticos utilizando ensayos tipo ELISA, cromatografía de inmunoafinidad e inmunosensores (Schirmer y Meisel, 2006; Chianella y *col.*, 2013; Urraca, Castellari, Barrios y Moreno-Bondi, 2014).

Básicamente, son dos los elementos esenciales a tener en cuenta en el desarrollo de técnicas inmunoquímicas.

Por una parte, los reactivos, que incluyen a los anticuerpos, antígenos y a cualquier otra especie biológica o química utilizada para la visualización de la reacción Ab-Ag.

Por otra, los formatos, cuya elección estará condicionada al papel, lugar de utilización y uso final que tenga que desempeñar el método, es decir, de alta o baja capacidad de ensayo, método de campo o de laboratorio, cualitativo o cuantitativo.

## 6.2. TIPOS DE INMUNOENSAYOS

Existen diferentes tipos de inmunoensayos y su clasificación resulta bastante compleja debido a la amplia variedad de criterios que se pueden emplear. Además, la terminología empleada por los especialistas no es uniforme generando confusiones, en parte debido a la gran variedad de diseños posibles de inmunoensayos (Gosling, 1990).

En general, los inmunoensayos se clasifican: (1) en función del modo de operación, inmunoensayos competitivos y no competitivos; (2) según las fases en que se realiza la interacción Ag-Ab, inmunoensayos homogéneos y heterogéneos; (3) en función del marcador y método de detección, inmunoensayos enzimáticos, radioinmunoensayos, fluoroinmunoensayos, etc.

A continuación se describen los principales formatos de inmunoensayo utilizados en diferentes campos de aplicación: clínico, medioambiental y agroalimentario.

### 6.2.1. Inmunoensayos competitivos y no competitivos

Un ensayo competitivo puede ser descrito por la siguiente reacción inmunoquímica:



Donde el antígeno libre (Ag) compite con un antígeno marcado (Ag\*) por un número fijo y limitado de sitios de unión del anticuerpo (Ab). La extensión de la unión Ab-Ag\* depende de la concentración de Ag libre. A mayor concentración de analito (Ag libre), menos Ag\* se une al Ab, permitiendo la cuantificación de la concentración del analito (Ag libre). Basados en este concepto general, existen dos modos de operar:

*a) Ensayo directo:* donde el anticuerpo compite con el analito y un hapteno marcado con una especie fácilmente detectable (por ejemplo, una enzima).

*b) Ensayo indirecto:* donde la extensión de la unión Ag-Ab se mide habitualmente utilizando un segundo anticuerpo específico (anticuerpo secundario), marcado con una especie fácilmente detectable.

Los formatos de ensayo no-competitivos, son habitualmente utilizados en las determinaciones de moléculas de gran tamaño que poseen más de un epitopo o determinante antigénico (por ejemplo, una bacteria). En estos ensayos se emplea un sistema de dos anticuerpos específicos, de modo que uno de ellos sirve para “fijar” el antígeno al soporte sólido. Tras un proceso de lavado y eliminación de las fracciones no unidas, se adiciona el segundo anticuerpo específico que sirve para cuantificar la extensión de la reacción.

Los ensayos no-competitivos son generalmente más sensibles que los correspondientes ensayos competitivos, sin embargo, este tipo de ensayo no es adecuado para moléculas de bajo peso molecular, como es el caso de las sustancias con actividad farmacológica, objeto de estudio en la presente Tesis.

### 6.2.2. Inmunoensayos homogéneos y heterogéneos

Los inmunoensayos homogéneos no requieren la separación entre las fracciones de inmunorreactivos libres y unidas. Utilizan el cambio de señal producido cuando el antígeno marcado se une al anticuerpo. Esa variación en la señal se debe a un cambio de la actividad del marcador y puede ser utilizada para cuantificar la cantidad de analito. Este tipo de ensayos presenta la ventaja de requerir tiempos de análisis más cortos, ya que no son necesarias etapas de lavado. En contrapartida, hay que señalar que la sensibilidad es menor y el efecto matriz de las muestras más elevado.

En los ensayos heterogéneos, existe una separación física entre las fracciones unidas y libres. Aunque este formato de ensayo incluye un mayor número de etapas, debido a los procesos secuenciales de lavado que deben realizarse para eliminar los componentes que no han reaccionado, el efecto matriz es menor. Por lo general, mejoran la sensibilidad y los límites de detección. Los ensayos inmunoenzimáticos, especialmente en formatos ELISA, son un ejemplo de este tipo de ensayos, cuyos fundamentos se comentan a continuación.

### 6.2.3. Inmunoensayos en formato ELISA

La mayoría de los inmunoensayos para la determinación de sustancias con actividad farmacológica, en muestras de alimentos, utilizan la técnica ELISA: cefalosporinas (Thal y *col.*, 2011), penicilinas (Usleber, Lorber, Straka, Terplan y Märthbauer, 1994),  $\beta$ -lactámicos (Grubelnik, Padeste y Tiefenauer, 2001), sulfonamidas (Märthbauer, Usleber, Schneider y Dietrich, 1994), estroptomicina (Schnappinger, Usleber, Märthbauer y Terplan, 1993). Se trata de un ensayo heterogéneo en fase sólida que utiliza una enzima como especie marcadora, y donde uno de los inmunorreactivos está fijado (generalmente adsorbido) en la superficie de un tubo de ensayo o en los pocillos de una placa ELISA. Las configuraciones más usuales en este tipo de ensayos son las siguientes:

#### 6.2.3.1. *ELISA competitivo directo (CD)*

*a)* Formato de anticuerpo inmovilizado (AI): en este caso se establece un equilibrio entre el anticuerpo unido a la fase sólida (por adsorción directa o mediante reactivos orientadores), el analito y un conjugado analito-enzima (trazador enzimático) que están en disolución. Tras una etapa de incubación, los reactivos no unidos son eliminados por lavado, midiendo por último la señal emitida por el trazador enzimático unido al Ab. La disminución de la actividad enzimática es directamente proporcional a la cantidad de analito presente en la muestra.

*b)* Formato de antígeno inmovilizado: este formato está basado en la competición entre el antígeno inmovilizado (usualmente derivatizado y unido a una proteína, denominado conjugado de tapizado) y el analito, por una cantidad fija de anticuerpo marcado.

#### 6.2.3.2. *ELISA competitivo indirecto (CI)*

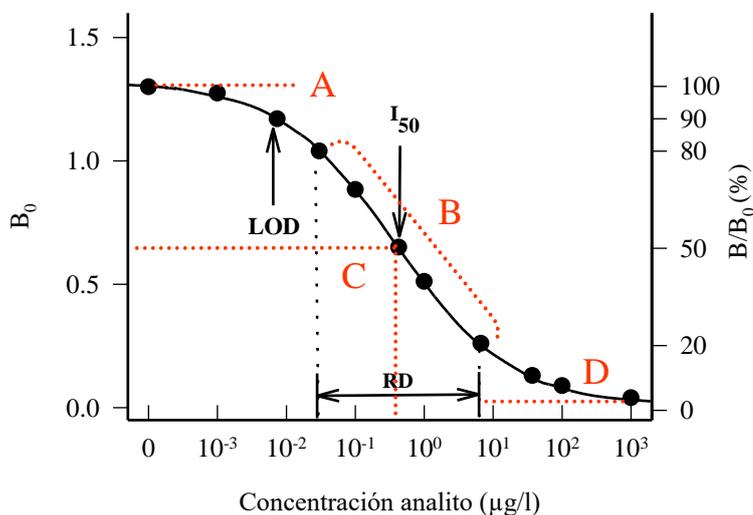
El fundamento es el mismo que el del formato de antígeno inmovilizado, pero en este caso la concentración del analito se mide indirectamente, utilizando un segundo anticuerpo unido covalentemente a una enzima.

#### 6.2.3.3. *ELISA sandwich*

En este ensayo se utiliza un segundo anticuerpo marcado para detectar la interacción entre el analito y el anticuerpo unido a la fase sólida. Sin embargo, esta configuración es restrictiva para analitos con más de un sitio de unión de anticuerpo, por lo que no es utilizada en el caso de los productos fitosanitarios.

### 6.2.4. **Características de los inmunoensayos competitivos**

En los IAs competitivos en fase heterogénea, la cantidad de marca unida a la fase sólida (señal) es inversamente proporcional a la del analito objeto de análisis (**Figura I.13**). Cuando se representa la señal obtenida frente al logaritmo de la concentración de analito, se obtiene una curva de calibrado típica dosis-respuesta que presenta una pauta sigmoide.



**Figura I.13:** Curva sigmoide típica dosis-respuesta.

En este caso, el ajuste matemático de la curva de calibrado obtenida para diferentes concentraciones de analito, responde a la siguiente ecuación (Raab, 1983):

$$\text{Señal} = \frac{A - D}{1 + (x/C)^B} + D$$

donde  $A$  representa la asíntota máxima, que corresponde a la señal en ausencia de analito;  $D$  es la asíntota mínima y corresponde a la señal en exceso de analito;  $B$  es la pendiente de la curva en el punto de inflexión;  $x$  es la concentración de analito; y  $C$ , el valor de la concentración de analito en el punto de inflexión. Este punto es utilizado para estimar la sensibilidad del inmunoensayo ( $I_{50}$ ) (Grojtan y Keel, 1996).

Los parámetros más característicos de la curva de calibrado son los siguientes: señal en ausencia de analito ( $B_0$ ); señal debida a los estándares ( $B$ ); límite de detección (LOD), que corresponde a la menor concentración de analito que produce una señal distinguible de la correspondiente a  $B_0$

para una determinada muestra, y con cierto grado de confianza. Con frecuencia se define como la concentración de analito que reduce el 10-20% de los sitios específicos de unión de anticuerpo y se calcula restando al valor de  $B_0$  tres veces la desviación estándar (Hennion y Barceló, 1998). La  $I_{50}$  es la concentración de analito que reduce el 50% de los sitios específicos de unión del anticuerpo y el intervalo de trabajo (RD) el rango de concentración de analito que reduce los sitios de unión específicos del anticuerpo entre el 20-80%. Dentro de este intervalo, las variaciones de señal se relacionan linealmente con la concentración de analito y pueden obtenerse resultados cuantitativos en muestras reales con relativa precisión (Brady, 1995)

Por otro lado, los IAs también se caracterizan por su alta selectividad. Así, la selectividad de un anticuerpo se define como la capacidad para reconocer exclusivamente un determinante antigénico. En este sentido, un anticuerpo es específico cuando sustancias con estructura y composición semejante al analito no son reconocidas. La selectividad o reactividad cruzada (RC) se determina, habitualmente, comparando la  $I_{50}$  dada por el analito de interés con las obtenidas con otros compuestos de estructura similar.

Este parámetro se calcula mediante la siguiente ecuación:

$$RC = \frac{I_{50} \text{ (analito)}}{I_{50} \text{ (interferente)}} \times 100$$

Cuando el valor RC es menor del 10% se considera que el anticuerpo es específico, y si es menor del 1% muy específico.

El hecho de que un Ab muestre un valor elevado de RC (baja selectividad) hacia compuestos relacionados estructuralmente con el analito, es considerado como una desventaja. Sin embargo, ese Ab puede ser utilizado para propósitos de *screening*, obteniendo así un valor global para una familia de compuestos.

### 6.2.5. Formatos inmunoquímicos aplicados al análisis de antibióticos

Desde hace algunos años se vienen comercializando kits de inmunoensayo para la determinación de residuos de sustancias con actividad farmacológica mediante inmunoensayo en aguas y alimentos. Estos kits comerciales están basados en los principios de la técnica ELISA, generalmente en formato de Ab inmovilizado; pueden ser cualitativos, semicuantitativos o cuantitativos y difieren en los formatos de presentación -tubos de ensayo, placas de 96 pocillos, tiras reactivas, etc-. Además, permiten la determinación rápida y simultánea de un elevado número de muestras, lo que unido a su fácil transporte, precisión y sensibilidad, hacen que su uso sea ideal para análisis en campo o en línea de fabricación (Gaudin, Rault y Verdon, 2012; Dmitrienko, Kochuk, Apyari, Tolmacheva y Zolotov, 2014).

Los kits comerciales ofrecen rapidez cuando se emplean en matrices acuosas; sin embargo, estos métodos presentan dificultades cuando se aplican a matrices más complejas, como la miel, debido a la aparición de efectos matriz, por lo que la mayoría de las muestras no pueden analizarse sin tratamiento previo.

Generalmente, las muestras de alimentos presentan una amplia variabilidad en su composición, contenido en azúcares y lípidos, etc. Hay que tener en cuenta que los componentes proteínicos, así como los taninos o polifenoles, pueden unirse o interferir en las reacciones entre el Ab y el trazador enzimático.

Basados en técnicas inmunoquímicas y en respuesta a la creciente necesidad de disponer de métodos analíticos portátiles y que permitan el análisis, especialmente rápido, de sustancias con actividad farmacológica con un tratamiento de muestra mínimo, se están desarrollando otras metodologías centradas en la puesta a punto de inmunoensayos en flujo lateral (LFIA).

### 6.2.6. Inmunoensayos en flujo lateral

Los inmunoensayos de nueva generación entre los que se engloban los LFIA, son métodos de screening diseñados, principalmente, para ser asistidos por un operador y para muestras discretas. La mayoría de estos métodos están pensados para dar respuesta binaria rápida (sí/no), por lo que se ha de pensar también en un tratamiento de muestra simple, además de eliminar el uso de equipamiento costoso. Existen formatos de ensayo operativamente simples y prácticos entre los que destacan los desarrollados en membranas en formato de tiras reactivas.

Las tiras presentan ventajas frente a otros formatos de campo, como por ejemplo los kits en placa o tubo. Esencialmente son más económicas, más versátiles -ya que en un mismo soporte se pueden determinar varios analitos si las zonas de reacción se separan convenientemente-, pueden llevarse a cabo ensayos cualitativos o cuantitativos, la sensibilidad alcanzada puede ser mayor y, sobre todo, son operativamente más simples y cómodas. Generalmente no requieren el empleo de reactivos o equipamiento adicional y son ampliamente utilizados en química clínica, por lo que se dispone de mucha información técnica.

Otro aspecto a considerar es la difusión de los analitos y la velocidad de reacción con el inmunorreactivo inmovilizado. En general, estos dispositivos tienen dimensiones mucho menores que una microplaca, los tamaños de las microgotas son del orden de 1 a 100  $\mu\text{m}$  y por tanto, las distancias a recorrer por los analitos son muy pequeñas y los tiempos de equilibrio mínimos.

Así, Burke (1988) ha estimado que una proteína, con un coeficiente de difusión de  $5 \cdot 10^{-7} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ , necesita sólo 20 segundos para recorrer una distancia de 100  $\mu\text{m}$ . Esta difusión tan rápida da lugar a tiempos de reacción cortos, del orden de minutos.

A mediados de los años 70 empezaron a desarrollarse inmunoensayos sobre membranas para solventar los inconvenientes exhibidos por los IAs convencionales en placa y tubo, que se han aplicado en el control de bacterias, toxinas, virus, residuos de medicamentos veterinarios, micotoxinas y plaguicidas (Ngom, Guo, Wang y Bi, 2010).

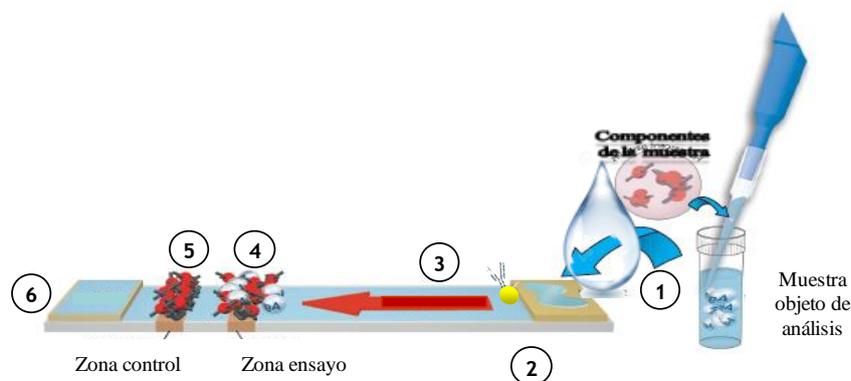
Los métodos más comunes de evaluación se basan en determinaciones visuales, donde se lleva a cabo una estimación cualitativa (cambio de color) o semicuantitativa (comparación con una carta de color). También pueden realizarse determinaciones cuantitativas utilizando medidas instrumentales (reflectometría o fotometría).

Si bien en el área de ensayos rápidos soportados sobre membranas se han desarrollado una amplia y variada gama de formatos de IA basados en los principios de la aglutinación, inmunoconcentración (*flow-through*), películas multicapa e inmunoadsorción específica (dipstick), los avances más recientes han permitido el desarrollo de diferentes ensayos basados en la inmunocromatografía (*lateral flow*).

Para el desarrollo de estos dispositivos en formato competitivo típico, se inmovilizan en distintas zonas de la membrana (**Figura I.14**): el ligando específico unido a un marcador para visualizar la extensión de la reacción (*posición 2*), el de captura (analito o hapteno-proteína, *posición 4*) y un control (Ab secundario frente a la fracción constante Fc del Ab específico, *posición 5*) capaz de enlazarse al Ab específico, bloqueando posteriormente el soporte con un agente adecuado -proteínas- para evitar uniones inespecíficas.

Una vez configurado el sistema de detección, se procede a realizar el ensayo como sigue: la muestra a analizar se deposita en la zona de siembra de la muestra (*posición 1*), y fluye por capilaridad hasta la posición 2 donde se encuentra inmovilizado el ligando específico (Ab) marcado.

Al pasar la muestra solubiliza al ligando específico, y en caso de contener la muestra analito, se une a la fracción variable del ligando formando inmunocomplejos.

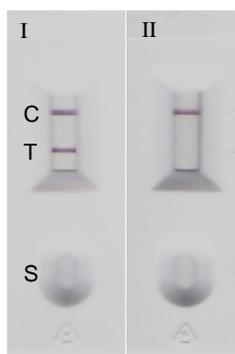


**Figura I.14:** Estructura básica y modo operativo de una tira reactiva en flujo lateral. (1) zona de depósito de muestra, actúa como prefiltro reteniendo partículas de la muestra que pueden inhibir el flujo o provocar interferencias en el ensayo; (2) zona para el anticuerpo específico (primario) marcado, que reacciona con la muestra si contiene sustancias específicas frente a ese anticuerpo, uniéndose por los sitios de reconocimiento (región variable) de dicho anticuerpo; (3) dirección de avance o flujo de la muestra; (4) zona de ensayo donde se encuentra inmovilizado un ligando de captura, bien la sustancia a determinar si tiene un tamaño adecuado o bien, un conjugado (hapteno-proteína) análogo a la sustancia a determinar; (5) zona de control de ensayo que contiene un Ab secundario capaz de enlazarse a la fracción constante al Ab específico; (6) zona de absorbente o de parada que impide que la muestra siga fluyendo.

Al añadir la disolución de la muestra a analizar, se deposita dejando que fluya a lo largo de las distintas partes del sistema, de tal manera que en un primer momento la muestra reacciona con el anticuerpo primario que está marcado con el trazador (por ejemplo oro o selenio coloidal, latex, carbón, etc.), de tal manera que el anticuerpo primario es liberado y solubilizado. Durante la migración, en función de la concentración de analito presente en la muestra, éste se une en mayor o menor extensión al anticuerpo primario específico. De tal manera que si la concentración de analito es elevada (**Figura I.15**), los centros de reconocimiento del anticuerpo (molécula bifuncional), estarán bloqueados y cuando el frente pase por la zona en la cual se encuentra inmovilizado el conjugado (posición

4), éste no será reconocido y por lo tanto no se producirá la aparición de una banda en ese punto. Sin embargo, el anticuerpo primario específico sigue fluyendo y reacciona con el anticuerpo secundario específico uniéndose por la fracción constante (*posición 5*), de tal manera que se visualiza una banda debida a esa unión, confirmando un resultado positivo.

En cambio, si la concentración de analito en la muestra es baja o no contiene analito, los centros de unión -o gran parte de ellos- quedarían libres y al solubilizarse y fluir hasta la zona donde se encuentra el conjugado (*posición 4*) se uniría al mismo, dando como resultado la aparición de una banda, mientras que el anticuerpo primario específico, al igual que en caso anterior, reaccionaría con el anticuerpo secundario específico por la fracción constante, dando como resultado global la aparición de dos bandas, una debida al control y la otra debida a la zona de ensayo, y por lo tanto, siendo el ensayo negativo frente al antibiótico a detectar.



**Figura I.15:** Interpretación de resultados en un inmunoensayo en flujo lateral. (I) resultado negativo, aparecen dos líneas T-ensayo y C-control; (2) resultado positivo, aparece una línea correspondiente al control. Si no aparecen líneas, el ensayo se consideraría nulo.

#### 6.2.6.1. Aspectos a tener en cuenta en el desarrollo de tiras reactivas

El criterio de selección del tipo de tira a desarrollar vendrá determinado por la naturaleza de la muestra a analizar, así como de una serie de factores: sensibilidad, sistema de detección, cantidad de Ab o proteína requerida para la conjugación, formato, tamaño, tipo de

membrana, facilidad de preparación y/o conjugación, y reproducibilidad y estabilidad de los inmunorreactivos, que han de ser previamente definidos y optimizados.

Así, el desarrollo de tiras reactivas conlleva resolver diferentes aspectos como: selección de soportes, modo de inmovilización de los reactivos, formato de ensayo, sistema de aplicación de los reactivos, selección de trazadores y modo de detección, optimización de las variables, aplicación a muestras reales, validación, y finalmente, estudio de la vida útil de todos los componentes, reactivos especialmente.

El primer paso a considerar es la selección de la fase sólida donde va a tener lugar la reacción de bio-reconocimiento. Los soportes, generalmente membranas, son comerciales y a la hora de seleccionar unas u otras, hay que evaluar sus propiedades físicas (tamaño de poro y humectabilidad) y químicas (composición, capacidad de adsorción, derivatización y polaridad). En esta memoria se ha utilizado membrana de nitrocelulosa para la adsorción de varios inmunorreactivos en zonas diferentes, facilitando el flujo lateral de los reactivos.

Otro aspecto a considerar es la inmovilización y aplicación de reactivos, que va a influir en las prestaciones analíticas del dispositivo, es decir, sensibilidad y especificidad (Brogan, Shin, y Schoenfisch, 2004). Cuando se inmovilizan anticuerpos es aconsejable hacerlo de forma orientada con el fin de facilitar la interacción Ab-Ag, aumentando así la actividad y sensibilidad. Para inmovilizar los anticuerpos al soporte pueden seguirse dos estrategias: directa o indirecta (*ver sección 6.2.3*). En la inmovilización indirecta participan proteínas de captura como IgGs de diferentes especies, proteínas bacterianas (A/G/H), sistema avidina/biotina o lectinas, que, unidas de forma estable al soporte, permiten la inmovilización del anticuerpo. En la inmovilización directa los anticuerpos se unen mediante fuerzas no-covalente o covalente, participando fuerzas hidrófobas principalmente en la unión no-covalente (Tijssen, 1985).

Seleccionado el procedimiento de inmovilización, se debe escoger un sistema adecuado para aplicar los inmunorreactivos. Este puede ser automatizado (continuo) o manual (discontinuo), y la elección dependerá

fundamentalmente de la cantidad de tiras a desarrollar y de los recursos económicos disponibles. La calidad y prestaciones del producto final normalmente no depende del sistema utilizado y no tiene incidencia en los reactivos o membrana requeridos, aunque en sistemas discontinuos se requieren membranas del tamaño de una cuartilla (10 x 35 cm) lisas y no demasiado rígidas, por lo que no es adecuado el empleo de soportes plásticos. En los sistemas continuos, las membranas van enrolladas y tienen una anchura de 3 cm y una longitud de unos 50 a 150 m. En general, el equipamiento utilizado en sistemas de deposición discontinua tiene un coste aproximado de 1.800 €, muy inferior al precio de un dispositivo de deposición en continuo (16.850 €).

En resumen, la etapa de deposición de inmunorreactivos en la membrana es una etapa fundamental para el buen desarrollo del IA, de modo que esta debe ser reproducible, con el fin de que la densidad de la especie inmunorreactiva presente en la membrana sea constante.

Seleccionado el sistema de deposición deben optimizarse los protocolos de aplicación de reactivos. Algunas de las variables a considerar son: tamaño de gota o línea, superficie a recubrir, espesor de la zona reactiva, concentración de inmunorreactivos, uniformidad en las deposiciones, etc.

Otro punto a tener en cuenta es el trazador a utilizar. Para el desarrollo de tiras reactivas es deseable un trazador cuyo producto de reacción o él mismo queden fijados en la superficie de la membrana. Para ello caben tres alternativas. Una de ellas es utilizar enzimas cuyo producto de reacción con el sustrato genere un precipitado. Aunque esta propiedad es rara, existen algunos sustratos para HRP y fosfatasa alcalina que la presentan. Uno de ellos es el BCIP (5 bromo-4-cloro-3- indoil fosfato) en presencia de NBT (azul de tetrazolio).

Este tipo de sustratos tienen la ventaja de la visualización directa por el analista, lo que simplifica mucho los ensayos. No obstante, requiere tiempos de incubación de 10 minutos y la observación directa solo es adecuada cuando las diferencias de color son importantes -concentración de analito elevada, como ocurre en muchos ensayos clínicos, en donde los analitos están en concentraciones del orden de mg/kg-.

Existe otra familia de sustratos interesantes también para fosfatasa alcalina que produce un precipitado luminiscente, localizado en el mismo lugar que la enzima. Estos compuestos son fenilfosfatos derivados de benzimidazoles, benzotiazoles, quinolinas, indolinas o fenantridinas.

Así, el sustrato [2-(5'-cloro-2-fosforiloxifenil)-6-cloro-4(3H)-quinazolinona], comercializado como ELF-97 (Molecular Probes, Inc.), precipita en medio hidroalcohólico en presencia de la enzima dando un producto con fluorescencia amarillo-verdosa que se excita a 388 nm y emite a 530 nm, con una excelente fotoestabilidad y buen rendimiento cuántico. Tiene dos inconvenientes importantes: requerir un medio hidroalcohólico para precipitar y necesitar el uso de un microscopio confocal como detector.

La segunda alternativa consiste en utilizar micropartículas como trazadores. De entre ellas cabe destacar las partículas de latex derivatizadas con diferentes reactivos coloreados y fluorescentes, que por su tamaño pueden visualizarse directamente por el analista. También se ha propuesto utilizar lectores de códigos de barras, al igual que se hace con las etiquetas comerciales (**Figura I.16**).

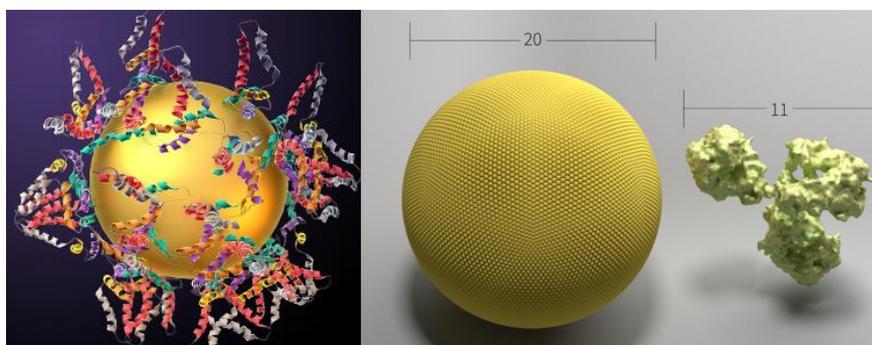


**Figura I.16:** Lector colorimétrico de tiras reactivas

No obstante, este tipo de trazadores son bastante caros y no suelen dar buenos resultados cuando las concentraciones de analito son bajas.

En su lugar se podrían sustituir las partículas plásticas por coloides metálicos de Au, Ag, Se, Cu, Pt o Fe, siendo los de Au los más populares (**Figura I.17**). Presentan alta capacidad de tinción, aumentando la

visualización con el tamaño de partícula -usualmente entre 10-60 nm-. Requieren baja cantidad de proteína para formar el conjugado, habitualmente se utiliza menos de 1  $\mu\text{g}$  de Ab por ensayo. Sin embargo, los coloides sólo están disponibles en color rojo y son relativamente inestables, siendo complicada su resuspensión una vez secos. Además, las partículas han de ser generadas, ya que no es práctico ni económico adquirirlas. Finalmente, el marcaje reproducible de inmunorreactivos con partículas de oro es bastante difícil, quedando su preparación, en la práctica, en manos de verdaderos especialistas.



**Figura I.17:** Izquierda: partícula coloidal de oro unida a anticuerpos. Derecha: Diferencia de tamaño entre una partícula de oro y un anticuerpo (IgG).

También es posible utilizar partículas magnéticas formadas por núcleos de óxido de hierro ferromagnético, recubiertas con diferentes materiales como vidrio, dextranos o poliestireno, y con tamaños de partícula alrededor de 1  $\mu\text{m}$ . Estas partículas se han utilizado tradicionalmente como soportes de inmovilización, pero pueden servir como trazadores si se dispone de un equipo que permita medir las variaciones de intensidad del campo magnético. Las partículas magnéticas tienen la ventaja de no necesitar sustratos y además, dado su tamaño, pueden inmovilizar cantidades importantes de inmunorreactivos sobre su superficie por simple adsorción, lo que mejora la intensidad de las señales y por tanto, la sensibilidad. Se han desarrollado detectores para estos fines

(Ericomp, San Diego, CA). Son equipos del tamaño de una calculadora de bolsillo y no requieren accesorios sofisticados para su manejo; por otro lado, su respuesta es inmediata, no necesitándose tiempos muertos de incubación.

No obstante, trabajar con partículas magnéticas puede presentar inconvenientes ya que, a veces, muestran cierta memoria magnética y una adsorción inespecífica importante, debido a que su superficie hidrófoba hace que se adhieran a otros materiales de características similares y a las membranas.

La tercera alternativa sería utilizar un cromógeno o un fluoróforo. De ellos, son interesantes los reactivos intrínsecamente fluorescentes o que emiten radiación por algún otro fenómeno fotoquímico. Entre ellos se encuentran los clásicos como fluoresceína, rodamina, etc.

No obstante, para que un reactivo pueda utilizarse como marcador debe cumplir una serie de requisitos: buen rendimiento cuántico, desplazamiento de Stokes importante, emisión a longitudes de onda fuera de la emisión natural de la mayoría de las moléculas, tiempos de decaimiento largos, baja susceptibilidad a los "*quenchers*" naturales, poseer grupos funcionales adecuados para unirse a la molécula a marcar y disponer del detector apropiado. Visto esto, el número de productos que pueden utilizarse se reduce bastante. De ellos destacan compuestos de las familias de las cianinas (también conocidas como polimetinas) y ftalocianinas, como Cy<sub>5</sub>, la Jolla Blue, HDITCP, etc., que emiten en el infrarrojo cercano (500-767 nm) con rendimientos cuánticos entre 0,1 y 0,3 y desplazamientos de Stokes del orden de 15 a 20 nm.

Este tipo de reactivos presenta el inconveniente -si lo que se pretende es desarrollar métodos sencillos- de requerir un fluorímetro para su detección.

#### **6.2.7. Antecedentes del empleo de inmunoensayos para la detección de sulfonamidas**

El empleo de inmunoensayos para el análisis de alimentos ha suscitado el interés de la comunidad científica y las empresas

biotecnológicas, dado el gran volumen de mercado. Presentan propiedades químicas y mecánicas atractivas: bajo coste, alta sensibilidad y especificidad, posibilidad de *screening in situ*, rapidez en la presentación de resultados y facilidad de uso.

Los trabajos pioneros de Avrameas y Uriel (1996), junto con los de Hammock y Mumma (1980), supusieron la génesis del desarrollo de numerosos inmunoensayos enzimáticos para una gran variedad de contaminantes, y la vía para numerosas investigaciones que han dado lugar a diferentes patentes y artículos científicos sobre el empleo de Inmunoensayos para el análisis de muestras ambientales y alimentos.

Así, a finales del siglo XX, aparecen descritos en bibliografía, los primeros inmunoensayos en formato placa para detectar **STZ en miel** (Sheth y Sporns, 1980; Heering, Usleber, Dietrich y Märtilbauer, 1988). Alcanzan sensibilidades en torno a 50 mg Kg<sup>-1</sup>, nivel muy alejado de las actuales recomendaciones de límites máximos de sulfonamidas en miel fijadas por algunos países europeos y por la propia red de laboratorios europeos.

El quipo de investigación de Thomson y Sporns (1995), desarrolló un ELISA utilizando anticuerpos policlonales para detectar STZ en muestras de miel y leche, con un límite de detección próximo a 35 y 12 µg Kg<sup>-1</sup>, respectivamente.

Pastor-Navarro, García-Bover, Maquieira y Puchades (2004), desarrollaron un inmunoensayo específico para STZ, capaz de detectar concentraciones de 0.03 ng g<sup>-1</sup> de STZ en miel, superando en sensibilidad a los otros ensayos descritos hasta la fecha. El mismo grupo de investigación obtuvo un anticuerpo policlonal sensible para seis sulfonamidas, STZ, PSTZ, SMP, SSZ, SP Y SMT, con una IC<sub>50</sub> = 2.5 µg L<sup>-1</sup>, obteniendo buenos resultados de recuperación al aplicarlo a muestras de miel, , (Pastor-Navarro, Gallego-Iglesias, Maquieira y Puchades, 2007).

Si nos fijamos en otras matrices distintas de la miel, el número de ensayos descritos aumenta, destacando principalmente la detección de sulfonamidas en muestras de leche y tejidos hepáticos de cerdo y pollo, y minoritarios los de muestras de huevos y pescado. Los hay específicos para

un solo tipo de analito de la familia de las sulfonamidas como es el ensayo desarrollado por Lee, Holtzapple, Muldoon, Deshpande y Stanker (2001), que desarrollaron un inmunoensayo utilizando un anticuerpo monoclonal para detectar STZ en muestras de hígado de cerdo, con una sensibilidad 100 ng g<sup>-1</sup> y baja reactividad cruzada con otras 13 sulfonamidas.

Franek, Diblikova, Cernoch, Vass y Hruska, (2006), desarrollaron anticuerpos con un amplio espectro de reconocimiento hacia 18 analitos relacionados estructuralmente y funcionalmente con la familia de las sulfonamidas, permitiendo realizar un test multirresiduo con un límite de detección inferior a 36.8 µg L<sup>-1</sup> excepto para sulfacetamida que fue de 65.2 µg L<sup>-1</sup>.

Otro grupo de trabajo, sintetizó un hapteno que les permitió obtener un anticuerpo policlonal contra seis sulfonamidas, con un límite de detección por debajo de los 100 ng mL<sup>-1</sup> que fija la legislación en leche (Zhang, Duan, Wang, Zhang, Wang, 2006).

Un ELISA directo competitivo, fue el diseño realizado por Zhang *y col.*, (2007) para determinar siete sulfonamidas (SSX, STZ, SM, SMP, SPD, SMT, y SCP) en carne de cerdo, hígado, carne de pollo, huevos y pescado, con límites de detección inferiores en todas las muestras a 100 µg Kg<sup>-1</sup>. Estudiaron distintos tipos de extracción, siendo el más complicado el aplicado a muestras de hígado, obteniendo recuperaciones que oscilaban entre 77 y 123 % al nivel de 100 µg Kg<sup>-1</sup>.

Ese mismo año, Berlina, Zherdev, Dzantiev y Sakharov (2007), desarrollaron un ELISA específico para SMP en leche, con un límite de detección de 0.4 ng mL<sup>-1</sup>, muy por debajo del LMR (100 µg L<sup>-2</sup>) fijado por la legislación alimentaria para esta matriz.

Siguiendo esta línea de trabajo, el grupo de investigación de Yang *y col.*, (2007) trabajaron en la producción de un anticuerpo monoclonal para SMTZ, y diseñaron un inmunoensayo que aplicaron al análisis de muestras de leche, estudiando simultáneamente el efecto matriz provocado por la presencia de proteínas en la leche.

Otro trabajo recogido en la bibliografía, es el desarrollo de dos ELISAs en formato directo para detectar cuatro sulfonamidas (SPP, STZ, SMP y

SCP), tanto en leche como en muestras de pelo, usando nanopartículas magnéticas y anticuerpos policlonales, con un nivel de detección de  $5 \mu\text{g L}^{-1}$ , muy inferior al LMR fijado por la legislación ( $100 \mu\text{g L}^{-1}$ ) (Font y *col.*, 2008).

Adrian y *col.*, (2009) desarrollaron un ELISA indirecto para detectar una amplia variedad de sulfonamidas, con valores de  $\text{IC}_{50}$  alrededor de  $3 \mu\text{g L}^{-1}$  para cada uno de los analitos ensayados. Destacar que el ELISA desarrollado es válido para muestras de leche a las que no se les ha realizado ningún pretratamiento.

También para SMTZ, Yang, Ren, Li, y Chen (2010), trabajaron en la producción de un anticuerpo monoclonal y en su aplicación para el desarrollo de un ELISA con el que poder detectar este analito tanto en muestras de leche, miel como orina de cerdo, con una reactividad cruzada por debajo de 0.1 % para la mayoría de compuestos relacionados estructuralmente con SMTZ.

Para determinar residuos de STZ, SDZ, SPD y SMX, a concentraciones inferiores a  $6 \text{ ng mL}^{-1}$ , tanto en muestras de leche como orina de cerdo, Liu y *col.* (2013), obtuvieron un anticuerpo de conejo monoclonal y desarrollaron un ELISA indirecto competitivo.

## 7. VALIDACIÓN

La calidad y la seguridad de los alimentos, junto con los avances en medicina, han contribuido significativamente al incremento de la esperanza y la calidad de vida en los países desarrollados. La seguridad alimentaria se basa, en primer lugar, en la competencia técnica y en la buena praxis de las empresas y los profesionales del sector. Por su parte, la administración debe contribuir mediante el establecimiento de la normativa pertinente y la realización de controles suficientes y de calidad adecuada que garanticen que no se superen los niveles legislados.

En este contexto, los laboratorios de control reciben muestras, aplican las metodologías de análisis que consideran más apropiadas y proporcionan

unos resultados. Estos resultados deben poseer la calidad necesaria para que las autoridades sanitarias, teniendo en cuenta los valores de referencia establecidos, puedan tomar decisiones técnicamente correctas y con la mínima incertidumbre posible.

Es preciso tener en cuenta que de dichas decisiones dependen, por una parte, la seguridad de los consumidores y, por otra, repercusiones económicas para la industria alimentaria, que pueden ser muy elevadas.

Con objeto de garantizar la máxima fiabilidad y comparabilidad de los resultados, los análisis de las muestras tomadas en los controles oficiales deben realizarse en laboratorios cuya competencia técnica haya sido evaluada por un organismo independiente.

Así, los laboratorios deben diseñar, implantar y mantener un sistema de gestión de la calidad conforme a los requerimientos de dicha norma. Entre los requisitos técnicos destacan los que se refieren a los medios para asegurar la trazabilidad y el control de la calidad de los resultados, la participación regular en ejercicios de intercomparación y a la validación de los métodos analíticos.

En relación con los niveles de interés, pueden distinguirse claramente dos situaciones que condicionarán las técnicas y los métodos analíticos aplicables. Por una parte, tenemos las sustancias para las que la legislación ha establecido un nivel máximo permitido o un límite máximo de residuo (LMR) y por la otra las sustancias prohibidas. En el segundo caso, los métodos utilizados, al menos teóricamente, deberían poder diferenciar las muestras que no contienen analito de aquellas que sí lo contienen, aunque sea a niveles muy bajos. En la práctica, dado que el nivel cero no es alcanzable, se trata de aplicar métodos capaces de detectar las mínimas cantidades posibles de analito.

Actualmente la legislación fija los requisitos de exactitud, precisión y límite de detección que deben alcanzar los métodos para poder ser aplicados al control de unas sustancias concretas. Con esta información los laboratorios pueden utilizar los métodos que, cumpliendo dichos requisitos, mejor se ajusten a sus disponibilidades y experiencia. En este contexto, la validación de los métodos por parte de los laboratorios y la implantación de

actividades de control de calidad constituyen unos requisitos básicos para asegurar la fiabilidad de los resultados proporcionados.

En este contexto, la publicación en el 2002 de la Decisión 657, significó un paso adelante significativo en esta misma dirección. Esta Decisión surgió de una propuesta de un grupo de expertos, la mayoría de ellos vinculados a laboratorios comunitarios de referencia, que en 1998 recibió el encargo de la Comisión de la UE de establecer unos criterios de funcionamiento para los métodos analíticos aplicables al control de residuos y contaminantes en productos de origen animal.

Uno de los aspectos más novedosos es la definición de los puntos de identificación. Estos puntos se atribuyen de acuerdo con las características de las técnicas analíticas utilizadas. Así, por ejemplo, a la cromatografía de líquidos con un detector UV de serie de diodos se le atribuye 1 punto de identificación y a la cromatografía de gases o de líquidos acoplada a espectrómetros de masas de baja resolución se le asigna 1 punto por cada ión precursor y 1,5 puntos por cada ión producto. Para las sustancias prohibidas la Decisión establece que las técnicas analíticas deben alcanzar un mínimo de 4 puntos de identificación, mientras que para sustancias permitidas (con LMR fijado) se deberán alcanzar un mínimo de 3 puntos de identificación.

Todo ello ha obligado a los laboratorios que realizan análisis de residuos de productos zoonutricionales en alimentos a disponer de la tecnología adecuada, básicamente técnicas de separación cromatográfica acopladas a espectrómetros de masas. Por ello, en los últimos años hemos asistido a una auténtica revolución en el campo de la instrumentación disponible en dichos laboratorios.

Por otra parte, tal como se ha comentado anteriormente, los métodos de análisis usados como métodos de rutina deben estar validados. En particular, en el caso de los laboratorios acreditados según la norma ISO 17025, la validación de los métodos de medida es un requisito muy estricto. Si bien la validación de un método de análisis ha sido descrita en numerosas publicaciones, hasta la aparición de la Decisión 2002/657/CE la normativa no había fijado los requisitos de validación de una forma profusa. Además, este documento propone algunos nuevos parámetros

para caracterizar los métodos de análisis. Así, introduce el término límite mínimo de funcionamiento exigido, MRPL (*minimum required performance limit*, en versión anglosajona). Este es un concepto de aplicación a los métodos de análisis de compuestos prohibidos. Para estas sustancias la concentración debería ser cero, pero en la práctica la medida de cero es inalcanzable. De hecho, la concentración más baja que se puede detectar con un determinado método de análisis es la correspondiente al límite de detección. En un intento de armonizar los resultados obtenidos por distintos laboratorios la decisión fija un contenido mínimo, el MRPL, que el método de análisis debe ser capaz de detectar y confirmar. La decisión en ningún caso obliga a utilizar un método de análisis concreto, simplemente establece que los métodos utilizados para las sustancias prohibidas deben ser capaces de detectar y confirmar una concentración en la muestra equivalente al MRPL fijado para ese compuesto.

Otros términos introducidos por la Decisión 657 son el límite de decisión o  $CC\alpha$  y la capacidad de detección o  $CC\beta$ . Ambos parámetros tienen en cuenta que toda medida experimental lleva asociado un error. Para compuestos con LMR establecido,  $CC\alpha$  es la concentración por encima de la cual se puede afirmar, con una certeza estadística  $1-\alpha$ , que la muestra analizada supera el límite permitido, mientras que para compuestos prohibidos,  $CC\alpha$  es la concentración más baja a partir de la cual el método puede detectar la presencia del analito con una certeza estadística  $1-\alpha$ .

Por su parte  $CC\beta$  es la concentración a partir de la cual el analito puede ser detectado, identificado o cuantificado con una probabilidad de error  $\beta$ . En la práctica, para compuestos prohibidos,  $CC\beta$  es la mínima concentración que el método puede detectar en muestras realmente contaminadas con una certeza estadística  $1-\beta$  mientras que para compuestos con LMR  $CC\beta$  es la concentración en la que el método puede detectar límites de concentración permitidos con una certeza estadística  $1-\beta$ .

Por otro lado, la Decisión 2002/657/CE propone cambios en la terminología utilizada y no habla de resultados de análisis negativos o positivos; en su lugar utiliza las expresiones resultado conforme o no conforme. El resultado de un análisis es conforme si no supera el límite de

decisión  $CC\alpha$  del método, mientras que es no conforme cuando sobrepasa el valor de  $CC\alpha$ .

Retomando el tema de la validación, la Decisión 2002/657/CE establece que en la validación de un método deberán determinarse los parámetros: exactitud, que incluye veracidad y precisión, límite de decisión ( $CC\alpha$ ), capacidad de detección ( $CC\beta$ ), linealidad, especificidad, estabilidad y robustez. A continuación se describen brevemente cada uno de estos parámetros.

### 7.1. EXACTITUD

Entendemos por exactitud el grado de concordancia entre el resultado del ensayo y un valor de referencia aceptado. Se obtiene determinando la veracidad y la precisión.

#### 7.1.1. Veracidad

La veracidad nos indica el grado de concordancia existente entre el valor medio obtenido de una gran serie de resultados y un valor de referencia aceptado. La veracidad se expresa normalmente como sesgo. Para su determinación debería disponerse de un material de referencia certificado (MRC), del cual conozcamos la concentración del analito de interés.

Cuando no se dispone de MRC deberán realizarse aproximaciones como el enriquecimiento de muestras, en las cuales hayamos comprobado previamente la ausencia de analito. El resultado de los análisis de los materiales enriquecidos permitirá establecer la recuperación del método de análisis como la relación entre la cantidad encontrada y la añadida.

#### 7.1.2. Precisión

Entendemos como precisión la variabilidad de resultados obtenidos al analizar una misma muestra con el método de análisis objeto de validación. Para el establecimiento de la precisión podemos utilizar diferentes criterios:

reproducibilidad interlaboratorio, reproducibilidad intralaboratorio y repetibilidad.

#### 7.1.2.1. Reproducibilidad interlaboratorio

La reproducibilidad interlaboratorio se determina mediante la participación en ejercicios de intercomparación o colaborativos (también denominados test de anillo o ring tests), donde diferentes laboratorios analizan porciones de una misma muestra utilizando métodos de análisis similares o distintos.

A partir de los resultados proporcionados por los laboratorios participantes, una vez eliminados los resultados aberrantes mediante diferentes tests estadísticos, se calcula la desviación estándar global ( $\sigma$ ). Para cada laboratorio se calcula el parámetro Z-score, que mide la desviación sus resultados respecto al conjunto.

$$\text{Z-score} = (\text{resultado de un laboratorio} - \text{valor medio de los participantes}) / \sigma$$

A su vez el coeficiente de variación (CV), o desviación estándar relativa, del ejercicio se establece como:

$$CV = (\sigma / \text{valor medio de los participantes}) \times 100$$

y debe cumplir con la ecuación de Horwitz, es decir,

$$CV = 2^{(1 - 0,5 \log C)}$$

donde C es la concentración del analito en partes por uno.

Es preciso señalar que el criterio al que conduce la ecuación de Horwitz es muy poco estricto.

Aunque el número de ejercicios de intercomparación organizados ha aumentado significativamente en los últimos años, todavía es muy limitado.

Por ello no siempre es posible evaluar la reproducibilidad interlaboratorio y debe recurrirse a una estimación intralaboratorio.

#### 7.1.2.2. *Reproducibilidad intralaboratorio*

Para establecer la reproducibilidad intralaboratorio se analizarán muestras enriquecidas con el analito que contienen concentraciones equivalentes a 0,5; 1,0 y 1,5 veces el LMR o 1,0; 1,5 y 2,0 veces el MRPL, según se trate de un compuesto con MRL o prohibido.

Para aquellos compuestos prohibidos y que todavía no tengan fijado MRPL, la "Guía para la implementación de la Decisión 2002/657/CE" establece que la determinación de la reproducibilidad debería empezar en el nivel CC $\beta$  encontrado. En todos los casos, para cada nivel debe procederse al análisis de un mínimo de seis muestras idénticas.

Todo este proceso debe ser llevado a cabo otras dos veces por operadores diferentes y en condiciones ambientales distintas, por ejemplo instrumentos, temperatura ambiental, lotes de reactivos, etc.

Para cada nivel de concentración se determina la concentración media, la desviación estándar y el coeficiente de variación.

#### 7.1.2.3. *Repetibilidad*

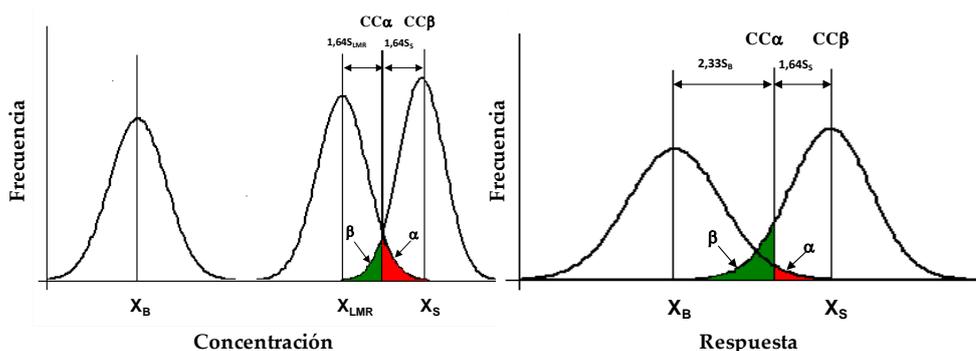
La determinación de la repetibilidad debe hacerla un único operador en el mismo laboratorio, utilizando la misma instrumentación y, a ser posible, en una única sesión de trabajo. El ejercicio puede diseñarse de una forma paralela a la descrita para el estudio de la reproducibilidad intralaboratorio. La Decisión indica que el CV suele estar entre la mitad y dos terceras partes del obtenido en condiciones de reproducibilidad.

## 7.2. LÍMITE DE DECISIÓN

El límite de decisión, tal como se comentado anteriormente, se define como aquel valor de concentración en el cual y a partir del cual se puede concluir con una probabilidad de error  $\alpha$  que una muestra no es conforme. En la práctica se calcula como el nivel de concentración en el que existe una probabilidad de error del 1% (sustancias prohibidas) o del 5% (sustancias

con LMR) cuando se da un resultado "no conforme", es decir, de falso "no conforme" o de error  $\alpha$ . Dicho de otro modo, por ejemplo para las sustancias prohibidas existe un 99% de probabilidad de dar un resultado "conforme" cuando el analito está realmente ausente de la muestra.

El parámetro  $CC\alpha$  contempla que las medidas experimentales tienen un error asociado y que cuando se realizan medidas replicadas de una misma muestra se obtiene una distribución de resultados alrededor del valor verdadero, que se puede describir mediante la función de Gauss, y que viene caracterizada por la desviación estándar (**Figura I.18**).



**Figura I.18:** Izquierda: Establecimiento de  $cc_\alpha$  y  $cc_\beta$  para sustancias permitidas con LMR establecido. Derecha: Establecimiento de  $cc_\alpha$  y  $cc_\beta$  para sustancias prohibidas.

Para una muestra cuyo contenido sea precisamente el del MRL, al hacer medidas replicadas, obtendremos un 50% de valores por debajo del MRL y un 50% por encima. Es decir que si tomáramos como criterio de muestra no conforme que el resultado del análisis sea superior al LMR, tendríamos una probabilidad del 50% de cometer un error  $\alpha$  y decir que la muestra es no conforme, cuando en realidad lo es.

Se pueden utilizar diferentes criterios para evaluar  $CC\alpha$ , a modo de ejemplo, se describen la más comúnmente usadas.

### 7.2.1. Sustancias con LMR

Se analizan en condiciones de repetibilidad 20 muestras enriquecidas con disoluciones de patrones al nivel del LMR y se determinan el valor medio y la desviación estándar ( $\sigma$ ) del grupo de resultados. Estableceremos  $CC\alpha$  como:

$$CC\alpha = \text{valor medio} + 1,64 \sigma_{LMR}$$

Así, para sustancias con LMR= 100  $\mu\text{g}/\text{kg}$  sería razonable encontrar un  $CC\alpha$  en torno a 110  $\mu\text{g}/\text{kg}$ .

### 7.2.2. Sustancias sin LMR (prohibidas)

Una de las posibles formas de determinar  $CC\alpha$  es analizando 20 muestras blancas (sin analito) y determinando el valor medio y su desviación estándar ( $\sigma$ ). Se calculará como:

$$CC\alpha = \text{valor medio} + 2,33 \sigma_B$$

Esta forma de determinación puede llevar a resultados anormalmente bajos que posteriormente son difíciles de reproducir en el trabajo diario. Otro sistema de determinación de  $CC\alpha$  para sustancias prohibidas consiste en el análisis de 18 muestras enriquecidas a diferentes niveles de concentración, habitualmente 1,0; 1,5 y 2,0 veces el MRPL en diferentes jornadas de trabajo y en el establecimiento de una curva de calibración de la media de las respuestas frente a la concentración. Una vez encontrada la ordenada en el origen ( $b$ ), se establece  $CC\alpha$  como la concentración que corresponde al siguiente valor de la respuesta:

$$CC\alpha (\text{respuesta}) = b + 2,33 \sigma_B$$

Donde ( $\sigma$ ) puede aproximarse a la desviación estándar en el menor nivel de concentración estudiado. Una vez determinado el  $CC\alpha$  en unidades de respuesta, se transforma a unidades de concentración usando la recta de calibración descrita anteriormente.

### 7.3. CAPACIDAD DE DETECCIÓN

La capacidad de detección se define como el contenido mínimo de la sustancia que puede ser detectado, identificado o cuantificado en una muestra con una probabilidad de error  $\beta$  (**Figura I.18**).

En la práctica se evalúa como el nivel de concentración en el que existe un error inferior al 5% de dar un resultado "conforme" cuando en realidad, se trata de un resultado "no conforme" (falso conforme), es decir tenemos un 95% de probabilidad de dar un resultado "no conforme" cuando el analito supera realmente el LMR (sustancias permitidas) o está presente en la muestra (sustancias prohibidas). La determinación de  $CC\beta$  tiene importancia legal, pues fija el máximo error permitido en la incoación de expedientes por presencia de sustancias prohibidas en los alimentos de consumo humano.

La forma de determinar  $CC\beta$  es enriqueciendo muestras a nivel  $CC\alpha$  y analizándolas. A partir del valor medio y la desviación estándar ( $\sigma$ ), se calcula  $CC\beta$  como sigue:

$$CC\beta = CC\alpha + 1,64 \sigma$$

donde  $\sigma$  es la desviación estándar a nivel  $CC\alpha$ .

Existen otras formas de determinación de  $CC\beta$ , que no difieren substancialmente de la descrita.

Según la Decisión 2002/657/CE, los valores encontrados para  $CC\alpha$  y  $CC\beta$  deberán ser siempre menores que los valores publicados de MRPL, cuando éste exista.

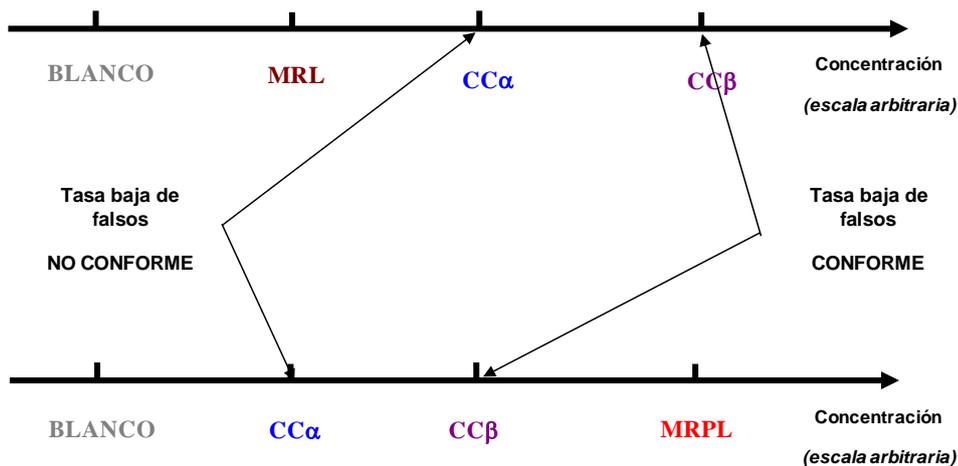
A modo de resumen la **Figura I.19** muestra la relación entre LMR,  $CC\alpha$  y  $CC\beta$  para compuestos autorizados, y la relación entre MRPL,  $CC\alpha$  y  $CC\beta$  para compuestos prohibidos.

### 7.4. CURVA DE CALIBRACIÓN

La Decisión 2002/657/CE establece que las curvas de calibración que se utilizan para cuantificar deben obtenerse a partir de un mínimo de 5 puntos, incluyendo el cero. Deben especificarse el intervalo de trabajo, los

parámetros de la función matemática que describe la curva, los márgenes de aceptabilidad de dichos parámetros y la bondad del ajuste de los datos a la función.

### SUSTANCIAS AUTORIZADAS



### SUSTANCIAS PROHIBIDAS

**Figura I.19:** Relación entre los límites establecidos (LMR y MRPL) y los parámetros límite de decisión  $CC\alpha$  y capacidad de detección  $CC\beta$ .

Las curvas de calibración deben determinarse de la misma forma en que posteriormente se realice la rutina de trabajo, ya sea usando patrones externos, muestras enriquecidas con patrones y analizadas posteriormente, curvas realizadas con patrón interno adicionado antes del análisis de las muestras, adición estándar, etc.

#### 7.5. ESPECIFICIDAD

Este parámetro trata de establecer la capacidad del método para diferenciar entre el analito de interés y las interferencias propias de la matriz, de otros analitos, etc.

Para ello es necesario analizar una serie de muestras blancas y de blancos de reactivos para comprobar la ausencia de interferencias en la zona

en la que se mide la señal analítica (por ejemplo el tiempo de retención del analito). Para ello será necesario calcular la relación señal/ruido en dicha zona y comprobar que se encuentra por debajo de un mínimo establecido previamente.

Si se conocieran las posibles interferencias, estas pueden adicionarse a muestras blancas (control), conjuntamente con el analito y valorar la posibilidad de una falsa identificación/cuantificación.

#### 7.6. ESTABILIDAD

Entendemos por estabilidad el tiempo durante el cual el analito mantiene constante su concentración, tanto en disoluciones patrón como en extractos de muestra. Para establecer este parámetro se deberán realizar experimentos como por ejemplo, mantener disoluciones del analito a temperatura ambiente, en refrigeración y en congelación durante diferentes periodos de tiempo y analizarlos para establecer el período máximo durante el cual el valor de la propiedad analizada se mantiene.

La "*Guía para la implementación de la Decisión 2002/657/CE*" ha minimizado la importancia de determinar este parámetro en la validación de un método y permite establecerlo basándose en la bibliografía o la experiencia de otros laboratorios.

#### 7.7. ROBUSTEZ

La robustez se define como la susceptibilidad de un método analítico a los cambios de las condiciones experimentales. Es necesario identificar los puntos críticos del método para programar cambios menores razonables en las condiciones que potencialmente pueden tener algún efecto sobre los resultados obtenidos. De esta forma pueden establecerse los límites de aceptación de los citados factores. A modo de ejemplo podemos citar algunos factores que pueden afectar a los resultados analíticos: tiempo de extracción, volumen de extractante, temperatura de conservación de los extractos, tiempo de evaporación de los eluatos, etc.

## 8. BIBLIOGRAFÍA

- Adrian, J., Pinacho, D. G., Granier, B., Diserens, J.-M., Sánchez-Baeza, F., Marco, M.-P. (2008). A multianalyte ELISA for immunochemical screening of sulfonamide, fluoroquinolone and  $\beta$ -lactam antibiotics in milk samples using class-selective bioreceptors. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 391(5), 1703-1712.
- Agencia Española de Consumo, Seguridad Alimentaria y Nutrición. (PNIR). Plan Nacional de Investigación de Residuos (PNIR).
- Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios. (2014). Plan estratégico y de acción para reducir el riesgo de selección y diseminación de resistencias a los antibióticos Plan estratégico y de acción para reducir el riesgo de selección y diseminación de resistencias a los antibióticos.
- Aerts, M. M., Hogenboom, A. C., Brinkman, U. A. (1995). Analytical strategies for the screening of veterinary drugs and their residues in edible products. *Journal of Chromatography B, Biomedical Applications*, 667(1), 1-40.
- AESA/Genoma España. (2005). *Aplicaciones de la Biotecnología en Seguridad Alimentaria*. ISBN: 84-609-5044-1.
- Almeida, S. A. A., Moreira, F. T. C., Heitor, A. M., Montenegro, M. C. B. S. M., Aguilar, G. G., Sales, M. G. F. (2011). Sulphonamide-imprinted sol-gel materials as ionophores in potentiometric transduction. *Materials Science and Engineering: C*, 31(8), 1784-1790
- Almeida, M. P., Rezende, C. P., Souza, L. F., Brito, R. B. (2012). Validation of a quantitative and confirmatory method for residue analysis of aminoglycoside antibiotics in poultry, bovine, equine and swine kidney through liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Food Additives and Contaminants. Part A, Chemistry, Analysis, Control, Exposure and Risk Assessment*, 29(4), 517-525.

- Arvand, M., Alirezanejad, F. (2011). Sulfamethoxazole-Imprinted Polymeric Receptor as Ionophore for Potentiometric Transduction. *Electroanalysis*, 23(8), 1948-1957.
- Asensio, L., González, I., García, T., Martín, R. (2008). Determination of food authenticity by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Food Control*, 19(1), 1-8.
- Avrameas, S., Uriel, J. (1966). Méthode de marquage d'antigènes et d'antiops avec des enzymes et son application en immunodiffusion. *C.R.l'Academie des Sciences, Paris*, 262, 2543-2545.
- Azam, S., Rahman, R. T., Lou, Z., Tang, Y., Raqib, S. M., Jothi, J. S. (2014). Review: Advancements and application of immunosensors in the analysis of food contaminants. *Nusantara Bioscience*, 6(2), 186-195.
- Bahadır, E. B., Sezgintürk, M. K. (2015). Applications of commercial biosensors in clinical, food, environmental, and bioterror/biowarfare analyses. *Analytical Biochemistry*, 478, 107-120.
- Beier, R. C., Creemer, L. C., Ziprin, R. L., Nisbet, D. J. (2005). Production and Characterization of Monoclonal Antibodies against the Antibiotic Tilmicosin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(25), 9679-9688.
- Beier, R. C., Stanker, L. H. (2000). Application of immunoassay for detection of antibiotics in foods and feed: a review. *Recent Research Developments in Agricultural and Food Chemistry*, 4(1), 59-93.
- Benedetti, L., Pieralli, L. (1990). *Apicultura: el individuo, la colectividad, el medio, los productos de la colmena, constitución y manejo del colmenar, apicultura especializada, adversidades y medidas de prevención, legislación apícola española*. Ed. Omega.
- Berlina, A. N., Zherdev, A. V., Dzantiev, B. B., Sakharov, I. I. (2007). Use of soybean peroxidase for the enzyme immunoassay of sulfamethoxypyridazine in milk. *Prikladnaia Biokhimiia I Mikrobiologiya*, 43(5), 614-620.
- Berrueta, L. A., Gallo, B., Vicente, F. (1995). A review of solid phase extraction: Basic principles and new developments. *Chromatographia*, 40(7-8), 474-483.

- Bogdanov, S. (2006). Contaminants of bee products. *Apidologie*, 37(1), 1-18.
- Boggio, J. C., San Andrés Larrea, M. (2007). Antimicrobianos y antiparasitarios en medicina veterinaria Ed. *Intermédica* (1.ª ed.).
- Bogialli, S., Di Corcia, A. (2009). Recent applications of liquid chromatography-mass spectrometry to residue analysis of antimicrobials in food of animal origin. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 395(4), 947-966.
- Boletín Oficial del Estado. (1998). Real Decreto 1749/1998, de 31 de julio, por el que se establecen las medidas de control aplicables a determinadas sustancias y sus residuos en los animales vivos y sus productos.
- Boletín Oficial del Estado. (2002). Real Decreto 209/2002, de 22 de febrero, por el que se establecen normas de ordenación de las explotaciones apícolas.
- Boletín Oficial del Estado. (2003) Real Decreto 1049/2003, de 1 de agosto, por el que se aprueba la Norma de Calidad relativa a la miel.
- Boletín Oficial del Estado. (2008). Real Decreto 1246/2008, de 18 de julio, por el que se regula el procedimiento de autorización, registro y farmacovigilancia de los medicamentos veterinarios fabricados industrialmente.
- Bonwick, G. A., Smith, C. J. (2004). Immunoassays: their history, development and current place in food science and technology. *International Journal of Food Science and Technology*, 39(8), 817-827.
- Brady, F. J. (1995). Interpretation of immunoassay data. En: Immunoanalysis of agrochemicals. Nelson, J.O., Karu, A.E., Wong, R.B. (Eds.). ACS Symposium series 586, American Chemical Society, Washington, DC, 266-287 pp.
- Braga, O. C., Campestrini, I., Vieira, I. C., Spinelli, A. (2010). Sulfadiazine determination in pharmaceuticals by electrochemical reduction on a glassy carbon electrode. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 21(5), 813-820.
- Brogan, K. L., Shin, J. H., Schoenfisch, M. H. (2004). Influence of Surfactants and Antibody Immobilization Strategy on Reducing Nonspecific

- Protein Interactions for Molecular Recognition Force Microscopy. *Langmuir*, 20(22), 9729-9735.
- Brumfitt, W., Hamilton-Miller, J. M. (1993). Reassessment of the rationale for the combinations of sulphonamides with diaminopyrimidines. *Journal of Chemotherapy* (Florence, Italy), 5(6), 465-469.
- Brun, E.M., Garcés-García, M., Puchades, R., Maquieira, A. (2004) . Enzyme-linked immunosorbent assay for the organophosphorus insecticide fenthion. Influence of hapten structure. *Journal of Immunological Methods*, 295, 21-35.
- Buerk, D. G. (1995). Biosensors: Theory and Applications. *CRC Press*.
- Burke, C. M. (1988). A primer for multilayer Immunoassay. En: Nonisotopic Immunoassay. T. T. Ngo (Ed.), Plenum, New York, pp. 303-312.
- Buszewski, B., Szultka, M. (2012). Past, Present, and Future of Solid Phase Extraction: A Review. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, 42(3), 198-213.
- Caballo-López, A., Luque de Castro, M. D. (2003). Continuous ultrasound-assisted extraction coupled to on-line filtration-solid-phase extraction-column liquid chromatography-post column derivatization-fluorescence detection for the determination of N-methylcarbamates in soil and food. *Journal of Chromatography A*, 998, 51.
- Cai, Z., Zhang, Y., Pan, H., Tie, X., Ren, Y. (2008). Simultaneous determination of 24 sulfonamide residues in meat by ultra-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1200(2), 144-155.
- Cai, M., Zhu, L., Ding, Y., Wang, J., Li, J., Du, X. (2012). Determination of sulfamethoxazole in foods based on CeO<sub>2</sub>/chitosan nanocomposite-modified electrodes. *Materials Science and Engineering: C*, 32(8), 2623-2627.
- Cháfer-Pericás, C., Maquieira, Á., Puchades, R. (2010). Fast screening methods to detect antibiotic residues in food samples. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 29(9), 1038-1049.

- Chianella, I., Guerreiro, A., Moczko, E., Caygill, J. S., Piletska, E. V., De Vargas Sansalvador, I. M. P., ... Piletsky, S. A. (2013). Direct replacement of antibodies with molecularly imprinted polymer nanoparticles in ELISA--development of a novel assay for vancomycin. *Analytical Chemistry*, 85(17), 8462-8468.
- Choia, J.H., Keumb, K.C., Lee. S.Y. (2006). Production of recombinant proteins by high cell density. *Chemical Engineering Science*, 61, 876-885.
- Chopra, I., Roberts, M. (2001). Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. *Microbiology and Molecular Biology Reviews: MMBR*, 65(2), 232-260.
- Christian, T., Schneider, R. J., Färber, H. A., Skutlarek, D., Meyer, M. T., Goldbach, H. E. (2003). Determination of Antibiotic Residues in Manure, Soil, and Surface Waters. *Acta Hydrochimica et Hydrobiologica*, 31(1), 36-44.
- Clément, H. (2012). Tratado De Apicultura. *Barcelona: Omega*.
- CVMP. (2002). Cloramphenicol Summary report.
- COAG. (2013). Anuario Agrario COAG 2013, 104-110.
- Cohen, M. L. (2000). Changing patterns of infectious disease. *Nature*, 406: 762-767.
- COM. (2005). Informe de la Comisión al Consejo basado en los informes de los Estados miembros relativos a la aplicación de la Recomendación 2002/77/CE del Consejo sobre la utilización prudente de los agentes antimicrobianos en la medicina humana.
- Comisión de las Comunidades Europeas. (1999). *Libro Blanco sobre Seguridad Alimentaria*.
- Comisión Europea. (2011). Comunicación de la Comisión al Parlamento Europeo y al Consejo. Plan de acción contra la amenaza creciente de las resistencias bacterianas.

- Comisión Europea. (2013). Informe de la Comisión al Parlamento Europeo y al Consejo sobre la aplicación de las medidas relativas al sector apícola del reglamento (CE) nº 1234/2007 del Consejo.
- Community Reference Laboratorie. (2007). CRLs view on state of the art analytical methods for national residue control plans.
- Community reference laboratories residues. (2010). Guidelines for the validation of screening methods for residues of veterinary medicines.
- Conzuelo, F., Campuzano, S., Gamella, M., Pinacho, D.G., Reviejo, A.J., Marco, M.P., Pingarrón, J.M., (2013). Integrated disposable electrochemical immunosensors for the simultaneous determination of sulfonamide and tetracycline antibiotics residues in milk. *Biosensors and Bioelectronics*, 50, 100-105.
- Costa-Batllori, P. (1996). Las sulfonamidas: actualidad como agentes terapéuticos. *Medicina Veterinaria*, 13.11, 585-593.
- Couper, M. R. (1997). Strategies for the rational use of antimicrobials. *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*, 24 Suppl 1, S154-156.
- Deshpande, S. S. (1996). Immunoassay Classification and Commercial Technologies. En *Enzyme Immunoassays* (pp. 231-274). Springer US.
- Dey, B. P., Reamer, R. P., Thaker, N. H., Thaler, A. M. (2005). Calf antibiotic and sulfonamide test (CAST) for screening antibiotic and sulfonamide residues in calf carcasses. *Journal of AOAC International*, 88(2), 440-446.
- Diario Oficial de la Unión Europea. (1990). Reglamento (CEE) Nº 2377/1990 del Consejo de 26 de junio de 1990, por el que se establece un procedimiento comunitario de fijación de los límites máximos de residuos de medicamentos veterinarios en los alimentos de origen animal. *Diario Oficial L 224 de 18/08/1990*, p. 1-113.
- Diario Oficial de la Comunidad Europea. (1996). Directiva 96/23/CE del Consejo de 29 de abril de 1996, relativa a las medidas de control aplicables respecto de determinadas sustancias y sus residuos en los animales vivos y sus productos y por la que se derogan las

Directivas 85/358/CEE y 86/469/CEE y las Decisiones 89/187/CEE y 91/664/CEE. *Diario Oficial* L 125 de 23/05/1996, p. 1-29.

Diario Oficial de la Unión Europea. **(2002a)**. Decisión de la Comisión, de 12 de agosto de 2002, por la que se aplica la Directiva 96/23/CE del Consejo en cuanto al funcionamiento de los métodos analíticos y la interpretación de los resultados. *Diario Oficial* L 221 de 17/08/2002, p. 8-36. -versión consolidada 10 de enero de 2004.

Diario Oficial de las Comunidades Europeas. **(2002 b)**. Reglamento (CE) N° 178/2002 del Parlamento Europeo y del Consejo de 28 de enero de 2002, por el que se establecen los principios y los requisitos generales de la legislación alimentaria, se crea la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria y se fijan procedimientos relativos a la seguridad alimentaria. *Diario Oficial* L 31 de 1/02/2002, p. 1-42.

Diario Oficial de la Unión Europea. **(2004)**. Directiva 2004/28/CE del Parlamento Europeo y del Consejo de 31 de marzo de 2004, que modifica la Directiva 2001/82/CE por la que se establece un código comunitario sobre medicamentos veterinarios. *Diario Oficial* L 311 de 28/11/2004, p. 1-114.

Diario Oficial de la Unión Europea. **(2009)**. Reglamento (CE) N° 470/2009 del Parlamento Europeo y del Consejo de 6 de mayo de 2009, por el que se establecen procedimientos comunitarios para la fijación de los límites de residuos de las sustancias farmacológicamente activas en los alimentos de origen animal, se deroga el Reglamento (CEE) n° 2377/90 del Consejo y se modifican la Directiva 2001/82/CE del Parlamento Europeo y del Consejo y el Reglamento (CE) n° 726/2004 del Parlamento Europeo y del Consejo. *Diario Oficial* L 152 de 16/06/2009, p. 11-22.

Diario Oficial de la Unión Europea. **(2010)**. Reglamento (UE) N° 37/2010 de la Comisión de 22 de diciembre de 2009, relativo a las sustancias farmacológicamente activas y su clasificación por lo que se refiere a los límites máximos de residuos en los productos alimenticios de origen animal. *Diario Oficial* L 15 de 20/01/2010, p. 1-72.

- Di Stefano, V., Avellone, G., Bongiorno, D., Cunsolo, V., Muccilli, V., Sforza, S., Vékey, K. (2012). Applications of liquid chromatography-mass spectrometry for food analysis. *Journal of Chromatography A*, 1259, 74-85.
- Dmitrienko, S. G., Kochuk, E. V., Apyari, V. V., Tolmacheva, V. V., Zolotov, Y. A. (2014). Recent advances in sample preparation techniques and methods of sulfonamides detection - A review. *Analytica Chimica Acta*, 850, 6-25.
- Domagk, G. (1935). Chemotherapie der bakteriellen Infektionen. *Angewandte Chemie*, 48(42), 657-667.
- ECDC. (2005). European Centre for Disease Prevention and Control. Annual epidemiological report 2014. Antimicrobial resistance and healthcare-associated infections .
- ECDC/EMA Joint Technical Report, E. J. T. R. (2009). The bacterial challenge: time to react.
- EMA/333921. (2014). Sales of veterinary antimicrobial agents in 26 EU/EEA countries in 2012. European Medicines Agency, European Surveillance of Veterinary Antimicrobial Consumption.
- Engvall, E., Perlmann, P. (1971). Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) quantitative assay of immunoglobulin G. *Immunochemistry*, 8(9), 871-874.
- Engvall, E. (2010). The ELISA, Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. *Clinical Chemistry*, 56(2), 319-320.
- Eteraf-Oskouei, T., Najafi, M. (2013). Traditional and Modern Uses of Natural Honey in Human Diseases: A Review. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*, 16(6), 731-742.
- European Commission. (2002). Commission Decision of 12 August 2002, implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results. Official Journal of the European Communities, L 221 de 17/08/2002, p. 8-29.
- European Commission. (2008). Guidelines for the implementation of Decision 2002/657/EC.

- European Food Safety Authority. (2009). Plan Estratégico de la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria para 2009-2013.
- Fenn, J. B., Mann, M., Meng, C. K., Wong, S. F., Whitehouse, C. M. (1990). Electrospray ionization—principles and practice. *Mass Spectrometry Reviews*, 9(1), 37-70.
- Fent, K., Weston, A. A., Caminada, D. (2006). Ecotoxicology of human pharmaceuticals. *Aquatic Toxicology*, 76(2), 122-159.
- Fernández, P. L. (2009). Velázquez. *Farmacología Básica y Clínica* (18ª ed.). Ed. Médica Panamericana.
- Florez J. (1997). *Farmacología Humana* (3ª ed.). Masson, S.A.
- Font, H., Adrian, J., Galve, R., Estévez, M.-C., Castellari, M., Gratacós-Cubarsí, M., ... Marco, M.-P. (2008). Immunochemical assays for direct sulfonamide antibiotic detection in milk and hair samples using antibody derivatized magnetic nanoparticles. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(3), 736-743
- Franek, M., Diblikova, I., Cernoch, I., Vass, M., Hruska, K. (2006). Broad-specificity immunoassays for sulfonamide detection: immunochemical strategy for generic antibodies and competitors. *Analytical Chemistry*, 78(5), 1559-1567.
- Gabaldón, J. A., Maquieira, A., Puchades, R. (1999). Current trends in immunoassay-based kits for pesticide analysis. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 39(6), 519-538.
- Galán Montemayor, J. C., Moreno Bofarull, A., Baquero Mochales, F. (2014). Impacto de los movimientos migratorios en la resistencia bacteriana a los antibióticos. *Revista Española de Salud Pública*, 88(6), 829-837.
- Gan, S. D., Patel, K. R. (2013). Enzyme Immunoassay and Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. *Journal of Investigative Dermatology*, 133(9), e12.
- Garcia, D., Huang, S., Stansbury, W. (1996). Characterization of the atmospheric pressure chemical ionization liquid chromatography mass spectrometry interface. *J Am Soc Mass Spectrom*, 7, 59-65.

- Gaudin, V., Rault, A., Verdon, E. (2012). Validation of a commercial receptor kit Sulfasensor Honey for the screening of sulfonamides in honey according to Commission Decision 2002/657/EC. *Food Additives and Contaminants. Part A, Chemistry, Analysis, Control, Exposure and Risk Assessment*, 29(6), 942-950.
- Gazzaz, S. S., Rasco, B. A., Dong, F. M. (1992). Application of immunochemical assays to food analysis. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 32(3), 197-229.
- Geis-Asteggianti, L., Lehotay, S. J., Lightfield, A. R., Dutko, T., Ng, C., Bluhm, L. (2012). Ruggedness testing and validation of a practical analytical method for >100 veterinary drug residues in bovine muscle by ultrahigh performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1258, 43-54.
- González-Pleiter, M., Gonzalo, S., Rodea-Palomares, I., Leganés, F., Rosal, R., Boltes, K., ... Fernández-Piñas, F. (2013). Toxicity of five antibiotics and their mixtures towards photosynthetic aquatic organisms: Implications for environmental risk assessment. *Water Research*, 47(6), 2050-2064.
- Gosling, J. P. (1990). A decade of development in immunoassay methodology. *Clinical Chemistry*, 36(8), 1408-1427.
- Goto, T., Ito, Y., Oka, H., Saito, I., Matsumoto, H., Nakazawa, H. (2003). Simple and rapid determination of N-methylcarbamate pesticides in citrus fruits by electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, 487, 201-209.
- Grieshaber, D., MacKenzie, R., Vörös, J., Reimhult, E. (2008). Electrochemical Biosensors - Sensor Principles and Architectures. *Sensors (Basel, Switzerland)*, 8(3), 1400-1458.
- Grojtan, H.E., Keel, B.A. (1996). Data interpretation and quality control. En: Immunoassay. Diamandis, EP., Christopoulos, T.K (eds.). Academic Press, Inc., San Diego, CA, 51-93 pp
- Grubelnik, A., Padeste, C., Tiefenauer, L. (2001). Highly Sensitive Enzyme Immunoassays for the Detection of  $\beta$ -Lactam Antibiotics. *Food and Agricultural Immunology*, 13(3), 161-169.

- Hall, J.C., O'Brien, G.M., Webb, S.R. (1997). Phage-Display Technology for Environmental Analysis. En: *Immunochemical Technology for Environmental Applications*. Aga, D.S., Thurman, E.M (eds.). ACS Symposium Series 657, American Chemical Society, Washington, DC, 22-37 pp.
- Hammock, B. D., Mumma, R. O. (1980) Potential of immunochemical technology for pesticide analysis. En: *Recent Advances in Pesticide Analytical Technology*. J.R.J. Harvey; G. Zweig (Eds.), ACS Symposium Series 136, American chemical Society, Washington, DC, 321 pp.
- Heberer, T. (2002). Occurrence, fate, and removal of pharmaceutical residues in the aquatic environment: a review of recent research data. *Toxicology Letters*, 131(1-2), 5-17.
- Hennion, M. C., Barceló, D. (1998). Strengths and limitations of immunoassays for effective and efficient use for pesticide analysis in water samples: A review. *Analytica Chimica Acta*, 362, 3-34.
- Hock, B., Giersch, T., Kramer, K., Dankwardt, A., (1995a). Antibody Production and Progress in Hybridoma Technology by Immunomagnetic Screening. En: *New Frontiers in Agrochemical Immunoassay*. Kurtz, D.A., Skerrit, J.H., Stanker, L. (eds.). *Journal of the Association of Official Agricultural Chemists International*, Arlington, Virginia, 149-162 pp.
- Hock, B., Dankwardt, A., Kramer, K., Marx, A. (1995b). Immunochemical techniques: antibody production for pesticide analysis. A review. *Analytica Chimica Acta*, 311, 393-406.
- Huet, A.-C., Charlier, C., Tittlemier, S. A., Singh, G., Benrejeb, S., Delahaut, P. (2006). Simultaneous Determination of (Fluoro)quinolone Antibiotics in Kidney, Marine Products, Eggs, and Muscle by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(8), 2822-2827.
- Jeon, M., Rhee Paeng, I. (2008). Quantitative detection of tetracycline residues in honey by a simple sensitive immunoassay. *Analytica Chimica Acta*, 626(2), 180-185.

- Jiang, W., Zhang, H., Li, X., Liu, X., Zhang, S., Shi, W., ... Wang, Z. (2013). Monoclonal antibody production and the development of an indirect competitive enzyme-linked immunosorbent assay for screening spiramycin in milk. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(46), 10925-10931.
- Ji, H.-F., Li, X.-J., Zhang, H.-Y. (2009). Natural products and drug discovery. *EMBO Reports*, 10(3), 194-200.
- Kandimalla, V. B., Ju, H. (2004). Molecular imprinting: a dynamic technique for diverse applications in analytical chemistry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 380(4), 587-605.
- Kanny, G., Puygrenier, J., Beaudoin, E., Moneret-Vautrin, D. A. (1994). Alimentary anaphylactic shock: implication of penicillin residues. *Allergie and Immunologie*, 26(5), 181-183.
- Kanungo, L., Bhand, S. (2013). Fluorimetric immunoassay for multianalysis of aflatoxins. *Journal of Analytical Methods in Chemistry*, 2013, ID 584964.
- Kanungo, L., Pal, S., Bhand, S. (2011). Miniaturised hybrid immunoassay for high sensitivity analysis of aflatoxin M1 in milk. *Biosensors and Bioelectronics*, 26(5), 2601-2606.
- Kaufmann, A., Roth, S., Ryser, B., Widmer, M., Guggisberg, D. (2002). Quantitative LC/MS-MS Determination of Sulfonamides and Some Other Antibiotics in Honey. *Journal of AOAC International*, 85(4), 853-860.
- Kennedy, D. G., McCracken, R. J., Cannavan, A., Hewitt, S. A. (1998). Use of liquid chromatography-mass spectrometry in the analysis of residues of antibiotics in meat and milk. *Journal of Chromatography A*, 812(1-2), 77-98.
- Kennedy, D. G., Cannavan, A., McCracken, R. J. (2000). Regulatory problems caused by contamination, a frequently overlooked cause of veterinary drug residues. *Journal of Chromatography A*, 882(1-2), 37-52.
- Kim, Y.J., Cho, Y.A., Lee, H.S., Lee, Y.T., Gee, S.J., Hammock, B.D. (2003). Synthesis of haptens for immunoassay of organophosphorus

- pesticides and effect of heterology in hapten spacer arm length on immunoassay sensitivity. *Analytical Chemistry Acta*, 475, 85-96.
- Kim, Y. A., Lee, E. H., Kim, K. O., Lee, Y. T., Hammonck, B. D., Lee, H. S. (2011). Competitive immunochromatographic assay for the detection of the organophosphorus pesticides chlorpyrifos. *Analytica Chimica Acta*, 693, 106-113.
- Köhler, G., Milstein, C. (1975a). Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature*, 256(5517), 495-497.
- Korolkovas, A., Burckhalter, J. H. (1983). *Compendio esencial de química farmacéutica*. Reverte.
- Kramer, K., Hock, B. (2003). Recombinant antibodies for environmental analysis. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 377(3), 417-426.
- Laffly, E., Sodoyer, R. (2005). Monoclonal and recombinant antibodies, 30 years after. *Human Antibodies*, 14(1-2), 33-55.
- Landers, T. F., Cohen, B., Wittum, T. E., Larson, E. L. (2012). A Review of Antibiotic Use in Food Animals: Perspective, Policy, and Potential. *Public Health Reports*, 127(1), 4-22.
- Langone, J. J., Van Vunakis, H. (1975). Radioimmunoassay for dieldrin and aldrin. *Research Communications in Chemical Pathology and Pharmacology*, 10, 163-171.
- Le Bizec, B., Pinel, G., Antignac, J.-P. (2009). Options for veterinary drug analysis using mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1216(46), 8016-8034.
- Lee, Y., Jeong, Y., Kang, H. J., Chung, S. J., Chung, B. H. (2009). Cascade enzyme-linked immunosorbent assay (CELISA). *Biosensors and Bioelectronics*, 25(2), 332-337.
- Lee, N.A., Kennedy, I.R. (2001). Environmental monitoring of pesticides by immunoanalytical techniques: validation, current status, and future perspectives. *Journal of AOAC international*, 84, 1393-1406
- Lee, N., Holtzapple, C. K., Muldoon, M. T., Deshpande, S. S., Stanker, L. H. (2001). Immunochemical Approaches to the Detection of

- Sulfathiazole in Animal Tissues. *Food and Agricultural Immunology*, 13(1), 5-17.
- Lehotay, S. J., Lightfield, A. R., Geis-Asteggiate, L., Schneider, M. J., Dutko, T., Ng, C., ... Mastovska, K. (2012). Development and validation of a streamlined method designed to detect residues of 62 veterinary drugs in bovine kidney using ultra-high performance liquid chromatography--tandem mass spectrometry. *Drug Testing and Analysis*, 4 Suppl 1, 75-90.
- León, M. A. del B., Rovira, P. R. (1995). *Manual de bases teórico-prácticas de inmunocitoquímica*. Universidad de Oviedo.
- Little, J. A. (2004). Comparison of Curve Fitting Models for Ligand Binding Assays. *Chromatographia*, 59(2), S177-S181.
- Liu, Y., Lou, Y., Xu, D., Qian, G., Zhang, Q., Wu, R., Hu, B., Liu, F. (2009). Production and characterization of monoclonal antibody for class-specific determination of O,O-dimethyl organophosphorus pesticides and effect of heterologous coating antigens on immunoassay sensitivity. *Microchemical Journal*, 93, 36-42.
- Liu, N., Han, Z., Lu, L., Wang, L., Ni, G., Zhao, Z., ... Zheng, X. (2013). Development of a new rabbit monoclonal antibody and its based competitive indirect enzyme-linked immunosorbent assay for rapid detection of sulfonamides. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 93(3), 667-673.
- Luliński, P. (2013). Molecularly imprinted polymers as the future drug delivery devices. *Acta Poloniae Pharmaceutica*, 70(4), 601-609.
- Malik, A. K., Blasco, C., Picó, Y. (2010). Liquid chromatography-mass spectrometry in food safety. *Journal of Chromatography A*, 1217(25), 4018-4040.
- Mandal, M. D., Mandal, S. (2011). Honey: its medicinal property and antibacterial activity. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 1(2), 154-160.
- Mangas Roldán, J. M. (2012). *La legislación alimentaria española. De las ordenanzas sanitarias a los reglamentos europeos de seguridad alimentaria*.

- (Tesis Doctoral). Facultad de Veterinaria, Universidad de las Palmas de Gran Canaria.
- Märtlbauer, E., Usleber, E., Schneider, E., Dietrich, R. (1994). Immunochemical detection of antibiotics and sulfonamides. *Analyst*, 119(12), 2543-2548.
- McEvoy, J. D. G. (2002). Contamination of animal feedingstuffs as a cause of residues in food: a review of regulatory aspects, incidence and control. *Analytica Chimica Acta*, 473(1-2), 3-26.
- Mendoza, N. (2006). Actualidades farmacológicas. Penicilina. *Revista de la Facultad de Medicina UNAM*, 49.
- MAGRAMA. Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente. (2013). Programa de vigilancia piloto sobre las pérdidas de colonias de abejas 2013-2014.
- Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino. (2010). Programa Nacional de Medidas de ayuda a la Apicultura. España 2011-2013.
- Mitchell, J. M., Griffiths, M. W., McEwen, S. A., McNab, W. B., Yee, A. J. (1998). Antimicrobial drug residues in milk and meat: causes, concerns, prevalence, regulations, tests, and test performance. *Journal of Food Protection*, 61(6), 742-756.
- Moats, W. A. (1999). The effect of processing on veterinary residues in foods. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 459, 233-241.
- Mohamed, R., Hammel, Y.-A., LeBreton, M.-H., Tabet, J.-C., Jullien, L., Guy, P. A. (2007). Evaluation of atmospheric pressure ionization interfaces for quantitative measurement of sulfonamides in honey using isotope dilution liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry techniques. *Journal of Chromatography A*, 1160(1-2), 194-205.
- Molan, P. C. (2006). Using honey in wound care. *University of Waikato Research Commons*.
- Neu, H. C., Gootz, T. D. (1996). Antimicrobial Chemotherapy. En S. Baron (Ed.), *Medical Microbiology* (4th ed.). Galveston (TX): University of Texas Medical Branch at Galveston.

- Ngom, B., Guo, Y., Wang, X., Bi, D. (2010). Development and application of lateral flow test strip technology for detection of infectious agents and chemical contaminants: a review. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 397(3), 1113-1135.
- Niessen, W. M. A. (1998). Analysis of antibiotics by liquid chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 812(1-2), 53-75.
- Nouws, J., van Egmond, H., Smulders, I., Loeffen, G., Schouten, J., Stegeman, H. (1999). A microbiological assay system for assessment of raw milk exceeding EU maximum residue levels. *International Dairy Journal*, 9(2), 85-90.
- Nunnery, J., Angulo, F. J., Tollefson, L. (2006). Public health and policy. *Preventive veterinary Medicine*, 73, 191-195.
- Official Journal of the European Union. (2003). Regulation (EC) N° 1831/2003 of the European Parliament and of the Council of 22 September 2003 on additives for use in animal nutrition, 15.
- OIE. (2007). Oie list of antimicrobial of veterinary importance.
- OIE. (2014). Código Sanitario para los animales terrestres (Vol. I).
- Okerman, L., van Hoof, J., Debeuckelaere, W. (1998). Evaluation of the European four-plate test as a tool for screening antibiotic residues in meat samples from retail outlets. *Journal of AOAC International*, 81(1), 51-56.
- OMS. (2015). OMS, Resistencia a los antimicrobianos.
- Page, S. W. (1991). Chloramphenicol 1. Hazards of use and the current regulatory environment. *Australian Veterinary Journal*, 68(1), 1-2
- Pal, A., He, Y., Jekel, M., Reinhard, M., Gin, K. Y.-H. (2014). Emerging contaminants of public health significance as water quality indicator compounds in the urban water cycle. *Environment International*, 71, 46-62.
- Parham, P. (2006). *Inmunología*. Ed. Médica Panamericana.
- Pastor-Navarro, N., García-Bover, C., Maquieira, A., Puchades, R. (2004). Specific polyclonal-based immunoassays for sulfathiazole. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 379(7-8), 1088-1099.

- Pastor-Navarro, N., Gallego-Iglesias, E., Maquieira, A., Puchades, R. (2007). Development of a group-specific immunoassay for sulfonamides. Application to bee honey analysis. *Talanta*, 71(2), 923-933.
- Pastor-Navarro, N., Maquieira, Á., Puchades, R. (2009). Review on immunoanalytical determination of tetracycline and sulfonamide residues in edible products. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 395(4), 907-920.
- Patricio-Roberto, G. B., Campos, M. J. O. (2014). Aspects of Landscape and Pollinators – What is Important to Bee Conservation? *Diversity*, 6(1), 158-175.
- Pérez, J. A. G. (2004). *Panorama actual de la química farmacéutica*. Universidad de Sevilla.
- Piao, Y. Z., Kim, Y. J., Kim, Y. A., Lee, H. S., Hammock, B. D., Lee, Y. T. (2009). Development of ELISAs for the Class-Specific Determination of Organophosphorus Pesticides. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57, 10004-10013.
- Porstmann, T., Kiessig, S. T. (1992). Enzyme immunoassay techniques an overview. *Journal of Immunological Methods*, 150(1-2), 5-21.
- Raison-Peyron, N., Messaad, D., Bousquet, J., Demoly, P. (2001). Anaphylaxis to beef in penicillin-allergic patient. *Allergy*, 56(8), 796-797.
- Raab, G. M. (1983). Comparison of a logistic and a mass-action curve for radioimmunoassay data. *Clinical Chemistry*, 29, 1757-1761.
- Ramos, L. (2012). Critical overview of selected contemporary sample preparation techniques. *Journal of Chromatography A*, 1221, 84-98.
- Reder-Christ, K., Bendas, G. (2011). Biosensor applications in the field of antibiotic research--a review of recent developments. *Sensors (Basel, Switzerland)*, 11(10), 9450-9466.
- Reyes, H., Guiscafré, H., Muñoz, O., Pérez-Cuevas, R., Martínez, H., Gutiérrez, G. (1997). Antibiotic noncompliance and waste in upper respiratory infections and acute diarrhea. *Journal of Clinical Epidemiology*, 50(11), 1297-1304.

- Rial-Otero, R., Gaspar, E. M., Moura, I., Capelo, J. L. (2007). Chromatographic-based methods for pesticide determination in honey: An overview. *Talanta*, 71(2), 503-514.
- Ritter, W. (2014). Las enfermedades de las abejas constituyen un problema de ámbito mundial. *Organización Mundial de Sanidad Animal*, Boletín N° 2014-2
- Robles-Molina, J., Lara-Ortega, F. J., Gilbert-López, B., García-Reyes, J. F., Molina-Díaz, A. (2014). Multi-residue method for the determination of over 400 priority and emerging pollutants in water and wastewater by solid-phase extraction and liquid chromatography-time-of-flight mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1350, 30-43.
- Rodríguez-Gonzalo, E., García-Gómez, D., Carabias-Martínez, R. (2010). A confirmatory method for the determination of phenolic endocrine disruptors in honey using restricted-access material-liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 398(3), 1239-1247.
- Rosner, M. H., Grassman, J. A., Haas, R. A. (1991). Immunochemical techniques in biological monitoring. *Environmental Health Perspectives*, 94, 131-134.
- Salisbury, J. G., Nicholls, T. J., Lammerding, A. M., Turnidge, J., Nunn, M. J. (2002). A risk analysis framework for the long-term management of antibiotic resistance in food producing animals. *Int. J. Animicrob. Agents*, 20, 153-164.
- Talero-Pérez YV, Medina OJ, Rozo-Núñez W. (2014). Técnicas analíticas contemporáneas para la identificación de residuos de sulfonamidas, quinolonas y cloranfenicol. *Universitas Scientiarum* 19(1): 11-28.
- Ruitenbergh, E. J., Steerenberg, P. A., Brosi, B. J. M., Buys, J. (1974). Serodiagnosis of *Trichinella spiralis* infections in pigs by enzyme-linked immunosorbent assays. *Bulletin of the World Health Organization*, 51(1), 108-109.
- Sarmah, A. K., Meyer, M. T., Boxall, A. B. A. (2006). A global perspective on the use, sales, exposure pathways, occurrence, fate and effects of

veterinary antibiotics (VAs) in the environment. *Chemosphere*, 65(5), 725-759.

Schirmer, C., Meisel, H. (2006). Synthesis of a molecularly imprinted polymer for the selective solid-phase extraction of chloramphenicol from honey. *Journal of Chromatography A*, 1132(1-2), 325-328.

Schnappinger, P., Usleber, E., Märtlbauer, E., Terplan, G. (1993). Enzyme immunoassay for the detection of streptomycin and dihydrostreptomycin in milk. *Food and Agricultural Immunology*, 5(2), 67-73.

Schubert-Ullrich, P., Rudolf, J., Ansari, P., Galler, B., Führer, M., Molinelli, A., Baumgartner, S. (2009). Commercialized rapid immunoanalytical tests for determination of allergenic food proteins: an overview. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 395(1), 69-81.

Sheridan, R., Policastro, B., Thomas, S., Rice, D. (2008). Analysis and Occurrence of 14 Sulfonamide Antibacterials and Chloramphenicol in Honey by Solid-Phase Extraction Followed by LC/MS/MS Analysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(10), 3509-3516.

Simpson, N. J. K. (2000). *Solid-Phase Extraction: Principles, Techniques, and Applications*. CRC Press.

Souza, C. D., Braga, O. C., Vieira, I. C., Spinelli, A. (2008). Electroanalytical determination of sulfadiazine and sulfamethoxazole in pharmaceuticals using a boron-doped diamond electrode. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 135(1), 66-73

Stancova, V., Plhalova, L., Bartoskova, M., Zivna, D., Prokes, M., Marsalek, P., ... Svobodova, Z. (2014). Effects of mixture of pharmaceuticals on early life stages of tench (*Tinca tinca*). *BioMed Research International*, 2014, ID 253468.

Stockwell, V. O., Duffy, B. (2012). Use of antibiotics in plant agriculture. *World Organisation for Animal Health, OIE Scientific and Technical Review*. Special Issue: Antimicrobial Resistance in Animal and Public Health, accepted Vol. 31(1).

- Stolker, A. A. M., Brinkman, U. A. T. (2005). Analytical strategies for residue analysis of veterinary drugs and growth-promoting agents in food-producing animals – a review. *Journal of Chromatography A*, 1067 (1-2), 15-53.
- Stolker, A. A. M., Rutgers, P., Oosterink, E., Lasaroms, J. J. P., Peters, R. J. B., van Rhijn, J. A., Nielen, M. W. F. (2008). Comprehensive screening and quantification of veterinary drugs in milk using UPLC-ToF-MS. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 391(6), 2309-2322.
- Strand, J. (1996). Tracing Patients in rural Africa. *The Lancet*, 348(9034), 1083-1084.
- Suri, C.R., Boro, R., Nangia, Y., Gandhi, S., Sharma, P., Wangoo, N., Rajesh, K., Shekhawat, G.S. (2009). Immunoanalytical Techniques for Analyzing Pesticides in the Environment. *Trends in Analytical Chemistry*, 28, 29-39.
- Swann, M. M., Baxter, K. L., ... Field, H. I. (1969) Report of the Joint Committee on the use of Antibiotics in Animal Husbandry and Veterinary Medicine. HMSO; London.
- Tadeo, J. L., Sánchez-Brunete, C., Pérez, R. A., Fernández, M. D. (2002). Analysis of herbicide residues in cereals, fruits and vegetables. *Journal of Chromatography A*, 882, 175-191.
- Talero-Pérez, Y. V., Medina, O. J., Rozo-Núñez, W. (2014). Técnicas analíticas contemporáneas para la identificación de residuos de sulfonamidas, quinolonas y cloranfenicol. *Universitas Scientiarum* 19(1):11-28
- Taylor, R. B., Shakoor, O., Behrens, R. H. (1995). Drug quality, a contributor to drug resistance? *Lancet*, 346(8967), 122.
- Thal, J., Steffen, M., Meier, B., Schneider, E., Adriany, A., Usleber, E. (2011). Development of an enzyme immunoassay for the antibiotic cefquinome and its application for residue determination in cow's milk after therapeutical mastitis treatment. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 399(3), 1051-1059.

- Thomson, C. A., Sporns, P. (1995). Direct ELISAs for Sulfathiazole in Milk and Honey with Special Emphasis on Enzyme Conjugate Preparation. *Journal of Food Science*, 60(2), 409-415.
- Tijssen, P. (1985). *Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology. Practice and Theory of Enzyme Immunoassays*. Elsevier.
- Tinkelman, D. G., Bock, S. A. (1984). Anaphylaxis presumed to be caused by beef containing streptomycin. *Annals of Allergy*, 53(3), 243-244.
- Toldrá, F., Reig, M. (2006). Methods for rapid detection of chemical and veterinary drug residues in animal foods. *Trends in Food Science and Technology*, 17(9), 482-489.
- Tollefson, L., Karp, B. E. (2004). Human health impact from antimicrobial use in food animals. *Mèd. Mal. Infect.* 34, 514-521.
- Uotila, M., Ruoslahti, E., Engvall, E. (1981). Two-site sandwich enzyme immunoassay with monoclonal antibodies to human alpha-fetoprotein. *Journal of Immunological Methods*, 42(1), 11-15.
- Urraca, J. L., Castellari, M., Barrios, C. A., Moreno-Bondi, M. C. (2014). Multiresidue analysis of fluoroquinolone antimicrobials in chicken meat by molecularly imprinted solid-phase extraction and high performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1343, 1-9.
- US EPA. (2012). Pharmaceuticals and Personal Care Products (PPCPs)
- Usleber, E., Lorber, M., Straka, M., Terplan, G., Märtilbauer, E. (1994). Enzyme immunoassay for the detection of isoxazolyl penicillin antibiotics in milk. *Analyst*, 119(12), 2765-2768.
- Valcárcel Cases, M., Gómez Hens, A. (1990). *Técnicas analíticas de separación*. Barcelona: Editorial Reverté, S.A.
- Valcárcel, M., Cárdenas, S., Gallego, M. (1999). Sample screening systems in analytical chemistry. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 18(11), 685-694.
- Van Boeckel, T. P., Brower, C., Gilbert, M., Grenfell, B. T., Levin, S. A., Robinson, T. P., ... Laxminarayan, R. (2015). Global trends in

- antimicrobial use in food animals. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112(18), 5649-5654.
- Vanhaecke, L., Gowik, P., Bizec, B. L., Ginkel, L. V., Bichon, E., Blokland, M., Brabander, H. F. D. (2011). European Analytical Criteria: Past, Present, and Future. *Journal of AOAC International*, 94(2), 360-372.
- Viñas, P., Campillo, N., López-García, I., Aguinaga, N., Hernández-Córdoba, M., (2002). Determination of pesticides in waters by capillary gas chromatography with atomic emission detection. *Journal of Chromatography A*, 978, 249-256.
- Voller, A., Huldt, G., Thors, C., Engvall, E. (1975). New serological test for malaria antibodies. *British Medical Journal*, 1(5959), 659-661.
- Walsh, C. (2000). Molecular mechanisms that confer antibacterial drug resistance. *Nature*, 406(6797), 775-781.
- Wang, S., Zhang, H. y, Wang, L., Duan, Z. J., Kennedy, I. (2006). Analysis of sulphonamide residues in edible animal products: A review. *Food Additives and Contaminants*, 23(4), 362-384.
- Wang, S., Ge, L., Li, L., Yan, M., Ge, S., Yu. J. (2013). Molecularly imprinted polymer grafted paper-based multi-disk micro-disk plate for chemiluminescence detection of pesticide. *Biosensors and Bioelectronics*, 50, 262-268.
- Wang, Z., Mi, T., Beier, R. C., Zhang, H., Sheng, Y., Shi, W., ... Shen, J. (2015). Hapten synthesis, monoclonal antibody production and development of a competitive indirect enzyme-linked immunosorbent assay for erythromycin in milk. *Food Chemistry*, 171, 98-107.
- Wegener, H. C. (2003). Antibiotics in animal feed and their role in resistance development. *Current Opinion in Microbiology*, 6(5), 439-445.
- WHO. (2003). Second joint FAO/OIE/WHO expert workshop on non-human antimicrobial usage and antimicrobial resistance: management options
- Wild, D. (2005). *The Immunoassay Handbook*. Gulf Professional Publishing.

- Wongtangprasert, T., Natakathung, W., Pimpitak, U., Buakeaw, A., Palaga, T., Komolpis, K., Khongchareonporn, N. (2014). Production of a monoclonal antibody against oxytetracycline and its application for oxytetracycline residue detection in shrimp. *Journal of Zhejiang University. Science. B*, 15(2), 165-172.
- Won, S.-Y., Chandra, P., Hee, T. S., Shim, Y.-B. (2013). Simultaneous detection of antibacterial sulfonamides in a microfluidic device with amperometry. *Biosensors and Bioelectronics*, 39(1), 204-209.
- Ritter, W. (2014). Las enfermedades de las abejas constituyen un problema de ámbito mundial. Boletín OIE Febrero de 2014.
- Xu, Z.L., Xie, G.M., Li, Y.X., Wang, B.F., Beier, R.C., Lei, H.T., Wang, H., Shen, Y.D., Sun, Y.M. (2009). Production and characterization of a broad-specificity polyclonal antibody for O,O-diethyl organophosphorus pesticides and a quantitative structure-activity relationship study of antibody recognition. *Analytica Chimica Acta*, 647, 90-96.
- Yalow, R. S., Berson, S. A. (1959). Assay of Plasma Insulin in Human Subjects by Immunological Methods. *Nature*, 184(4699), 1648-1649.
- Yang, Z.-Y., Shim, W.-B., Kim, M.-G., Lee, K.-H., Kim, K.-S., Kim, K.-Y., ... Chung, D.-H. (2007). Production and characterization of monoclonal and recombinant antibodies against antimicrobial sulfamethazine. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 17(4), 571-578.
- Yang, T., Ren, X., Li, Y., Chen, F. (2010). Development of a sensitive monoclonal antibody-based ELISA for the detection of sulfamethazine in cow milk, honey, and swine urine. *Hybridoma*, 29(5), 403-407.
- Ye, L., Haupt, K. (2004). Molecularly imprinted polymers as antibody and receptor mimics for assays, sensors and drug discovery. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 378(8), 1887-1897.
- Zhang, H., Duan, Z., Wang, L., Zhang, Y., Wang, S. (2006). Hapten synthesis and development of polyclonal antibody-based multi-sulfonamide immunoassays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(13), 4499-4505

- Zhang, H., Wang, L., Zhang, Y., Fang, G., Zheng, W., Wang, S. (2007). Development of an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Seven Sulfonamide Residues and Investigation of Matrix Effects from Different Food Samples. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(6), 2079-2084.
- Zhang, L., Liu, S., Cui, X., Pan, C., Zhang, A., Chen, F. (2012). A review of sample preparation methods for the pesticide residue analysis in foods. *Central European Journal of Chemistry*, 10(3), 900-925.
- Zheng, M.-M., Zhang, M.-Y., Peng, G.-Y., Feng, Y.-Q. (2008). Monitoring of sulfonamide antibacterial residues in milk and egg by polymer monolith microextraction coupled to hydrophilic interaction chromatography/mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, 625(2), 160-172.
- Zotou, A., Vasiliadou, C. (2006). Selective Determination of Sulfonamide Residues in Honey by SPE-RP-LC with UV Detection. *Chromatographia*, 64(5-6), 307-311.
- Zulin, Z., Huasheng, H., Xinhong, W., Jianqing, L., Weiqui, C., Li, X. (2002). Determination and load of organophosphorus and organochlorine pesticides at water from Jiulong River Estuary, China. *Marine Pollution Bulletin*, 45, 397-402.

**CAPÍTULO II**  
**OBJETIVOS Y PLANTEAMIENTOS GENERALES**



## 2. OBJETIVOS Y PLANTEAMIENTOS GENERALES

El uso de antimicrobianos para combatir enfermedades bacterianas de la cría de la abeja es una práctica generalizada en apicultura, siendo históricamente los más ampliamente utilizados los pertenecientes a la familia de las tetraciclinas y sulfonamidas. Un mal uso de estos medicamentos en el apiario puede dejar residuos en la miel, constituyendo un riesgo para la salud pública. Al considerar a la miel como un producto natural, la UE carece de legislación que establezca límites máximos para residuos de antimicrobianos en este alimento, prohibiendo en consecuencia su uso para el tratamiento de enfermedades bacterianas en la colmena, obligando al apicultor a destruirla en caso de contaminación de origen biótico. Sin embargo, otros países como Cuba, Chile o Argentina, sí disponen de un límite legislado, que para residuos de sulfonamidas se fija en  $0,1 \mu\text{g g}^{-1}$ .

En las últimas décadas, las importaciones mundiales han crecido debido al incremento en el consumo de productos naturales como la miel. La UE es deficitaria en miel y necesita importar aproximadamente, la mitad de la miel que consume, siendo Argentina el primer proveedor de la UE. En este sentido, las nuevas condiciones del mercado requieren la adopción de estrictos controles de calidad, desde el propio apiario hasta que el producto llega al consumidor, involucrando en su cumplimiento a todos los eslabones: apicultores, envasadores y comercializadores. *Así, es absolutamente necesario que el sector apícola disponga de herramientas analíticas de control adecuadas para cumplir con los objetivos reguladores y proteccionistas.*

En este sentido, el **objetivo general** de esta Tesis doctoral, ha sido el desarrollo de una metodología analítica sencilla, efectiva y rápida, aplicable al análisis de residuos de sulfonamidas en mieles, con el fin de diseñar una estrategia de análisis aplicable *in situ* y en laboratorio, que permita procesar un elevado número de muestras, garantizando la seguridad de la miel que entra al mercado alimentario.

La investigación se centrará en la puesta a punto de dos tipos de sistemas analíticos basados en los principios del inmunoensayo. Por un lado, el desarrollo

de ELISAs en formato de placa para ensayos en el laboratorio y, por otro, el desarrollo de tiras reactivas similares a las desarrolladas en química clínica, que permitan al usuario determinar *in situ* y en un tiempo inferior a 20 minutos, la cantidad de sulfatiazol presente en la muestra. En ambos casos, se realizará un estudio sistemático de la metodología experimental con el fin de conocer las condiciones óptimas de trabajo. Se prestará especial atención al comportamiento de los sistemas inmunoquímicos a desarrollar en condiciones reales, evaluando las posibles interferencias de la matriz y aplicando tratamientos de muestra adecuados con el fin de hacer compatible la extracción y determinación de las sulfonamidas, comparando los resultados obtenidos con los determinados por cromatografía.

Para alcanzar el objetivo general, se plantearon los siguientes **objetivos parciales**:

- (1) Desarrollar protocolos de inmunoensayo que permitan el análisis de residuos de sulfonamidas para el control agroalimentario.
- (2) Desarrollar métodos de extracción rápidos y con bajo consumo de disolventes orgánicos, que permitan la determinación de sulfonamidas objeto de estudio de forma fiable.
- (3) Validar los inmunoensayos y los métodos de extracción desarrollados.
- (4) Desarrollar nuevos formatos inmunoquímicos: Tiras reactivas en flujo lateral.
- (5) Aplicar la metodología desarrollada a la determinación de sulfonamidas en mieles.

Los sistemas desarrollados se aplicarán a la determinación -cualitativa y/o cuantitativa- de residuos de sulfonamidas en muestras de miel, con el fin de obtener información en tiempo real.

Todo ello permitirá disponer de una estrategia analítica de seguimiento de sulfonamidas en miel. Además, conllevará las siguientes ventajas:

- Simplificar los procedimientos de ensayo haciéndolos asequibles a personal no especializado.
- Mejorar la determinación de analitos inestables.
- Utilizar los protocolos de tratamiento de muestra establecidos en los métodos de referencia.
- Validar la metodología inmunoanalítica.
- Reducir el consumo de disolventes y reactivos.
- Disminuir el tiempo de ensayo y aumentar la capacidad de trabajo.
- Reducir costos.

Para establecer una secuencia lógica que permita abordar los objetivos planteados y facilite el seguimiento al lector, la presente memoria se ha dividido en tres capítulos.

1. Desarrollo y validación de un método cromatográfico de confirmación, basado en la técnica de HPLC acoplada a espectrometría de masas, para la determinación de residuos de sulfonamidas en muestras de miel.

2. Desarrollo de tres ELISAs en formato placa para ensayos de laboratorio, dos específicos para sulfatiazol, y otro genérico capaz de detectar seis sulfonamidas, que permitan analizar un elevado número de muestras, confirmando sólo las positivas por cromatografía.

3. Desarrollo de un inmunoensayo en flujo lateral como herramienta analítica aplicable *in situ*, que pueda ser utilizada como criterio de compra de miel bruta.

En cada uno de ellos, se recoge una pequeña introducción y estado del arte, así como los objetivos particulares de cada capítulo, junto con los resultados más relevantes obtenidos en cada uno de ellos.



### **CAPÍTULO III**

**DESARROLLO Y VALIDACIÓN DE UN MÉTODO DE CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA ACOPLADA A ESPECTROMETRÍA DE MASAS, PARA LA DETERMINACIÓN DE RESIDUOS DE SULFONAMIDAS EN MUESTRAS DE MIEL**



### 3. DESARROLLO Y VALIDACIÓN DE UN MÉTODO DE CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA ACOPLADA A ESPECTROMETRÍA DE MASAS, PARA LA DETERMINACIÓN DE RESIDUOS DE SULFONAMIDAS EN MUESTRAS DE MIEL

Como se ha comentado en el Capítulo I, aunque el último Reglamento (UE) 37/2010, relativo a las sustancias farmacológicamente activas, establece los límites máximos de residuos en los productos alimenticios de origen animal, sin embargo no recoge LMRs alguno para regular la presencia de sulfonamidas en muestras de miel. Ante este “vacío” legal, algunos países han tomado la iniciativa, estableciendo sus propias recomendaciones, incluso los Laboratorios de Referencias europeos en un intento de armonizar criterios, fijaron un límite orientativo de 50  $\mu\text{g kg}^{-1}$ .

Para detectar y confirmar de forma inequívoca la presencia de sulfonamidas en muestras de miel, se requiere de una metodología analítica de elevada selectividad y sensibilidad. Los métodos de referencias están basados en técnicas cromatográficas y en la bibliografía podemos encontrar numerosos métodos para determinar sulfonamidas por HPLC con detección fluorescente (Posyniak, Sniegocki y Zmudzki, 2002, Maudens, Zhang y Lambert, 2004, Tölgyesi y *col.*, 2013). Sin embargo, para cumplir con los requisitos de validación, es necesario que estén acoplados a espectrometría de masas (European Commission, 2002).

Atendiendo a los requisitos que establece la legislación, en las últimas décadas se han desarrollado gran variedad de métodos cromatográficos (LC-MS) para determinar residuos de sulfonamidas en muestras de miel (Heller y *col.*, 2002; Verzeznassi, Savoy-Perroud y Stadler, 2002; Hammel, Mohamed, Gremaud, LeBreton, y Guy, 2008; Giannetti, Longo, Buiarelli, Russo, y Neri, 2010; Economou, Petraki, Tsipi y Botitsi, 2012; Dmitrienko, Kochuk, Apyari, Tolmacheva y Zolotov, 2014; Venable, Haynes y Cook, 2014; Dubreil-Chéneau, Pirotais, Verdon y Hurtaud-Pessel, 2014).

### 3.1. OBJETIVOS

En base a lo expuesto en el Capítulo I, el **objetivo principal** y el plan de trabajo de este apartado se ha centrado en el desarrollo de una metodología analítica de referencia, aplicable al análisis de residuos de las sulfonamidas Sulfametoxipiridazina (SMP), Sulfadiazina (SDZ), Sulfatiazol (STZ), Sulfapiridina (SPD), Sulfamerazina (SMZ), Sulfametizol (SMT), Sulfametoxazol (SMX), Sulfisoxazol (SSX) y Sulfadimetoxina (SDM), en muestras de miel, basado en una extracción en fase sólida y posterior análisis por cromatografía HPLC-MS, que garantice una adecuada sensibilidad y permita cumplir con la legislación vigente.

Para el desarrollo de este objetivo general se han establecido los siguientes **objetivos parciales**:

1. Establecer un protocolo de extracción que permita recuperar elevadas concentraciones de las nueve sulfonamidas objeto de estudio, de una matriz compleja como la miel.
2. Validar la metodología HPLC-MS para la determinación y cuantificación simultánea de las nueve sulfonamidas, siguiendo los criterios de validación.
3. Estudiar el efecto de la matriz.
4. Aplicar la metodología desarrollada a la determinación de sulfonamidas en muestras de miel.

### 3.2. PARTE EXPERIMENTAL

#### 3.2.1. Reactivos químicos

Las nueve sulfonamidas objeto de estudio -Sulfametoxipiridazina (SMP), Sulfadiazina (SDZ), Sulfatiazol (STZ), Sulfapiridina (SPD), Sulfamerazina (SMZ), Sulfametizol (SMT), Sulfametoxazol (SMX), Sulfisoxazol (SSX) y Sulfadimetoxina (SMD)-, fueron suministradas por la empresa Fluka-Sigma-Aldrich (Madrid, España) (**Tabla I.3**).

Todos los disolventes orgánicos empleados (metanol, acetonitrilo, y ácido acético) fueron suministrados por Scharlab (Barcelona, España), siendo todos de grado analítico (calidad HPLC).

### **3.2.2. Instrumentación y equipamiento utilizados en la preparación de la muestra**

Se utilizó un cromatógrafo HPLC de Agilent 1100 (Agilent Technologies, Waldbronn, Alemania), equipado con una bomba binaria, desgasificador de vacío, automuestreador y compartimento termostatzado de columna, acoplado a un espectrómetro de masas con sistema de ionización por electrospray (ESI).

Se utilizó un protocolo de extracción en fase sólida (SPE) para el tratamiento de la muestra, utilizando un dispositivo de vacío VacElut adaptado para procesar simultáneamente 20 cartuchos (Varian, Palo Alto, CA, USA). Para la extracción en fase sólida se utilizaron cartuchos Sep-Pack®C<sub>18</sub> de Water (Milford, MA, USA).

La evaporación de los extractos se realizó bajo corriente de nitrógeno, utilizando un sistema automatizado de evaporación TurboVap® con suministro líquido de N<sub>2</sub> de Zymark (Hopkinton, MA, USA), que permite monitorizar y controlar la presión de nitrógeno y la temperatura del baño de agua.

El sistema de agua milli-Q (Millipore, Bedford, MA, USA) se empleó para obtener agua de grado HPLC, utilizada en los análisis y en la preparación de las disoluciones de trabajo. Todas estas disoluciones, una vez preparadas y antes de su empleo, se filtraron usando un filtro de nylon de 0,45 µm de poro.

Además, se utilizaron los siguientes equipos auxiliares: pH-metro GLP 22 (Crison, Barcelona); centrífuga con sistema de frío (Eppendorf-5804R, Alemania); baño de ultrasonidos (12,3 L de capacidad) de VWR International LLC (Radnor, PA, USA); agitador magnético (IKA, Staufen, Germany); balanza analítica digital (Sartorius, Madrid).

### 3.2.3. Preparación de las disoluciones estándar

#### 3.2.3.1. Disoluciones de los patrones de sulfonamidas

Se prepararon disoluciones estándar para cada sulfonamida en metanol, a una concentración de 100 mg L<sup>-1</sup>. El disolvente se seleccionó de acuerdo a la solubilidad de los analitos y a su compatibilidad con el proceso cromatográfico. Estas disoluciones estándar de cada uno de los analitos objeto de estudio, se almacenaron en frascos topacio a -20 °C y protegidas de la luz hasta su uso.

A partir de las disoluciones estándar, se prepararon disoluciones individuales en un rango de concentración de 1 a 50 mg L<sup>-1</sup>, diluyéndolas también en metanol. Además, se preparó una disolución patrón formada por una mezcla de las nueve sulfonamidas, en metanol, y al mismo rango de concentraciones que las individuales. Cada una de estas disoluciones se alicuotó en un vial ámbar, en volúmenes de aproximadamente 1,5 mL. Esto se hizo así para evitar la degradación de los analitos, ya que cada vez que se hace un ensayo, la disolución de trabajo debe estar a temperatura ambiente, y sucesivos cambios de temperatura producen la degradación de los analitos.

Por ello, diariamente se prepararon las disoluciones de trabajo (blanco, 5,0, 10, 25, 50, 100 and 200 µg kg<sup>-1</sup>), para la obtención de las correspondientes rectas de calibrado, mediante diluciones sucesivas en fase móvil, de las disoluciones individuales. Estas disoluciones de trabajo se conservaban en oscuridad hasta su uso, y al final del día se descartaban.

#### 3.2.3.2. Disoluciones tampón

Como disolución tampón se utilizó la combinación de ácido acético/acetato sódico, a concentración 0,1 M y pH = 5.

#### 3.2.3.3. Eluyentes de cromatografía

La mezcla de disolventes empleada para conseguir la elución completa de las nueve sulfonamidas estudiadas en esta tesis, con recuperaciones entorno al 100 %, consistió en usar la combinación de

metanol con un ácido, en concreto ácido acético, y las mezclas acuosas de dichos disolventes.

### 3.3. TRATAMIENTO DE MUESTRA. PROCEDIMIENTO DE EXTRACCIÓN DE SULFONAMIDAS EN MIEL

**Muestreo y conservación.** Las muestras de miel utilizadas fueron suministradas por ASEMIEL (Asociación Española de Envasadores de Miel). Consistían en muestras de miel brutas, tomadas en el punto donde las compañías recogen la muestra para llevar a cabo el control de calidad, es decir, antes de que la miel entre en el proceso industrial de envasado.

Todas las muestras de miel, una vez recepcionadas y codificadas, se almacenaban en oscuridad y a 4 °C. Está ampliamente descrito en bibliografía que los niveles de sulfonamidas en miel disminuyen con el tiempo cuando las muestras se almacenan a temperatura ambiente (Verzegnassi, Savoy-Perroudy Stadler, 2002). Esta aparente reducción se debe a la formación de aductos de glucosa (N<sub>4</sub>-glucopiranosil derivados) (Parks, 1984).

**Preparación de la muestra.** Es la etapa clave para la recuperación de los analitos objeto de estudio de la matriz, antes de su determinación. Una estrategia común en la preparación de muestras de miel para la determinación de sulfonamidas consiste en realizar una *hidrólisis* previa de la muestra que rompa esas uniones descritas anteriormente, y libere la mayor cantidad de sulfonamidas de la matriz, permitiendo así una estimación más exacta de la cantidad de sulfonamidas presente en la muestra (Maudens, Zhang y Lambert, 2004). La etapa de *extracción* que sigue a la hidrólisis es crucial para la recuperación y aislamiento de las sulfonamidas. En los últimos años se han desarrollado multitud de métodos basados en extracciones en fase sólida (SPE, *solid phase extraction*), utilizando fases de diferente naturaleza: fase sólida no-polar (Heller y *col.*, 2002; Hela, y *col.*, 2003), polar (Fuh y Chu, 2003; Shao y *col.*, 2005) de intercambio iónico (Stubbings y *col.*, 2005). La técnica SPE permite realizar en un mismo proceso, la extracción y purificación del analito, con la ventaja de reducir la cantidad de disolventes orgánicos.

En esta memoria de trabajo, la preparación de la muestra se realizó según el método descrito por Posinyak, con algunas variaciones (Posyniak, Sniegocki y Zmudzki, 2002). En primer lugar, se realiza la **hidrólisis** de la muestra de miel (1,5 g de muestra se disuelven en 12,5 mL de una solución de acetato sódico 1,2 M a pH 5,0), sumergiendo la mezcla en un baño de ultrasonidos durante 15 minutos, para conseguir así una buena homogeneización de la muestra y liberar las sulfonamidas de la matriz. A continuación, se centrifuga a 4.500 g durante 10 minutos y 4 °C, quedando lista la muestra para someterla al proceso de extracción. Como se detalló en la introducción, la SPE consta de cuatro etapas: *a)* acondicionamiento de los cartuchos de extracción SPE C<sub>18</sub> con 3 mL de metanol y 3 mL de agua; *b)* adición de la muestra sobre la columna de extracción; *c)* lavado con 3,0 mL de la solución tampón y 3,0 mL de agua y secado en condiciones de vacío durante 5 min; *d)* elución de las sulfonamidas retenidas con 3,0 mL de acetonitrilo. El extracto se evapora hasta sequedad a 45 °C bajo una corriente de nitrógeno, reconstituyéndolo con 1 mL de la fase móvil. Por último, se inyectan 20 µL en el sistema cromatográfico.

Este sistema de extracción se utilizó tanto para las muestras control (blancos), como para las enriquecidas con concentraciones conocidas de sulfonamidas, para realizar el proceso de validación de la metodología.

Para la validación del método analítico se preparó una mezcla de miel (*mix*) de 1 kg, formada por cuatro tipos de mieles (eucalipto, azahar, romero y tomillo), analizadas previamente para asegurarnos que están libres de residuos de sulfonamidas. Se seleccionaron estas variedades para abarcar un amplio rango de variabilidad en cuanto a características físico-químicas y color. Ante la ausencia de material de referencia certificado de miel, esto es una práctica común utilizada por varios autores para trabajar con un blanco de miel (Juan-Borrás, Periche, Domenech y Escriche, 2015).

### 3.4. CONDICIONES CROMATOGRÁFICAS PARA EL ANÁLISIS DE SULFONAMIDAS

#### 3.4.1. Condiciones de la cromatografía líquida de alta resolución

La separación cromatográfica de las sulfonamidas se realizó en una columna Zorvax C<sub>18</sub>, con una longitud de 50 mm, un tamaño de partícula de 3,5 µm, y un diámetro interno de 2,1 mm. Este diámetro interno permite la utilización de flujos compatibles con ESI, sin necesidad de realizar *splitless*.

El sistema de elución utilizado consistió en un gradiente binario cuyos disolventes y flujo utilizados aparecen reflejados en la **Tabla III.1**. Todas las disoluciones fueron filtradas en un filtro de nylon (0,45 µm tamaño de poro) antes de su uso. Transcurridos los 15 minutos necesarios para obtener todos los picos cromatográficos, el sistema siempre se retornó a condiciones iniciales, que se mantuvieron durante 10 minutos para equilibrar la columna, previo a la siguiente inyección.

**Tabla III.1.:** *Gradiente utilizado en el método de determinación de sulfonamidas en miel.*

| Tiempo(minutos) | % Solvente A | % Solvente B | Flujo(ml/min) |
|-----------------|--------------|--------------|---------------|
| 0               | 100          | 0            | 0,4           |
| 12              | 50           | 50           | 0,4           |
| 14              | 0            | 100          | 0,4           |
| 16              | 100          | 0            | 0,4           |
| 25              | 100          | 0            | 0,4           |

*solvente A = 0,5 % ácido acético/5 % metanol, v/v; solvente B = metanol.*

#### 3.4.2. Condiciones del espectrómetro de masas

La detección se llevó a cabo mediante un espectrómetro de masas trabajando en electrospray y en modo positivo (ESI<sup>+</sup>), que es un modo de ionización suave que origina iones protonados [M<sup>+</sup>H]<sup>+</sup>. Las condiciones generales de la fuente ESI, interfase y analizador fueron optimizadas para

garantizar la correcta formación del spray, y la adecuada detección de las moléculas (**Tabla III.2**).

Así, utilizando el sistema de espectrometría de masas descrito se evaluaron los espectros de los analitos en modo de barrido completo (*full scan*), operando en un rango de  $m/z$  desde 90 a 400, aplicando un tiempo de ciclo de 2 s, con un tiempo de permanencia de 0,1 s y una pausa entre cada exploración de 5 ms. Con el fin de aumentar la sensibilidad, la cuantificación se realizó mediante la reacción de monitorización (SRM), seleccionando la masa correspondiente a la señal de SRM más intensa (ión padre),  $m/z$  156 ( $[\text{H}_2\text{NPhSO}_2]^+$ ) para el análisis cuantitativo, mientras que la segunda señal de transición de SRM (ión hijo) se utilizó para la confirmación de analito. Para la detección de cada uno de los compuestos se seleccionaron dos transiciones formadas por la combinación “ión padre-ión hijo”. Así, la relación  $m/z$  de 108 correspondiente a ( $[\text{H}_2\text{NPhO}]^+$ ) sirvió para ocho de las nueve sulfonamidas, mientras que la relación  $m/z$  113  $[\text{M}^+\text{H}-155]^+$ , se seleccionó para SSX.

**Tabla III.2.:** Valores de los parámetros seleccionados en el espectrómetro de masas.

| Parámetro               | Valor                    |
|-------------------------|--------------------------|
| Voltaje del capilar     | 110,2 volt               |
| Lente 1                 | 6,8 volt                 |
| Lente 2                 | -60 volt                 |
| Amplitud del octopolo   | 143,8 Vpp                |
| Flujo del nebulizador   | 40 psi                   |
| Flujo gas secado        | 10 L min <sup>-1</sup>   |
| Monitorización de masas | Intervalo 90 - 400 $m/z$ |

### 3.5. ESTUDIO DE LA VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO

La validación de un método analítico es un paso fundamental para asegurar que los resultados obtenidos por dicho método son fiables. Como ya se ha indicado, la finalidad que se busca al realizar la validación de un

método analítico es poder determinar, con fundamento estadístico, que el método es adecuado para los fines previstos.

El método desarrollado fue validado siguiendo el procedimiento normalizado que recoge la Guía Europea SANCO/2004/2726 (SANCO/2004/2726) para la aplicación de la Decisión de la Comisión Europea 2002/657/EC (European Commission, 2002). Esta normativa establece que para los métodos de confirmación cuantitativos, es necesario evaluar: (1) especificidad/selectividad, (2) exactitud, (3) estabilidad y robustez, (4) límite de decisión ( $CC\alpha$ ) y capacidad de detección ( $CC\beta$ ), (5) respuesta lineal.

Con el objetivo de minimizar la carga de trabajo, el procedimiento de validación se diseñó de tal forma que un mismo experimento sirviese para determinar diferentes parámetros. Al no disponer de material de referencia certificado, se utilizó miel libre de las sulfonamidas (previamente analizada por HPLC), para realizar los enriquecimientos con concentraciones conocidas, a partir de los patrones elaborados.

### **3.5.1. Especificidad o Selectividad**

Para el estudio de la especificidad/selectividad del método desarrollado, se analizaron 20 muestras de miel de distinta procedencia, tanto libres de sulfonamidas (muestras control), como enriquecidas con los analitos de estudio, con la finalidad de estudiar posibles interferencias (señales, picos, indicios de iones) en la región de interés en la que cabe esperar la elución de los analitos objeto de estudio. Todas estas muestras se sometieron al mismo procedimiento analítico.

### **3.5.2. Exactitud**

La exactitud del método se establece determinando la veracidad y precisión. Cuando no se dispone de material de referencia certificado, la veracidad se determina mediante un estudio de la recuperación, que consiste en medir el porcentaje de concentración real recuperado de una sustancia durante el procedimiento analítico, y se expresa como porcentaje

de recuperación. La precisión hace referencia al grado de proximidad entre los valores obtenidos para una serie de medidas a la misma concentración, preparadas y analizadas bajo las mismas condiciones, y se expresa como desviación estándar relativa (RSD).

El enriquecimiento de la miel se efectuó a cuatro niveles de concentración (5, 10, 50 y 100  $\mu\text{g kg}^{-1}$ ), utilizándose la disolución estándar de trabajo que contenía la mezcla de todos los analitos. Se realizaron seis repeticiones para cada uno de los niveles de concentración. Para cada analito, la recuperación se determinó comparando el valor de concentración obtenido en la curva de calibración individual, con el valor real al que se hizo el dopaje. Además, los porcentajes de recuperación son una buena medida para evaluar la eficiencia del tratamiento de la muestra.

La precisión del método desarrollado se evaluó a dos niveles:

- Repetibilidad intra-día
- Repetibilidad inter-día

La precisión intra-día expresa la precisión bajo las mismas condiciones en un corto periodo de tiempo, y para determinarla se utilizaron seis muestras de miel por nivel, dopadas a los mismos niveles que en el estudio de recuperación, y extraídas en el mismo día justo antes del análisis.

Por el contrario, la precisión inter-día expresa las variaciones bajo distintas condiciones (distintos días, analistas, equipos...), por lo que se realizó el experimento diseñado para la precisión intra-día en dos días consecutivos, evaluando así las posibles variaciones en distintos días. Ambos niveles de precisión se expresaron como desviación estándar (RSD), midiendo la dispersión entre los distintos valores obtenidos.

### 3.5.3. Estabilidad y Robustez

Para evaluar la estabilidad se controlaron las condiciones de almacenamiento (temperatura, ausencia de luz, humedad...) de los analitos y muestras de miel. Para comprobar la robustez de la metodología, se utilizaron muestras de miel de distintas características y orígenes geográficos.

#### 3.5.4. Límite de decisión ( $CC\alpha$ ) y Capacidad de detección ( $CC\beta$ )

La Decisión 2002/657/EC establece que para aquellas sustancias que no tienen establecido un LMR, existen dos procedimientos para calcular el límite de decisión ( $CC\alpha$ ): *i*) el procedimiento de la curva de calibración según está descrito en la norma ISO 11843, *ii*) el análisis de al menos 20 muestras blancas de miel, para determinar la señal-ruido en el periodo de tiempo en el que se esperan los espectros de los analitos.

En nuestro trabajo el  $CC\alpha$  se calculó siguiendo las indicaciones de la primera opción, (i), utilizando los datos obtenidos en los ensayos de exactitud y precisión para construir las curvas de calibrado. El límite de decisión se calculó en muestras de miel sin sulfonamidas, enriquecidas a la concentración más baja a la que se evaluaron tanto la exactitud como la precisión (5 mg kg<sup>-1</sup>). Una vez analizadas las muestras, la señal se representó frente a la concentración de sulfonamida añadida, y el  $CC\alpha$  se calculó como la concentración en el punto de intersección de la ordenada en el origen más 2,33 veces la desviación estándar (SD) de la reproducibilidad dentro del laboratorio. La capacidad de detección,  $CC\beta$ , se calculó como  $CC\alpha + 1,64$  SD de la reproducibilidad dentro del laboratorio al  $CC\alpha$ .

En el trabajo de investigación realizado por Giannetti, Longo, Buiarelli, Russo, y Neri, (2010), se calcula el  $CC\alpha$  a la concentración más baja en la que se ensayaron exactitud y precisión. De esta forma, el valor del  $CC\alpha$  es la concentración del nivel más bajo de la curva de calibración más 2,33 veces la desviación estándar a este nivel (intra-laboratorio). Y el valor de  $CC\beta$  se calcula como  $CC\alpha + 1,64$  SD de la reproducibilidad dentro del laboratorio al  $CC\alpha$ .

#### 3.5.5. Respuesta lineal

La respuesta lineal del método se evaluó en el rango de concentraciones de 0-200 µg kg<sup>-1</sup>, incluyendo siete niveles en la construcción de la curva, tanto en fase móvil como en matriz. Para cada uno de los niveles de concentración se realizaron tres pinchazos. Cada día de trabajo se

preparó una curva nueva y se calculó el coeficiente de regresión ( $r^2$ ) para cada compuesto. Se consideraron aceptables valores de  $r^2 \geq 0.99$ .

### 3.6. ESTUDIO DEL POSIBLE EFECTO DE LA MATRIZ. PROBLEMÁTICA EN LA DETERMINACIÓN DE SULFONAMIDAS EN MUESTRAS DE MIEL POR LC-MS

Cuando se desarrolla un método cuantitativo con un sistema LC-MS, un problema que suele aparecer es el efecto de la matriz, que consiste en un aumento o disminución no esperado de la respuesta de los analitos objeto de estudio, debido a la coelución de otros componentes extraídos de la muestra, presentes en la matriz (Smeraglia, Baldrey y Watson, 2002; Furey, Moriarty, Bane, Kinsella y Lehane, 2013).

El efecto matriz se relaciona con la fuente de ionización, siendo la ionización mediante ESI más susceptible a este fenómeno según queda recogido en la bibliografía (King, Bonfiglio, Fernandez-Metzler, Miller-Stein y Olah, 2000; Annesley, 2003; Volmer y Jessome 2006; Trufelli, Palma, Famigliini y Cappiello, 2011). Este efecto matriz puede repercutir negativamente en la exactitud y precisión de los resultados analíticos (Matuszewski, Constanzer y Chavez-Eng, 1998, 2003), limitando la validez de los resultados cuantitativos. Por lo tanto, es importante incluir en la validación de un método analítico por LC-MS, el estudio del efecto de cada uno de los analitos diana sobre la matriz estudiada.

La principal estrategia utilizada para determinar el alcance del efecto de la matriz consiste en establecer una comparación entre la respuesta de los analitos en disolvente, en nuestro caso fase móvil, y los valores obtenidos al analizar muestras control de miel enriquecidas a la misma concentración con los analitos post-extracción, (Hammel, Mohamed, Gremaud, Le Breton y Guy, 2008; Vidal, Aguilera-Luiz, Romero-González y Frenich, 2009; Dubreil-Chéneau, Pirotais, Verdon y Hurtaud-Pessel, 2014; Galarini, Saluti, Giusepponi, Rossi y Moretti, 2015).

Además, debido a la variabilidad que puede aparecer en la composición de muestras de miel de distintas variedades, el grado del efecto matriz puede variar, por lo que es necesario emplear varios tipos de mieles. En este trabajo, para estudiar el efecto matriz se seleccionaron cuatro

tipos de mieles ( $n=4$ ), así como una muestra control elaborada a partir de todas ellas. Estas mieles fueron seleccionadas en base a diferentes características de color y textura, de forma que se cubriese un amplio rango de variabilidad. Se realizaron curvas de calibrado en fase móvil y en cada uno de los extractos obtenidos de los distintos tipos de miel seleccionados, así como sobre la mezcla de mieles. Las muestras a extraer (fase móvil o miel), se enriquecieron a siete niveles (0, 5; 10; 25; 50; 100 y 200  $\text{mg kg}^{-1}$ ), por triplicado. Tras someterlas al proceso de análisis, se representó la concentración de cada sulfonamida frente al área de pico, realizándose un análisis de regresión lineal para comparar los resultados.

Se compararon las pendientes de las gráficas de calibrado obtenidas en fase móvil para los estándares y las construidas adicionando estándar directamente a la matriz extraída, tanto de las muestras individuales de miel como de la grupal (mezcla de las cuatro). A partir de las respuestas obtenidas se calculó el porcentaje de respuesta del analito en la matriz frente al patrón en disolvente sin matriz, como si de una recuperación se tratara. Si el porcentaje obtenido se encuentra por debajo o por encima del 100 %, se trata de una subestimación o bien una sobreestimación de la respuesta, respectivamente.

Para corregir el efecto de la matriz, se utilizan habitualmente dos alternativas: *a*) compensar el efecto matriz mediante el uso de un patrón interno o cuantificación mediante calibrado en matriz; *b*) eliminación de los interferentes que generan el efecto matriz (EM) mediante un pretratamiento adecuado de la muestra, o bien, mejorar las condiciones cromatográficas para una mejor separación entre interferentes y analitos.

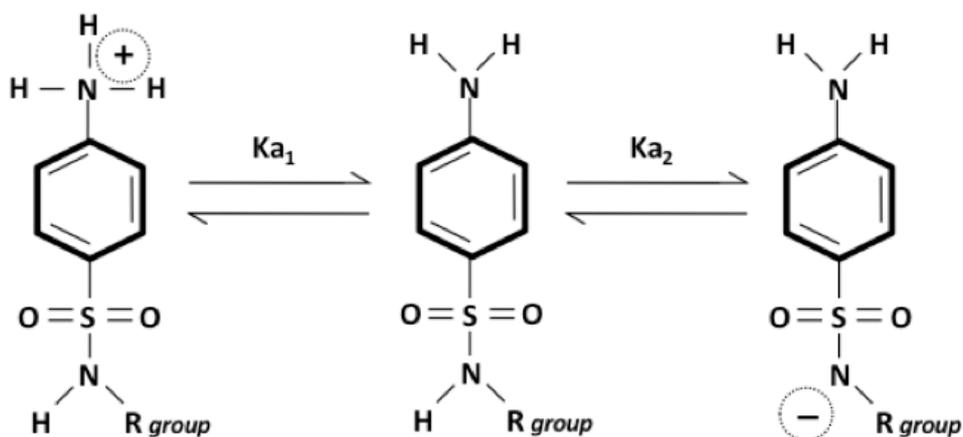
En este trabajo se ha evaluado la corrección del EM mediante la realización de calibrados en extractos blancos de la matriz. La finalidad de esta aproximación es la de conseguir una calibración correcta que permita cuantificar de forma precisa la concentración de sulfonamidas en las muestras. El principal inconveniente que tiene esta aproximación radica en disponer de una muestra (blanco) "ausente" de residuos de sulfonamidas. En nuestro caso, como se utilizaron blanco muestras que se analizaron previamente y estaban libres de de residuos de sulfonamidas. Es importante

resaltar que esta aproximación no elimina el EM, sólo lo corrige para permitir una cuantificación correcta.

### 3.7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 3.7.1. Optimización del tratamiento de la muestra

La solubilidad de las sulfonamidas en ácidos y álcalis está condicionada por sus propiedades anfóteras. Así, si nos fijamos en su estructura (**Figura III.1**), el grupo amino les confiere propiedades básicas ( $pK_{a1}$  1,5-2,9), mientras que el grupo amida, que contiene un átomo de hidrógeno lábil, les aporta propiedades ácidas ( $pK_{a2}$  5.0-8.5).



**Figura III.1.:** Propiedades anfóteras de las sulfonamidas.

Las propiedades ácidas de las sulfonamidas son más pronunciadas que sus propiedades básicas, y por lo tanto las sulfonamidas tienen carga positiva en medio ácido a  $\text{pH} < 2$ , neutro a  $\text{pH} 3-5$ , soportando una carga negativa a  $\text{pH} > 5$  (Huang y *col.*, 2012).

Así, para la recuperación de las sulfonamidas de muestras de miel, un enfoque comúnmente aplicado implica el empleo de diferentes extractantes como disolventes orgánicos o bien soluciones tampón, seguido de una extracción en fase sólida (SPE) (Dmitrienko, Kochuk, Apyari, Tolmacheva y Zolotov, 2014). Según se describe en la bibliografía citada anteriormente, la

fase sólida C<sub>18</sub> ofrece buenos resultados para la precocentración y separación de sulfonamidas en muestras de miel, utilizando Sep-Pack® C<sub>18</sub> en esta fase. Se evaluaron distintos disolventes de extracción: acetonitrilo, metanol, así como las mezclas binarias de ellos y diferentes diluciones tampón. Se evaluó la eficacia de la solución de extracción, siendo el tampón acetato el de mayor eficacia de extracción, permitiendo recuperar mayores concentraciones de sulfonamidas (Posyniak *col.*, 2002).

Seleccionado el agente extractante, se realizaron diferentes extracciones modificando el pH del tampón acetato (2,5; 5,0; 6,5 y 7,5), seleccionando el que proporcionara mejores recuperaciones de las diferentes sulfonamidas objeto de estudio. Para ello, 1 kg de miel sin sulfonamidas (control), fue enriquecida a 100 µg kg<sup>-1</sup> con la mezcla del patrón de sulfonamidas. Tras someterlas al proceso de extracción (a diferentes pHs), los valores de las diferentes sulfonamidas presentes en los extractos se determinaron por LC-MS. Se observó que cuando el pH del tampón está por debajo de 3 o por encima de 5 no se obtenían buenos resultados de recuperación (inferiores al 65 % para la mayoría de sulfonamidas), ya que se encuentran ionizadas. Estos datos concuerdan con los recogidos en bibliografía (Huangy *col.*, 2012; Tölgyesi y *col.*, 2013). Así, se fijó el pH del tampón acetato en 5,0, ya que a pesar de la gran diferencia de pKa de las sulfonamidas objeto de estudio, permita la extracción óptima de todas ellas, con valores de recuperación en el intervalo 75 %-104 %.

A pH 5,0, los analitos objeto de estudio se encuentran en forma neutra, lo que se traduce en una mejora en la retención en el Sep-Pack® C<sub>18</sub>.

En resumen, el empleo de cartuchos Sep-Pack® C<sub>18</sub> junto con un tampón acetato a pH de 5,0, se seleccionó para la extracción simultánea de las nueve sulfonamidas.

### 3.7.2. Desarrollo de la metodología LC-MS

En la caracterización de sulfonamidas por LC-MS, diferentes autores utilizan la ESI en modo positivo (Economou, Petraki, Tsipi y Botitsi, 2012; Vidal y *col.*, 2009) o en modo negativo, (Sheridan, Policastro, Thomas y Rice, 2008). En esta memoria se ha utilizado la ESI en modo positivo para los

analitos objeto de estudio, ya que la ESI en modo negativo proporciona una menor sensibilidad (Economou y *col.*, 2012).

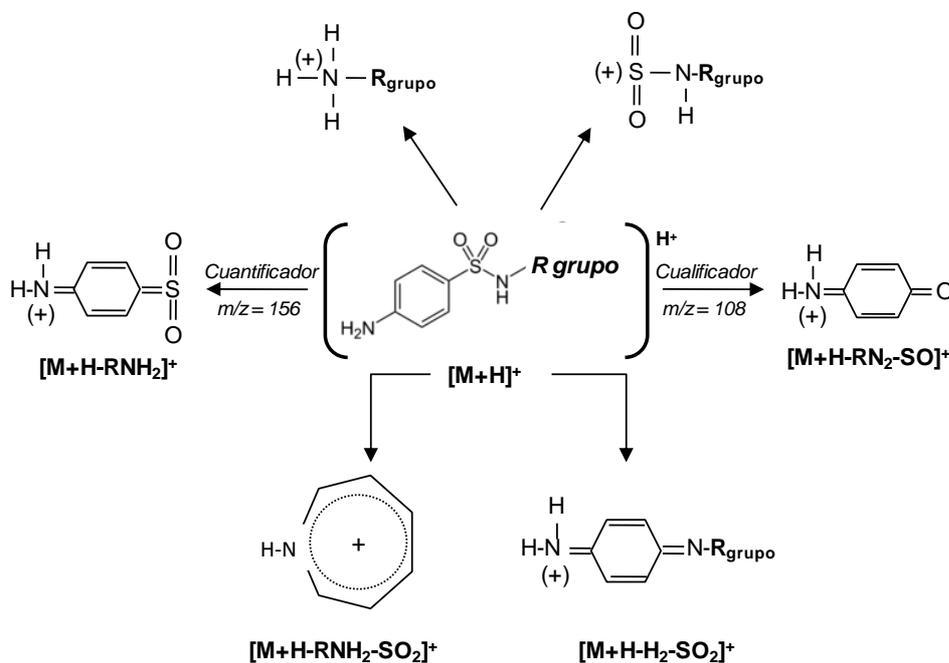
Las sulfonamidas muestran en general espectros de masas simples por ESI. Las únicas especies que se forman al emplear una fase móvil ácida son moléculas protonadas, y se han seleccionado los iones moleculares y los dos fragmentos más intensos para la adquisición de datos (**Tabla I.3**). Esto se ha hecho así para cumplir los requisitos de la UE (Decisión 2002/657/EC), que establece que para sustancias del anexo I de la Directiva 96/23/CE, los métodos analíticos deben incluir 4 puntos de identificación (IPs) por compuesto para asegurar su presencia en una muestra, aportando información sobre la estructura química del analito.

Las estructuras químicas y los pesos moleculares de las sulfonamidas estudiadas se muestran en la **Tabla I.3**. La única diferencia que se observa entre todos estos compuestos reside en el radical R, de forma que los espectros ESI-MS obtenidos de cada uno de ellos, sólo se diferencian en el radical heterocíclico (**Figura III.2**). Estos iones se forman cuando se escinde el enlace entre los átomos de azufre y de nitrógeno, y la carga se asocia con el fragmento ( $[\text{H}_2\text{NPhSO}_2]^+$ )  $m/z$  156. La pérdida de  $\text{SO}_2$  para dar el carbocatión anilina ( $[\text{H}_2\text{NPh}]^+$ ) ( $m/z$  92) también es factible. El proceso de reordenación da el fragmento ( $[\text{H}_2\text{NPhO}]^+$ )  $m/z$  108.

También se observan iones específicos cuando la carga es retenida por la amina heteroaromática que contiene el grupo R

Cuando la carga es retenida por la amina heteroaromática que contiene el grupo (R), se observa la formación de compuestos iónicos específicos. Por ejemplo se observan iones como  $[\text{R-NH}_3]^+$  (corresponde a la pérdida de  $\text{HNPhSO}_2$ ) y  $[\text{R-NHSO}_3]^+$  (corresponde a la pérdida de anilina), de baja intensidad, para todas las sulfonamidas. Además, el ión correspondiente a  $[\text{M}+\text{H}-155]^+$  se observó en los espectros de masas de SMP y SSX, lo que lleva a la aparición de un ion específico ( $m/z$  113) para SSX.

El ión molecular  $[\text{M}+\text{H}-93]^+$  se observó en los espectros de masas de SMZ, SMP, SMX, SSX y SMD, y el ion  $[\text{M}+\text{H}-66]^+$  en STZ, SPD, SMP, SMX y SMD, y probablemente corresponden a  $[\text{O}_2\text{SNHR}]$  y  $[\text{M}+\text{H}-\text{H}_2\text{SO}_2]^+$ .



**Figura III.2.:** Patrón de fragmentación tentativo de las sulfonamidas ensayadas, en base al espectro de iones obtenido.

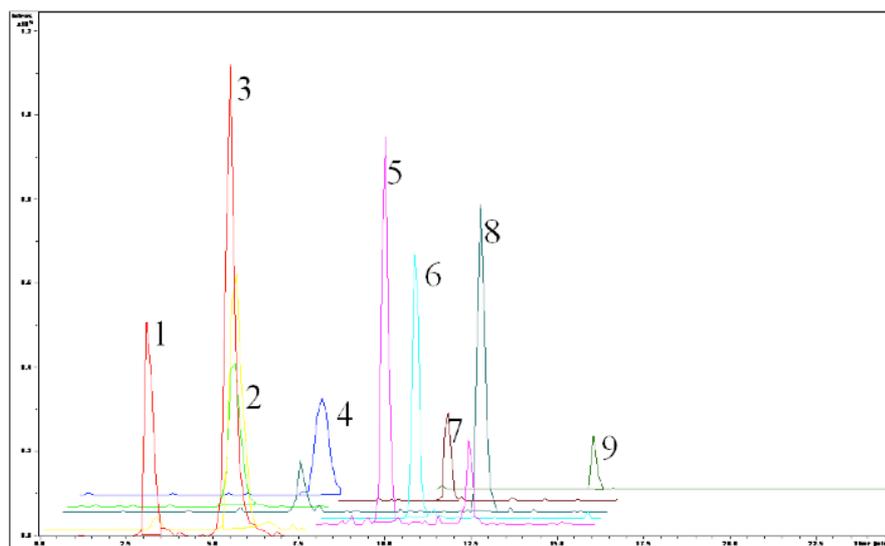
### 3.7.3. Validación del método analítico

Para la determinación de residuos de medicamentos veterinarios en alimentos de origen animal, la legislación en materia de métodos analíticos, exige una mayor selectividad y sensibilidad, junto con la confirmación de los resultados, lo que implica que cualquier método de análisis debe ser validado antes de ser aplicado a muestras reales, de acuerdo con los criterios establecidos en la Decisión 2002/657/CE de la Comisión.

#### 3.7.3.1. Especificidad del método

Para los métodos analíticos, el poder de discriminación entre el analito y las sustancias que interfieran en su determinación es esencial. Así, la especificidad se evaluó mediante la comparación de 20 cromatogramas

obtenidos a partir del análisis de la correspondiente muestra de miel sin sulfonamidas (control) y los obtenidos de la miel en enriquecida con las nueve sulfonamidas. La **Figura III.3**, muestra un cromatograma típico de la muestra de miel enriquecida con 100 mg kg<sup>-1</sup> de la solución estándar de las nueve sulfonamidas.



**Figura III.3.:** Cromatograma correspondiente a una muestra de miel enriquecida con las nueve sulfonamidas a 100 mg kg<sup>-1</sup>. Picos: 1 (SDZ), 2 (STZ), 3 (SPD), 4 (SMZ), 5 (SMT), 6 (SMP), 7 (SMX), 8 (SSX), 9 (SMD).

La ausencia de picos cromatográficos próximos al tiempo de retención de los compuestos objeto de estudio, muestra que el método desarrollado está libre de interferencias endógenas, no estando comprometida la identificación ni cuantificación de los analitos.

### 3.7.3.2. Exactitud y precisión

Los datos sobre la exactitud (% Recuperación) y precisión (RSD) del método se recogen en la Tabla III.5.

**Tabla III.3.:** Resultados obtenidos en el estudio de exactitud y precisión.

| Analito                        | Concentración añadida   |             |                   |              | Concentración añadida          |             |                   |              |             |
|--------------------------------|-------------------------|-------------|-------------------|--------------|--------------------------------|-------------|-------------------|--------------|-------------|
|                                | 5 $\mu\text{g kg}^{-1}$ |             |                   |              | 10 $\mu\text{g kg}^{-1}$       |             |                   |              |             |
|                                | <i>Detectado</i>        | <i>S.D.</i> | <i>R.S.D. (%)</i> | <i>R (%)</i> | <i>Detectado</i>               | <i>S.D.</i> | <i>R.S.D. (%)</i> | <i>R (%)</i> |             |
| SDZ                            | 4,97                    | 0,02        | 0,43              | 99,4         | 10,50                          | 1,06        | 9,22              | 105,0        |             |
| STZ                            | 5,02                    | 0,01        | 0,28              | 100,4        | 9,05                           | 0,67        | 7,42              | 90,5         |             |
| SPD                            | 4,87                    | 0,09        | 1,89              | 97,4         | 8,97                           | 0,73        | 8,12              | 89,7         |             |
| SMZ                            | 4,80                    | 0,14        | 2,95              | 96,0         | 10,30                          | 0,21        | 2,06              | 103,0        |             |
| SMT                            | 4,86                    | 0,10        | 2,04              | 97,2         | 10,80                          | 1,27        | 10,79             | 108,0        |             |
| SMP                            | 4,92                    | 0,06        | 1,15              | 98,4         | 10,60                          | 1,84        | 14,59             | 106,0        |             |
| SMX                            | 4,69                    | 0,22        | 4,67              | 93,8         | 10,50                          | 0,35        | 3,37              | 105,0        |             |
| SSX                            | 4,86                    | 0,10        | 2,04              | 97,2         | 8,60                           | 0,99        | 11,51             | 86,0         |             |
| SMD                            | 4,80                    | 0,14        | 2,95              | 96,0         | 9,70                           | 0,21        | 2,19              | 97,0         |             |
| <i>Recuperación global (%)</i> |                         |             |                   | <b>97,3</b>  | <i>Recuperación global (%)</i> |             |                   |              | <b>98,9</b> |

|                                | Concentración añadida    |             |                   |              | Concentración añadida          |             |                   |              |             |
|--------------------------------|--------------------------|-------------|-------------------|--------------|--------------------------------|-------------|-------------------|--------------|-------------|
|                                | 50 $\mu\text{g kg}^{-1}$ |             |                   |              | 100 $\mu\text{g kg}^{-1}$      |             |                   |              |             |
|                                | <i>Detectado</i>         | <i>S.D.</i> | <i>R.S.D. (%)</i> | <i>R (%)</i> | <i>Detectado</i>               | <i>S.D.</i> | <i>R.S.D. (%)</i> | <i>R (%)</i> |             |
| SDZ                            | 51,75                    | 1,24        | 2,39              | 103,5        | 95,3                           | 3,32        | 3,49              | 95,3         |             |
| STZ                            | 51,63                    | 1,15        | 2,23              | 103,3        | 96,2                           | 2,69        | 2,79              | 96,2         |             |
| SPD                            | 52,70                    | 4,74        | 8,36              | 105,4        | 101,4                          | 0,99        | 0,98              | 101,4        |             |
| SMZ                            | 49,10                    | 0,64        | 1,30              | 98,2         | 92,7                           | 5,16        | 5,57              | 92,7         |             |
| SMT                            | 51,00                    | 0,71        | 1,39              | 102,0        | 94,8                           | 3,68        | 3,88              | 94,8         |             |
| SMP                            | 50,30                    | 6,58        | 11,09             | 100,6        | 90,7                           | 6,58        | 7,25              | 90,7         |             |
| SMX                            | 50,10                    | 0,07        | 0,14              | 100,2        | 93,8                           | 4,38        | 4,67              | 93,8         |             |
| SSX                            | 53,10                    | 5,73        | 9,86              | 106,2        | 95,5                           | 3,18        | 3,33              | 95,5         |             |
| SMD                            | 51,00                    | 0,71        | 1,39              | 102,0        | 96,2                           | 2,69        | 2,79              | 96,2         |             |
| <i>Recuperación global (%)</i> |                          |             |                   | <b>102,4</b> | <i>Recuperación global (%)</i> |             |                   |              | <b>95,2</b> |

Las recuperaciones de todos los compuestos ensayados estuvieron por encima de 90 %, a excepción de SSX y SPD a 10  $\text{mg kg}^{-1}$ . Los resultados obtenidos se ajustan a la Decisión de la Comisión 2002/657/CE, que establece un intervalo de -20 % a +10 % para valores de concentración  $\geq 10\mu\text{g kg}^{-1}$  y de -30 % a +10 %, para las concentraciones  $> 1\mu\text{g kg}^{-1}$  a  $< 10\mu\text{g kg}^{-1}$ .

La precisión (RSD) de las nueve sulfonamidas a las cuatro concentraciones evaluadas osciló entre 0,28 % y 14,59 %. Los valores más altos se obtuvieron para SMX (4,67 %) a la concentración de 5 mg kg<sup>-1</sup>, y para SMP: (14,59 %) a 10 mg kg<sup>-1</sup>, (11,09 %) para una concentración de 50 mg kg<sup>-1</sup> y (7,25 %) a 100 mg kg<sup>-1</sup>.

Respecto a los análisis de precisión para estudiar la repetibilidad intra-día e inter-día, la Decisión de la Comisión 2002/657 establece que para concentraciones inferiores a 100 µg kg<sup>-1</sup> los coeficientes de variación (CV) serán lo más bajos posible, y para valores de 100 µg kg<sup>-1</sup> el CV será < 23 %. En el caso de reproducibilidad (inter-día), para todos los compuestos ensayados este parámetro estaba por debajo del valor requerido (inferior a 20 %). En resumen, el método aquí propuesto muestra una buena precisión (repetibilidad y reproducibilidad).

#### 3.7.3.3. Estabilidad y Robustez

Los estudios de estabilidad se investigaron en las condiciones de preparación de la muestra y en condiciones normales de almacenamiento.

#### 3.7.3.4. Límite de decisión y Capacidad de detección

Durante años se ha utilizado el concepto de tolerancia cero para referirse al nivel admisible de residuos en alimentos. Actualmente, la mejora y desarrollo de nuevos métodos de detección ha hecho que la tolerancia cero vaya ligada a la sensibilidad del método de análisis utilizado, siguiendo así el principio de que la probabilidad de encontrar una cosa es mayor cuanto más se busca. Los dos nuevos conceptos introducidos por la Decisión 2002/657, el límite de decisión (CC<sub>α</sub>) y la capacidad de detección (CC<sub>β</sub>) son básicos para demostrar el buen funcionamiento del método de análisis. Para el cálculo de estos parámetros se utilizó en primer lugar la aproximación basada en la recta de calibrado, estableciendo CC<sub>α</sub> como la concentración que corresponde al siguiente valor de respuesta:

$$CC_{\alpha} (\text{respuesta}) = b + 2,33 \sigma$$

donde  $\sigma$  puede aproximarse a la desviación estándar en el menor nivel de concentración estudiado. Una vez determinado el  $CC\alpha$ , en unidades de respuesta, se transforma a unidades de concentración usando la recta de calibración.

La determinación de  $CC\beta$  tiene importancia legal, pues representa el máximo error permitido para la presencia de sustancias prohibidas en los alimentos de consumo humano. La forma de determinar  $CC\beta$  consiste en enriquecer muestras a nivel de  $CC\alpha$  y analizarlas. A partir del valor medio y la desviación estándar ( $\sigma$ ), este parámetro se calcula como sigue:

$$CC\beta = CC\alpha + 1,64 \sigma$$

donde  $\sigma$  es la desviación estándar a nivel de  $CC\alpha$ .

Los valores de concentración obtenidos para  $CC\alpha$  y  $CC\beta$  oscilaron en el intervalo  $0,83 \mu\text{g kg}^{-1}$  para (STZ) a  $4,27 \mu\text{g kg}^{-1}$  para (SSX), y  $1,16 \mu\text{g kg}^{-1}$  para (STZ) a  $5,06 \mu\text{g kg}^{-1}$  para (SSX), respectivamente (**Tabla III.4**).

**Tabla III.4.:** Resultados de  $CC\alpha$  y  $CC\beta$ .

| Analito | Método A       |               | Método B       |               |
|---------|----------------|---------------|----------------|---------------|
|         | ( $CC\alpha$ ) | ( $CC\beta$ ) | ( $CC\alpha$ ) | ( $CC\beta$ ) |
| SDZ     | 5,05           | 5,08          | 2,87           | 3,56          |
| STZ     | 5,02           | 5,04          | 0,83           | 1,16          |
| SPD     | 5,21           | 5,36          | 1,70           | 1,95          |
| SMZ     | 5,33           | 5,56          | 4,07           | 5,03          |
| SMT     | 5,23           | 5,39          | 1,75           | 2,03          |
| SMP     | 5,12           | 5,20          | 3,30           | 3,91          |
| SMX     | 5,51           | 5,87          | 3,01           | 3,32          |
| SSX     | 5,23           | 5,39          | 4,27           | 5,06          |
| SMD     | 5,93           | 6,59          | 1,80           | 2,95          |

Aplicando esta aproximación, los valores obtenidos para  $CC\alpha$  son más bajos que el nivel de concentración más pequeño que se utilizó en el ensayo de calibración (Método B). Esto es así porque se utiliza la aproximación de que la función de calibración se puede extrapolar linealmente al eje Y. Esta suposición ha sido cuestionada por diferentes autores (Companyó, Granados, Guiteras y Prat, 2009), por lo que también se determinaron estos parámetros utilizando el nivel de concentración más bajo al que tanto la precisión como la exactitud fueron estudiadas (Método A).

Aplicando estos criterios, los valores paramétricos son mayores que los obtenidos aplicando el método B, con rangos de concentración que oscilaron entre 5,02 y 5,93  $\mu\text{g kg}^{-1}$  para  $CC\alpha$ , y de 5,04 a 6,59  $\mu\text{g kg}^{-1}$  para  $CC\beta$ , siendo los valores más altos para SMZ y SMD (**Tabla III.4**).

Aunque los límites de decisión y detección obtenidos por este segundo procedimiento son mayores que los obtenidos aplicando la aproximación del método B, se ha optado por un criterio más conservador y se han utilizado estos últimos, los mayores, ya que los valores obtenidos para ambos parámetros  $CC\alpha$  and  $CC\beta$ , son muy inferiores al nivel "recomendado" de presencia de una sulfonamida individual en muestras de miel (10  $\mu\text{g kg}^{-1}$ ). Además, los valores obtenidos son mejores o al menos del mismo orden que los publicados en la literatura por otros autores (Dubreil-Chéneau y *col.*, 2014; Juan-Borrás y *col.*, 2015).

En resumen, los resultados obtenidos de la validación constatan que el procedimiento analítico descrito ofrece garantías de calidad para ser utilizado en el análisis cuantitativo de sulfonamidas en muestras de miel.

#### 3.7.3.5. Respuesta lineal

La *respuesta lineal* del método se evaluó mediante un análisis de regresión lineal, representando gráficamente el área de pico frente a la concentración de analito.

Los datos de regresión se resumen en la **Tabla III.5**.

**Tabla III.5.:** Estudio de la respuesta lineal del método analítico.

| Analito | Curva de calibrado en fase móvil |       |                | Curva de calibrado en miel |       |                |
|---------|----------------------------------|-------|----------------|----------------------------|-------|----------------|
|         | Pendiente                        | y     | R <sup>2</sup> | Pendiente                  | y     | R <sup>2</sup> |
| SDZ     | 387                              | 1742  | 0,9994         | 422                        | -646  | 1,0000         |
| STZ     | 511                              | 656   | 0,9985         | 806                        | 1386  | 0,9995         |
| SPD     | 617                              | 2392  | 0,9992         | 715                        | -2807 | 0,9995         |
| SMZ     | 237                              | 1206  | 0,9995         | 257                        | 56    | 0,9999         |
| SMT     | 842                              | -5004 | 0,9993         | 849                        | -8164 | 0,9995         |
| SMP     | 877                              | -1641 | 0,9996         | 934                        | -2836 | 0,9997         |
| SMX     | 248                              | -1291 | 0,9993         | 267                        | -2043 | 0,9995         |
| SSX     | 1371                             | 2374  | 0,9995         | 1375                       | -1712 | 0,9997         |
| SMD     | 1683                             | 7038  | 0,9995         | 1883                       | -1145 | 0,9999         |

Como se observa en la **Tabla III.5**, aunque los valores obtenidos son comparables, las pendientes y los coeficientes de correlación son significativamente mayores en la curva realizada en matriz (0,9995 a 1,0000) que en la realizada en fase móvil, demostrando que el uso de la calibración en matriz puede reducir aún más los efectos de la matriz.

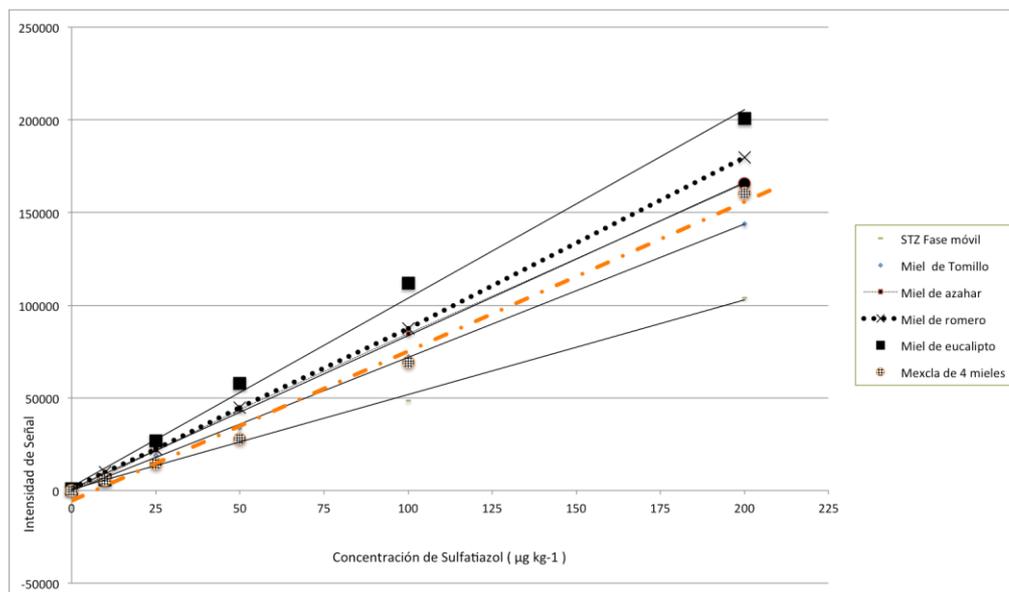
#### 3.7.4. Estudio del efecto de la matriz

El desarrollo de una metodología analítica para la cuantificación de sulfonamidas en miel mediante cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas (LC-MS) en modo ESI, requiere la evaluación del efecto de la matriz en la ionización de los analitos objeto de estudio. Esta metodología se considera que es la mejor herramienta de trabajo por su buena selectividad y rapidez en la presentación de resultados (Bargańska, Namieśnik, y Ślebioda, 2011; Dmitrienko y col., 2014), sin embargo, no hay que olvidar que la miel es una matriz compleja que puede dar lugar a interferencias, reduciendo la eficiencia en la extracción e interfiriendo en la detección por afectar a las señales de los analitos, bien aumentando la señal de fondo (ruido), o por el contrario mermando la respuesta del analito (Khong, Hammel y Guy, 2005).

La fuente ESI es muy susceptible a los componentes presentes en la matriz, dando lugar a errores por exceso o por defecto en la cuantificación (Economou y col., 2012; Verzeznassi y col., 2002). En teoría, el efecto matriz puede ser minimizado realizando una limpieza eficaz o empleando diferentes condiciones cromatográficas; sin embargo la rutina de trabajo demuestra que no se puede eliminar por completo la interferencia (Furey y col., 2013).

La guía SANCO 2726/2004, recomendando el empleo de curvas de calibrado realizadas en matriz. En este trabajo, la evaluación de la existencia del efecto matriz se llevó a cabo mediante la comparación estadística de las pendientes y ordenadas en el origen obtenidas en matriz y en fase móvil. Además se estudió el efecto matriz según el tipo de miel utilizada (eucalipto, azahar, romero y tomillo, así como la mezcla de las cuatro).

En todos los casos, las muestras se enriquecieron al mismo rango de concentraciones (10-200  $\mu\text{g kg}^{-1}$ ). Los resultados obtenidos se muestran en la **Figura III.4.**



**Figura III.4.:** Rectas de calibrado obtenidas en matriz y en fase móvil.

La pendiente de la curva obtenida en matriz para STZ difiere de la obtenida en fase móvil, siendo más acusada esta diferencia conforme aumenta el color de la miel. De hecho, la mayor diferencia se observó para miel de eucalipto, que a una concentración de analito de  $25 \mu\text{g kg}^{-1}$ , el valor de la señal en matriz fue el doble de la obtenida en fase móvil. El resto de analitos mostró un comportamiento similar a STZ.

Con el objetivo de minimizar el efecto de la matriz, se decidió en adelante, llevar a cabo la cuantificación empleando curvas de calibrado hechas en matriz.

Esta aproximación concuerda con lo descrito por otros autores, que también enriquecen muestras control de miel con sulfonamidas, para minimizar el efecto de la matriz (Juan-Borrás, Periche, Domenech y Escriche, 2015).

### **3.7.5. Aplicación de la metodología optimizada a muestras reales**

La metodología analítica optimizada en una fase anterior (extracción mediante SPE y cuantificación por LC-MS), se aplicó al análisis de 215 muestras de miel bruta proporcionadas por ASEMIEL.

Los dos analitos que aparecieron con más frecuencia fueron STZ (16 muestras) y SMX (10 muestras), con valores que oscilaron en el rango de concentraciones de  $9,4$  a  $140,8 \mu\text{g kg}^{-1}$  de STZ y  $6,7$ - $62,4 \mu\text{g kg}^{-1}$  en el caso de SMX.

Aunque el número de muestras positivas fue bajo (21 %), violan claramente las Directivas Europeas y no debemos despreocuparnos del tema ya que a pesar de en alimentación el riesgo cero no existe, nuestro reto debe dirigirse a alcanzar ese valor en la miel, ya que se considera un producto natural y como tal, no debería contener ningún residuo de sustancias que puedan afectar a la salud de los consumidores, como las sulfonamidas.

Es importante señalar que la Unión Europea tiene un consumo total de miel de 270.000 toneladas, y que su producción (118.000 toneladas) es insuficiente para cubrir la demanda, por lo que aproximadamente la mitad

de la miel que se consume tiene que ser importada, siendo este canal la vía de entrada de miel contaminada con residuos de antibióticos como las sulfonamidas.

De hecho, en los informes del Sistema de Alerta Rápida para Alimentos y Piensos de la Dirección General de Sanidad y Consumo (RASFF) del periodo 2004-2011, cabe destacar que la mayor frecuencia de notificaciones por muestras no conformes por antibacterianos (incluyendo sulfonamidas), correspondió a la miel (European Food Safety Authority, 2013). En relación a las sulfonamidas, en la monitorización realizada por el RASFF se detectaron resultados positivos en 4 de 129 muestras de miel procedentes de Polonia, en 2 de 67 muestras procedentes de Hungría y 1 de las 5 procedentes de Lituania. Con respecto al tipo de sulfonamida, el mayor número de notificaciones emitidas fueron para STZ con concentraciones que oscilaron entre 1,13 mg kg<sup>-1</sup> (año 2007) a 404 mg kg<sup>-1</sup> (año 2008), y SMD, con concentraciones de 1,34 mg kg<sup>-1</sup> (año 2007) a 3 mg kg<sup>-1</sup> (año 2011). Afortunadamente, en 2014, sólo se registró una notificación para SMX (48,3 mg kg<sup>-1</sup>) (European Commission, 2014)

En algunos países se aplican programas de control para monitorizar la presencia de antibacterianos en animales vivos y en sus productos, usando test microbiológicos para el análisis, y en muchos casos los resultados positivos no son confirmados por otras técnicas más apropiadas, de forma que no existe una cuantificación precisa del contaminante (Juan-Borrás y *col.*, 2015). Como consecuencia de no utilizar métodos de análisis lo suficientemente sensibles, se corre el riesgo de que lleguen al mercado muestras contaminadas. En el otro extremo de la balanza se posiciona el empleo métodos analíticos extremadamente sensibles, permiten detectar trazas de residuos (Sheridan y *col.*, 2008).

Los últimos estudios publicados relacionados con la monitorización de residuos de sulfonamidas usan métodos similares al optimizado en esta memoria, y los resultados en todos los casos, son comparables con los obtenidos en este trabajo. Así, en el estudio publicado por Juan-Borrás y *col.* (2015), analizaron un total de 178 muestras de miel; en seis de ellas encontraron residuos de STZ a concentraciones entre 5,0 y 9,0 µg kg<sup>-1</sup>, en otras tres el residuo encontrado correspondió a SDZ, con niveles en el

intervalo de concentración entre 13,0-100  $\mu\text{g kg}^{-1}$ . Del mismo modo, en el estudio publicado por Galarini y *col.*, (2015), analizaron 74 muestras de miel comercial recogidas de distintos supermercados italianos, y en el 12 % de las muestras analizadas encontraron niveles traza de sulfonamidas (concentraciones en el intervalo 0,2 -1,7  $\mu\text{g kg}^{-1}$ ).

Actualmente, la normativa europea ha fijado LMR para la presencia de sustancias farmacológicamente activas en los alimentos de origen animal destinados al consumo humano (European Commission, 2009b). Así, para cualquier alimento/tejido (músculo, hígado, riñón) de todas las especies destinadas a la producción de alimentos, y leche de bovinos, ovinos y caprinos, se ha establecido un LMR individual, o bien para la combinación de sulfonamidas, de 100  $\mu\text{g kg}^{-1}$ . Estos límites máximos de residuos irán disminuyendo conforme se desarrollen nuevos métodos de análisis más sensibles. Sin embargo, no hay normativa a nivel europeo que establezca límites de concentración para medicamentos veterinarios en muestras de miel, por lo que si entendemos esta normativa de LMR residuos como una lista positiva de sustancias farmacológicamente activas que se pueden usar, la ausencia en este listado de las sulfonamidas en miel, se interpreta como que el su uso en apicultura está prohibido. Sin embargo, en otros países como Cuba, Chile o Argentina, este último uno de los principales exportadores de miel a la Unión Europea, tienen un límite establecido 0,1  $\text{mg g}^{-1}$ , para sulfonamidas en miel (Secretaría de agricultura, ganadería, pesca y alimentos, 2007).

La legislación europea también contempla los llamados “Valores de referencia a efectos de intervención” (RPAs= *reference point for action*, o antiguamente MRPLs). Se definen como las concentraciones de residuos que son técnicamente viables, para ser detectadas por cualquier laboratorio de análisis de alimentos, de manera que si este valor se iguala o excede, se debe rechazar e impedir la puesta en el mercado de este producto.

Estos RPAs se fijan tras la consulta con laboratorios de control oficiales (European Commission, 2009a). Si al analizar se detectan cantidades por debajo de este valor de intervención, los estados miembros deben permitir la puesta en el mercado de esos productos. Este

procedimiento está recogido en varias Decisiones comunitarias, y a fecha de hoy, por ejemplo está fijado el valor de referencia a efectos de intervención para el cloranfenicol en miel, aplicable también a la jalea real, en  $0.3 \mu\text{g kg}^{-1}$ , así como para los metabolitos de nitrofuranos en  $1 \mu\text{g kg}^{-1}$  (AESAN, 2010).

El Comité Mixto FAO/OMS de expertos en aditivos Alimentarios (FECFA) evaluó en 1994 el uso del sulfatiazol como agente antimicrobiano en medicina veterinaria, así como los efectos de las sulfonamidas para la salud humana. El sulfatiazol y la mayoría de las sulfonamidas pueden provocar efectos anti-tiroideos en los animales y las personas a dosis terapéuticas. Sin embargo, el Comité determinó que es altamente improbable que se presentaran esos efectos en humanos a dosis inferiores a las terapéuticas. La dosis terapéutica para medicamentos autorizados en medicina humana va de 1,2 a 2,4 g/día, y el LMR permitido en algunos alimentos es de  $100 \mu\text{g kg}^{-1}$ , estableciéndose un amplio margen de seguridad frente a la dosis terapéutica en humanos.

El Comité de Medicamentos Veterinarios de la Agencia Europea del Medicamento (EMA) considera que el umbral de tolerancia de  $100 \mu\text{g kg}^{-1}$  en alimentos, da un margen de seguridad suficiente (Agencia de Salud Pública de Cataluña, 2014).

En base a todo lo expuesto anteriormente, se puede observar que el método analítico propuesto, desarrollado y validado en esta memoria, cumple con este objetivo de seguridad, al alcanzar niveles de detección muy inferiores a  $100 \mu\text{g kg}^{-1}$ , que es el único límite legal para sulfonamidas en otras matrices.

Además, también ofrece niveles de detección muy inferiores al límite fijado en la guía de laboratorios de referencia (CRL), que establece que los métodos analíticos empleados para la confirmación deben alcanzar un CC $\alpha$  inferior a  $50 \mu\text{g kg}^{-1}$  (ppb) (CRL, 2007).

Como consecuencia de la revisión bibliográfica llevada a cabo, se ha podido comprobar que en ninguno de los trabajos publicados hasta la fecha, se ha llevado la determinación simultánea de este grupo de sulfonamidas, y que además, coinciden con los analitos responsables de las últimas alertas sanitarias emitidas por el RASFF.

### 3.8. CONCLUSIONES

1. Se ha puesto a punto una nueva metodología analítica para la determinación de 9 sulfonamidas en muestras de miel, mediante cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas.
2. El método de extracción desarrollado combina una hidrólisis con tampón acetato a pH 5, seguido de SPE, que permite recuperar simultáneamente de la matriz, elevadas concentraciones de las nueve sulfonamidas para su análisis posterior mediante cromatografía.
3. Los datos de la validación demuestran que el método descrito permite cuantificar la presencia de sulfonamidas a unos niveles de concentración  $CC\alpha$  y  $CC\beta$ , compatibles con la legislación actual en materia de residuos.
4. El método desarrollado presenta buena precisión, exactitud, selectividad y linealidad en el intervalo de concentraciones estudiado, por lo que puede utilizarse de forma fiable para el análisis de rutina de las 9 sulfonamidas en muestras de miel.
5. La comparación de las rectas de calibrado obtenidas en matriz y en fase móvil, revelaron la existencia de un efecto matriz importante para todas las sulfonamidas, por lo que fue necesario utilizar un calibrado en matriz para cuantificar adecuadamente todas las sulfonamidas objeto de estudio.
6. El método se aplicó al análisis de 215 muestras de miel de distinta procedencia, detectándose residuos de sulfonamidas en 45 muestras, correspondiendo a STZ y SMX el mayor número de positivos (26 muestras), superando tres muestras los  $100 \mu\text{g kg}^{-1}$  de STZ.

## 3.9. BIBLIOGRAFÍA

- Agencia de Salud Pública de Cataluña. (2014). Evaluación del riesgo de la detección de residuos de sulfatiazol (1,4 µg kg<sup>-1</sup>) en miel.
- Annesley, T.M. (2003). Ion suppression in mass spectrometry. *Clinical Chemistry*, 49(7), 1041-1044.
- Bargańska, Ž., Namieśnik, J., Ślebioda, M. (2011). Determination of antibiotic residues in honey. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 30(7), 1035-1041.
- Companyó, R., Granados, M., Guiteras, J., Prat, M.D. (2009). Antibiotics in food: legislation and validation of analytical methodologies. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 395(4), 877-891.
- CRL (2007). CRL Guidance Paper. CRLs view on state of the art analytical methods for national residue control plans.
- Dmitrienko, S.G., Kochuk, E.V., Apyari, V.V., Tolmacheva, V.V., Zolotov, Y. A. (2014). Recent advances in sample preparation techniques and methods of sulfonamides detection - A review. *Analytica Chimica Acta*, 850, 6-25.
- Dubreil-Chéneau, E., Pirotais, Y., Verdon, E., Hurtaud-Pessel, D. (2014). Confirmation of 13 sulfonamides in honey by liquid chromatography-tandem mass spectrometry for monitoring plans: validation according to European Union Decision 2002/657/EC. *Journal of Chromatography A*, 1339, 128-136.
- Economou, A., Petraki, O., Tsiipi, D., Botitsi, E. (2012). Development of a liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for the determination of sulfonamides, trimethoprim and dapsone in honey and validation according to Commission Decision 2002/657/EC for banned compounds [corrected]. *Talanta*, 97, 32-41.
- European Commission. (2002). Commission Decision 2002/657/EC of 12 August 2002: implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results. *Official Journal of European Communities*, L221, 8-36.

- European Commission. (2009a). Reglamento (CE) no 470/2009 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 6 de mayo de 2009, por el que se establecen procedimientos comunitarios para la fijación de los límites de residuos de las sustancias farmacológicamente activas en los alimentos de origen animal, se deroga el Reglamento (CEE) no 2377/90 del Consejo y se modifican la Directiva 2001/82/CE del Parlamento Europeo y del Consejo y el Reglamento (CE) no 726/2004 del Parlamento Europeo y del Consejo.
- European Commission. (2009b). Commission Regulation (EU) N° 37/2010 of 22 December 2009 on pharmacologically active substances and their classification regarding maximum residue limits in foodstuffs of animal origin. *Official Journal of European Communities, L 15*, 1-5.
- European Commission. (2014). RASFF Portal. Recuperado 22 de abril de 2015,  
[https://webgate.ec.europa.eu/rasffwindow/portal/?event=notificationDetail&NOTIF\\_REFERENCE=2014.1359](https://webgate.ec.europa.eu/rasffwindow/portal/?event=notificationDetail&NOTIF_REFERENCE=2014.1359)
- European Food Safety Authority. (2013). Report for 2011 on the results from the monitoring of veterinary medicinal product residues and other substances in live animals and animal products.
- Fuh, M-R. S., Chu, S-Y. (2003). Quantitative determination of sulfonamide in meat by solid-phase extraction and capillary electrophoresis. *Analytica Chimica Acta*, 499(1-2), 215-221.
- Furey, A., Moriarty, M., Bane, V., Kinsella, B., Lehane, M. (2013). Ion suppression; a critical review on causes, evaluation, prevention and applications. *Talanta*, 115, 104-122.
- Galarini, R., Saluti, G., Giusepponi, D., Rossi, R., Moretti, S. (2015). Multiclass determination of 27 antibiotics in honey. *Food Control*, 48, 12-24.
- Giannetti, L., Longo, F., Buiarelli, F., Russo, M. V., Neri, B. (2010). Tetracycline residues in royal jelly and honey by liquid chromatography tandem mass spectrometry: validation study according to Commission Decision 2002/657/EC. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 398(2), 1017-1023.

- Hammel, Y.-A., Mohamed, R., Gremaud, E., LeBreton, M.-H., Guy, P.A. (2008). Multi-screening approach to monitor and quantify 42 antibiotic residues in honey by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1177(1), 58-76.
- Hela, W., Brandtner, M., Widek, R., Schuh, R. (2003). Determination of sulfonamides in animal tissues using cation exchange reversed phase sorbent for sample cleanup and HPLC-DAD for detection. *Food Chemistry*, 83(4), 601-608.
- Heller, D.N., Ngoh, M.A., Donoghue, D., Podhorniak, L., Righter, H., Thomas, M.H. (2002). Identification of incurred sulfonamide residues in eggs: methods for confirmation by liquid chromatography-tandem mass spectrometry and quantitation by liquid chromatography with ultraviolet detection. *Journal of Chromatography B, Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 774(1), 39-52.
- Huang, C., Guo, B., Wang, X., Li, J., Zhu, W., Chen, B., ... Yao, S. (2012). A generic approach for expanding homolog-targeted residue screening of sulfonamides using a fast matrix separation and class-specific fragmentation-dependent acquisition with a hybrid quadrupole-linear ion trap mass spectrometer. *Analytica Chimica Acta*, 737, 83-98.
- Juan-Borrás, M., Periche, A., Domenech, E., Escriche, I. (2015). Routine quality control in honey packaging companies as a key to guarantee consumer safety. The case of the presence of sulfonamides analyzed with LC-MS-MS. *Food Control*, 50, 243-249.
- Khong, S.-P., Hammel, Y.-A., Guy, P.A. (2005). Analysis of tetracyclines in honey by high-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry: RCM*, 19(4), 493-502.
- King, R., Bonfiglio, R., Fernandez-Metzler, C., Miller-Stein, C., Olah, T. (2000). Mechanistic investigation of ionization suppression in electrospray ionization. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 11(11), 942-950.

- Matuszewski, B.K., Constanzer, M.L., Chavez-Eng, C.M. (1998). Matrix effect in quantitative LC/MS/MS analyses of biological fluids: a method for determination of finasteride in human plasma at picogram per milliliter concentrations. *Analytical Chemistry*, 70(5), 882-891
- Matuszewski, B.K., Constanzer, M.L., Chavez-Eng, C.M. (2003). Strategies for the assessment of matrix effect in quantitative bioanalytical methods based on HPLC-MS/MS. *Analytical Chemistry*, 75(13), 3019-3030.
- Maudens, K.E., Zhang, G-F., Lambert, W.E. (2004). Quantitative analysis of twelve sulfonamides in honey after acidic hydrolysis by high-performance liquid chromatography with post-column derivatization and fluorescence detection. *Journal of Chromatography A*, 1047(1), 85-92.
- Parks, O.W. (1984). Evidence for transformation of sulfamethazine to its N4-glucopyranosyl derivative in swine liver during frozen storage. *Journal - Association of Official Analytical Chemists*, 67(3), 566-569.
- Posyniak, A., Sniegocki, T., Zmudzki, J. (2002). Solid phase extraction and liquid chromatography analysis of sulfonamide residues in honey. *Bulletin-Veterinary Institute in Pulawy*, 46(1), 111-118.
- SANCO/2004/2726. (2004) Guidelines for the Implementation of Decision 2002/657/EC, rev 4, 1-7.
- Secretaría de agricultura, ganadería, pesca y alimentos. (2007). Boletín Apícola.  
[http://www.minagri.gob.ar/site/desarrollo\\_rural/producciones\\_regionales/00\\_origen\\_animal/00\\_apicultura/\\_boletines/28\\_10\\_07.pdf](http://www.minagri.gob.ar/site/desarrollo_rural/producciones_regionales/00_origen_animal/00_apicultura/_boletines/28_10_07.pdf)
- Shao, B., Dong, D., Wu, Y., Hu, J., Meng, J., Tu, X., Xu, S. (2005). Simultaneous determination of 17 sulfonamide residues in porcine meat, kidney and liver by solid-phase extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, 546(2), 174-181.

- Sheridan, R., Policastro, B., Thomas, S., Rice, D. (2008). Analysis and Occurrence of 14 Sulfonamide Antibacterials and Chloramphenicol in Honey by Solid-Phase Extraction Followed by LC/MS/MS Analysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(10), 3509-3516.
- Smeraglia, J., Baldrey, S. F., Watson, D. (2002). Matrix effects and selectivity issues in LC-MS-MS. *Chromatographia*, 55(1), S95-S99.
- Stubbings, G., Tarbin, J., Cooper, A., Sharman, M., Bigwood, T., Robb, P. (2005). A multi-residue cation-exchange clean up procedure for basic drugs in produce of animal origin. *Analytica Chimica Acta*, 547(2), 262-268.
- Tölgyesi, Á., Berky, R., Békési, K., Fekete, S., Fekete, J., Sharma, V. K. (2013). Analysis of Sulfonamide Residues in Real Honey Samples Using Liquid Chromatography with Fluorescence and Tandem Mass Spectrometry Detection. *Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies*, 36(8), 1105-1125.
- Trufelli, H., Palma, P., Famigliani, G., Cappiello, A. (2011). An overview of matrix effects in liquid chromatography-mass spectrometry. *Mass Spectrometry Reviews*, 30(3), 491-509.
- Venable, R., Haynes, C., Cook, J.M. (2014). Reported prevalence and quantitative LC-MS methods for the analysis of veterinary drug residues in honey: a review. *Food Additives and Contaminants: Part A*, 31(4), 621-661.
- Verzegnassi, L., Savoy-Perroud, M.C., Stadler, R.H. (2002). Application of liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry to the detection of 10 sulfonamides in honey. *Journal of Chromatography A*, 977(1), 77-87.
- Vidal, J.L.M., Aguilera-Luiz, M. del M., Romero-González, R., Frenich, A.G. (2009). Multiclass Analysis of Antibiotic Residues in Honey by Ultraperformance Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(5), 1760-1767.
- Volmer, D.A., Jessome, L.L. (2006). Ion suppression: a major concern in mass spectrometry. *LC-GC North America*, 24, 83-89.

**CAPÍTULO IV**  
**DESARROLLO DE MÉTODOS INMUNOQUÍMICOS PARA**  
**EL ANALISIS DE SULFONAMIDAS EN MUESTRAS DE MIEL**



#### 4. DESARROLLO DE MÉTODOS INMUNOQUÍMICOS PARA EL ANÁLISIS DE SULFONAMIDAS EN MUESTRAS DE MIEL

La preocupación que genera la presencia de residuos en muestras alimentarias, hace que sea necesario disponer de metodologías analíticas, que permitan la determinación de estos residuos en diferentes matrices de forma fiable. La cromatografía líquida acoplada a la espectrometría de masas, como ya se indicó en el capítulo anterior, es la técnica de referencia para confirmar la presencia de residuos de sustancias con actividad farmacológica en muestras agroalimentarias. Estas técnicas son altamente fiables, reproducibles y sensibles, pero como cualquier otra metodología analítica, no están exentas de inconvenientes y limitaciones ya que requieren un equipamiento de elevado coste, personal cualificado, preparación laboriosa de la muestra, uso de grandes cantidades de disolventes orgánicos y lentitud en la presentación de resultados (Lee y Kennedy, 2001; Anklam, Stroka y Boenke, 2002; Beyer y Biziuk, 2008). Esto ha hecho que en las últimas décadas se hayan desarrollado diferentes metodologías analíticas para intentar solventar los inconvenientes descritos para las técnicas cromatográficas. Entre las diferentes metodologías disponibles, las técnicas inmunoquímicas han experimentado un desarrollo importante, apareciendo en la bibliografía gran variedad de formatos de inmunoensayo para detectar no sólo antimicrobianos, sino también otros analitos de naturaleza biótica y abiótica, como residuos de plaguicidas (Jiang y *col.*, 2008; Esteve-Turrillas, Agulló, Abad-Fuentes, Abad-Somovilla y Mercader, 2012; Plana, Moreno, Montoya y Manclús, 2014), contaminantes ambientales (Girotti, Ghini, Maiolini, Bolelli y Ferri, 2013), microorganismos patógenos (Law, Ab Mutalib, Chany Lee, 2014; Wang y *col.*, 2016), toxinas naturales (A. Zhang y *col.*, 2011; Kavanagh, Elliott y Campbell, 2015; Darouj, Massouhy Ghanem, 2016), aditivos alimentarios (Ren y *col.*, 2014), drogas (Xu y *col.*, 2015), entre otros. Algunas de sus principales ventajas frente a la cromatografía son las siguientes: facilidad de uso, capacidad para procesar simultáneamente un número elevado de muestras, posibilidad de llevar a cabo el ensayo donde pueda presentarse el problema (aplicación *in situ*),

alta sensibilidad y especificidad, menor coste y rapidez en la presentación de resultados, permitiendo así tomar acciones correctoras cuando proceda.

En bibliografía consultada encontramos numerosas revisiones sobre inmunoensayo en diferentes formatos y aplicaciones en el análisis de alimentos (Xu y col., 2009; Marques y col., 2011; Mbundi y col., 2014; Chiou, Leung, Lee y Wong, 2015; Selvaraj y col., 2015; Xu y col., 2015; Li, Yu, Li y Wu, 2015; Verma y Bhardwaj, 2015; Rotariu, Lagarde, Jaffrezic-Renault y Bala, 2016). En la **Tabla IV.1** se recogen algunos inmunoensayos descritos en la bibliografía para la determinación de sulfonamidas en muestras de miel.

**Tabla IV.1.** Inmunoensayos en diferentes formatos, descritos en la bibliografía para la determinación de sulfonamidas en muestras de miel.

| Sulfonamida objeto de estudio   | Tipo de ensayo/marcador | Referencia                  |
|---|-------------------------|-----------------------------|
| STZ, SDZ, SPD, SMZ, SMTZ, SSX, SCP, SDX, SMX, SDM                         | RIA(Charm®)/(R)         | Quintana-Rizzo y col., 2005 |
| STZ   | ELISA/(E)               | Pastor-Navarro y col., 2004 |
| STZ, SMP, SPD, SMT, SSZ, PSTZ   | ELISA/(E)               | Pastor-Navarro y col., 2007 |
| SMT, SMP, SDX, STZ, SMR, SMZ, SCP, SDM, SOZ, SXZ, SGD, SDZ, SNL, SAA, SPY | RIA(Charm®)/(R)         | Bonvehí y Gutiérrez, 2009   |
| SMP   | ELISA/(E)               | Tafintseva, y col., 2010    |
| STZ   | Inmunosensor/(F)        | Jornet, y col., 2010        |
| SDZ, SMZ  | Placa/(Q)               | Wutzy col., 2011            |
| SCP, SDZ, SDM, SMZ, SMX, SMP, SPD, SQX, STZ, SMM                          | ELISA/(E)               | Galarini y col., 2014       |
| SDZ, SMD, SQX, SMX, STZ, SSX, SPD, SMZ, SMP, SMT, SMM, SDX                | Mircroarray/(Q)         | Gaudin y col., 2014         |

STZ: Sulfatiazol; SDZ: Sulfadiazina; SPD: Sulfapiridina; SMZ: Sulfamerazina; SMTZ: Sulfametazina, SSX: Sulfisoxazol; SCP: Sulfaclopiridazina; SDX: Sulfadoxina; SMX/SOZ: Sulfametoxazol; SMP/SMD: Sulfametoxipiridazina; SMT: Sulfametizol; SSZ: Sulfasalazina; PSTZ: N<sup>4</sup>-ftalilsulfatiazol; SMR: Sulfamerazina; SDM: Sulfadimetoxina; SXZ: Sulfisoxazol; SGD: Sulfaguanidina; SNL: Sulfanilamida; SAA: Sulfacetamida; SPY: Sulfapiridina; SQX: Sulfaguinoxalina; SMM: Sulfamonometoxina. RIA: Radioinmunoensayo; ELISA: Inmunoensayo enzimático; R: marcador radioactivo; E: marcador enzimático; F: marcador fluorescente; Q: marcador quimioluminiscente.

El desarrollo de inmunoensayos enzimáticos para sulfonamidas está condicionado por la dificultad que plantea la producción de anticuerpos, ya que se requieren diferentes procesos de síntesis química para obtener un inmunógeno que genere, en el organismo del mamífero productor, anticuerpos anti-sulfonamidas de elevada sensibilidad; que pueden ser específicos para un compuesto (baja reactividad cruzada), o bien genéricos para un grupo de sulfonamidas (elevada reactividad cruzada), pudiendo así desarrollar ensayos multianalito, expresando el resultados como índice de contaminación grupal (Zhang y Wang, 2009).

#### 4.1. OBJETIVOS

El **objetivo general** de las investigaciones de este capítulo ha sido el desarrollo de una metodología analítica sencilla, efectiva y rápida, basada en métodos inmunoquímicos, aplicable al análisis individual o genérico de residuos de Sulfatiazol, Sulfametoxipiridazina, Sulfapiridina, Sulfametizol, Sulfasalazina y N<sup>4</sup>-ftalilsulfatiazol en muestras de miel, pudiendo ser utilizados como métodos de campo y/o *screening*.

Para ello se plantearon los siguientes **objetivos particulares**:

1. Desarrollar protocolos de inmunoensayo que permitan el análisis de residuos de sulfonamidas para el control agroalimentario.
2. Validar los inmunoensayos desarrollados.
3. Aplicarla metodología desarrollada a muestras reales de miel y comparar los resultados con los obtenidos por el método cromatográfico de referencia.

#### 4.2. PARTE EXPERIMENTAL

##### 4.2.1. Reactivos químicos

Las sulfonamidas objeto de estudio, así como otros compuestos de estructura similar utilizados para evaluar la reactividad cruzada, fueron suministrados por Fluka-Sigma-Aldrich (Madrid, España) (**Tabla I.3**).

Los reactivos *o*-fenilendiamina (OPD), polioxietilensorbitanmonolaurato (Tween 20), las proteínas ovoalbúmina (OVA) y albúmina de suero bovino (BSA), la enzima peroxidasa de rábano picante (HRP) y los anticuerpos de cabra anti-conejo marcados con HRP (GAR-HRP), fueron suministrados por Fluka-Sigma-Aldrich (Madrid, España).

Todos los disolventes orgánicos empleados en diferentes calidades de pureza para análisis (metanol, acetonitrilo) y las sales fueron adquiridas a la firma comercial Panreac (Barcelona).

#### 4.2.2. Instrumentación

La densidad óptica fue medida a dos longitudes de onda -490 y 650 nm-, utilizando un lector de placas marca Spectra Max Plus de Molecular Devices (Sunnyvale, CA, USA). Para el lavado de las placas se utilizó un lavador de microplacas Nunc Immuno Wash 12 (Nunc Maxi Sarp, Roskilde, Dinamarca).

El procesamiento de datos se llevó a cabo utilizando el paquete informático SigmaPlot 9.0 (Jandel Scientific, Erkrath, Alemania).

#### 4.2.3. Preparación de las disoluciones de trabajo

##### 4.2.3.1. Disoluciones de los patrones de sulfonamidas

Se prepararon disoluciones estándar para cada una de las sulfonamidas en hidróxido de sodio 0,5 mol L<sup>-1</sup>. Estas disoluciones estándar se almacenaron en frascos topacio a -20 °C y protegidas de la luz hasta su uso.

##### 4.2.3.2. Disoluciones reguladoras

Las disoluciones reguladoras utilizadas fueron, principalmente:

- Tampón de tapizado: tampón carbonato-bicarbonato sódico (CB) 50 mM, pH 9,6.
- Tampón fosfato sódico salino (PBS): fosfato 10mM, NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, pH 7,4.
- Tampón PBS-T: PBS Tween 20 al 0,05 % (v/v).
- Tampón de revelado: citrato sódico 25 mM y fosfato sódico 62 mM, pH 5,5, con 2 mg mL<sup>-1</sup> de OPD y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0,012 % (v/v).

- Disolución de parada: ácido sulfúrico 2,5 M.

Todos los productos usados en la preparación de las disoluciones fueron grado reactivo analítico.

Una vez preparadas, todas las disoluciones fueron filtradas con un filtro de nylon de 0,45  $\mu\text{m}$  de tamaño de poro, antes de su uso.

#### 4.2.4. Inmunorreactivos

Se tomaron como referencia los trabajos de caracterización y selección de los antisueros mediante técnica ELISA, realizados previamente por el Grupo de investigación del Instituto Interuniversitario de Reconocimiento Molecular y Desarrollo Tecnológico (IDM) del Departamento de Química de la Universidad Politécnica de Valencia. Fueron seleccionadas como concentraciones óptimas *antisuero/trazador* o *antisuero/conjugado* de tapizado, aquellas que sin llegar al punto de saturación de la curva, dieron valores de absorbancia comprendidas entre 1,0 y 1,5 unidades (Pastor-Navarro y *col.*, 2007, 2004).

Para realizar los estudios de optimización, se seleccionaron los siguientes sistemas:

- Ensayo individual para STZ
  - Formato directo: BSA-S3-I/HRP-S4 (1:10.000/200  $\mu\text{g L}^{-1}$ ).
  - Formato indirecto: BSA-S3-I/OVA-S2 (1:10000/25  $\mu\text{g L}^{-1}$ ).
- Ensayo genérico para 6 sulfonamidas
  - Formato indirecto: BSA-S3-I/OVA-S8 (1:8000/0,063 mg/L).

### 4.3. DESARROLLO DE ELISAS

#### 4.3.1. Soportes

Para el desarrollo, optimización y aplicación de los inmunoensayos en formato ELISA se utilizaron placas de poliestireno de 96 pocillos de Costar (Cambridge, MA, EE.UU.). Todas las incubaciones se realizaron a temperatura ambiente, a excepción de la etapa de tapizado que se llevó a cabo a 4°C.

### 4.3.2. Procedimiento de inmovilización

Tanto los anticuerpos como los conjugados hapténicos se inmovilizaron sobre las placas de poliestireno por adsorción pasiva, no siendo necesario el empleo de procesos de funcionalización del soporte, ni modificación química de los inmunorreactivos. Este procedimiento de inmovilización por adsorción pasiva presenta la ventaja de la simplicidad. El procedimiento consiste en disolver el receptor a la concentración óptima en tampón CB 50mM, pH 9,6 e incubar 16 horas a 4 °C.

### 4.3.3. Protocolos de Inmunoensayo. Selección de variables

Con las combinaciones de inmunorreactivos seleccionadas en los ensayos de actividad para cada uno de los formatos, se realizaron ensayos de competición para poder establecer la sensibilidad de cada sistema. Estos ensayos tienen como objetivo determinar la capacidad de competición del analito libre y el trazador, o conjugado de tapizado, por los sitios de unión del anticuerpo.

El parámetro utilizado para seleccionar el par anticuerpo/conjugado más sensible es  $IC_{50}$ -concentración de analito que reduce el 50 % de sitios de unión entre el anticuerpo y el conjugado-. A valores  $IC_{50}$  más bajos, mayor será la sensibilidad del ensayo para detectar el analito diana.

#### 4.3.3.1. Protocolo de ensayo competitivo para sulfonamidas

El protocolo general del ensayo competitivo establece una etapa de competición entre el analito y el trazador enzimático para el formato del anticuerpo inmovilizado (ELISA directo), o entre el analito y el conjugado hapténico inmovilizado (ELISA indirecto), por los sitios específicos de unión del anticuerpo a la concentración previamente optimizada. El modo en el que transcurre la competición es de saturación quasi-equilibrio, para lo que se añaden 100  $\mu$ L de disolución de las especies en PBS-T, de los cuales 50  $\mu$ L son del analito a las diferentes concentraciones ensayadas y 50  $\mu$ L del trazador enzimático o anticuerpo primario, en función del formato ensayado. Las diferentes etapas, se describen a continuación.

#### 4.3.3.1.1 Formato de anticuerpo inmovilizado (AI). ELISA directo

En este formato las placas se tapizan dispensando en cada pocillo 100  $\mu\text{L}$  de anticuerpo específico BSA-S3-I disuelto en tampón CB (1:10.000), incubándose 16 h a 4 °C. Tras este periodo de tiempo, las placas se lavan 6 veces con PBS-T para eliminar las especies no unidas. A continuación se adicionan 50  $\mu\text{L}$ /pocillo de conjugado enzimático HRP-S4 (200  $\mu\text{g L}^{-1}$ ) disuelto en PBS-T y otros 50  $\mu\text{L}$ /pocillo de analito para obtener la curva de calibrado (o muestra), incubándose durante 1 hora a temperatura ambiente. Tras ello, se procede a lavar de nuevo la placa para eliminar las especies no unidas. Una vez eliminadas las especies no unidas, se procede a la etapa de revelado -medida de la actividad enzimática del inmunocomplejo- adicionando 100  $\mu\text{L}$ /pocillo de la disolución de sustrato cromogénico (2 g  $\text{L}^{-1}$  OPD y  $\text{H}_2\text{O}_2$  al 0,012 % en tampón citrato 25 mM, fosfato 62 mM, pH 5,5).

Transcurridos diez minutos, se detiene la reacción enzimática mediante la adición de 100  $\mu\text{L}$ /pocillo de ácido sulfúrico 2,5 M. El producto de la reacción enzimática se cuantifica espectrofotométricamente a 490 nm, corrigiendo las lecturas a 650 nm.

#### 4.3.3.1.2 Formato de conjugado hapténico inmovilizado (CI). Elisa indirecto

En este formato las placas se tapizan dispensando en cada pocillo 100  $\mu\text{L}$  de conjugado de tapizado (OVA-S2 a 25  $\mu\text{g L}^{-1}$ ) para el ensayo individual y (OVA-S8 a 0,063  $\text{mgL}^{-1}$ ) para el genérico, disuelto en tampón CB, incubándose 16 h a 4 °C.

Tras este periodo de tiempo, las placas se lavan 6 veces con PBS-T para eliminar las especies no unidas. A continuación se adicionan 50  $\mu\text{L}$ /pocillo del suero policlonal correspondiente BSA-S3-I (1:10000) para el ensayo individual y BSA-S3-I (1:8000) disuelto en PBS-T y otros 50  $\mu\text{L}$ /pocillo de analito para obtener la curva de calibrado (o muestra), incubándose durante 1 hora a temperatura ambiente. Tras ello, se procede a lavar de nuevo la placa para eliminar las especies no unidas.

A continuación se adicionan 100  $\mu\text{L}$ /pocillo de anticuerpo secundario conjugado a HRP a una dilución variable entre 1/100 - 1/20.000  $\text{mg L}^{-1}$  en PBS-T. Tras 1 h de incubación a temperatura ambiente y en oscuridad, las especies unidas se separan de las no unidas mediante lavado. Por último, la etapa de

revelado de la actividad enzimática se lleva a cabo como se ha descrito en el apartado de detección directa.

#### 4.4. OPTIMIZACIÓN DE LOS PARÁMETROS FÍSICO QUÍMICOS DEL ELISA

Se estudió la influencia del pH, fuerza iónica y concentración de tensioactivo (Tween 20) contenido en el tampón de competición en los ELISAs. Estos parámetros son los que habitualmente pueden influir en la señal y sensibilidad del inmunoensayo. Los criterios utilizados para evaluar el efecto de estos parámetros fueron la sensibilidad, expresada como  $IC_{50}$ , y la absorbancia máxima como medida del grado de reconocimiento anticuerpo/analito, siendo el ensayo más sensible aquel en el que se obtiene un mayor valor de  $B_0/IC_{50}$ .

En la etapa de reconocimiento Ag-Ab se determinó el efecto de la fuerza iónica y el pH para evaluar la sensibilidad del ensayo. Para ello se realizaron ensayos competitivos según la metodología descrita en el apartado 4.3.3, disolviendo los anticuerpos (formato CI) y los trazadores enzimáticos (formato AI) en diferentes concentraciones de PBS (5, 10, 15, 20 y 40 mM) preparadas a partir de PBS 100 mM en agua destilada, y manteniendo constante el pH (7,4). Con la concentración de PBS que produjo el ensayo más sensible se realizaron de nuevo ensayos competitivos variando el pH del tampón entre 4,5 y 9,5, seleccionándose aquellos ensayos con mayor valor de  $B_0/IC_{50}$ . Cada combinación se ensayó por triplicado.

Una vez optimizadas las concentraciones de tampón y pH, se estudió el efecto del surfactante en la señal y sensibilidad. El polisorbato 20, conocido como Tween 20, es el tensioactivo más utilizado en los ensayos inmunoquímicos para disminuir las adsorciones inespecíficas. Para ello, se efectuaron ensayos de competición en tampón fosfato salino (PBS) a la concentración y pH optimizado en el apartado anterior, a la que se le añadieron distintas concentraciones de tensioactivo (0, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4 y 0,5 % v/v).

#### 4.5. ESTIMACIÓN DE LAS CARACTERÍSTICAS DE LOS INMUNOENSAYOS

##### 4.5.1. Parámetros de la curva estándar: procesamiento de la señal y curvas de inhibición

La señal del ensayo se monitorizó espectrofotométricamente en modo dual a 490 nm, empleando 650 nm como longitud de onda de referencia. Los valores de absorbancia de las curvas de inhibición obtenidos a partir de los ensayos competitivos se representaron frente al logaritmo de la concentración de analito, ajustándolos matemáticamente con el programa SigmaPlot 9.0 a la siguiente ecuación sigmoide de cuatro parámetros:

$$Y = (A - D) / [1 + (x / C)^B] + D$$

Donde **Y** es el valor de absorbancia obtenido frente a cada una de las concentraciones **x**, siendo **A** la asíntota máxima ( $B_0$ ) que corresponde al valor de la absorbancia en ausencia de analito, y **B** es la pendiente de la curva en el punto de inflexión, **C** es la concentración de analito en el punto de inflexión y **D** es el valor de la asíntota mínima ( $A_{\min}$ ). El parámetro **C** es conocido también como  $IC_{50}$  porque coincide con la concentración de analito que produce una reducción de la señal máxima del 50 %; es uno de los parámetros importantes del ensayo ya que es un marcador de la afinidad del anticuerpo hacia el analito, por lo que se utiliza para conocer la sensibilidad del ensayo, siendo éste más sensible cuanto menor sea el valor de este parámetro.

El límite de detección de los inmunoensayos (LD) se estableció como la concentración de analito que generó un 10% de reducción de la señal máxima ( $IC_{10}$ ). El intervalo de trabajo se estableció para aquellos valores de concentración de analito que produjeron un 20 y un 80% de reducción de  $B_0$  respectivamente ( $IC_{20}$  e  $IC_{80}$ ).

##### 4.5.2. Especificidad. Estudios de reactividad cruzada

La especificidad se define como la capacidad de un anticuerpo de distinguir entre varios antígenos (o analitos) con estructuras similares. Es una característica

muy importante del inmunoensayo, y depende tanto del anticuerpo como del trazador o del conjugado de tapizado.

La especificidad o selectividad de los ELISAs optimizados se evaluó mediante estudios de reactividad cruzada (RC), utilizando como competidores compuestos relacionados química y estructuralmente con las sulfonamidas objeto de estudio.

Se llevaron a cabo ensayos competitivos con cada uno de estos compuestos determinándose la IC<sub>50</sub> de cada uno de los interferentes. Las curvas de inhibición resultantes se obtuvieron por triplicado (n=3), en el mismo intervalo de concentraciones que la curva del analito objeto de estudio, ajustándose a la ecuación sigmoide de cuatro parámetros.

La reactividad cruzada se calculó como % según la siguiente expresión:

$$\% \text{ RC} = (\text{IC}_{50} \text{ analito} / \text{IC}_{50} \text{ interferente}) \times 100$$

#### 4.6. APLICACIÓN DE LOS IAS PARA EL ANÁLISIS DE SULFONAMIDAS EN MUESTRAS DE MIEL

La mayoría de los inmunoensayos son diseñados para el análisis de muestras “limpias” y análisis de aguas, en las que no es necesario un proceso de tratamiento de muestra. Sin embargo, cuando se usan en matrices como suelos o alimentos, hay que realizar un tratamiento previo de la muestra.

La miel es una matriz compleja; es una solución acuosa concentrada de azúcar invertido, con una mezcla compleja de hidratos de carbono, enzimas, aminoácidos, ácidos orgánicos, minerales, compuestos aromáticos, pigmentos, ceras, granos de polen, etc., (Gil Hernández, 2010). Debido a esta complejidad, es necesario el estudio para optimizar el tratamiento de la muestra de miel, de forma que éste sea simple, seguro y económico, y comparable en resultados con el método de referencia. Generalmente, los métodos descritos en bibliografía para el tratamiento de muestras de miel, incluyen una etapa de hidrólisis ácida que persigue separar la sulfonamida objeto de estudio de los azúcares de la muestra, seguido de una extracción en fase sólida SPE.

#### 4.6.1. Tratamiento de muestras de miel

Las muestras de miel utilizadas en los ensayos de enriquecimiento fueron analizadas previamente por el método cromatográfico de referencia para verificar que estaban libres de residuos de sulfonamidas.

El tratamiento de la muestra utilizado en esta memoria es el descrito por Posyniak con ligeras modificaciones (Posyniak, Sniegocki y Zmudzki, 2002). En primer lugar se realiza una hidrólisis de la muestra para conseguir romper las uniones de las sulfonamidas a los azúcares de la miel. Para ello se pesan 2,5 gr de miel previamente homogeneizada en un tubo falcon, a la que se le añaden 12,5 mL de tampón acetato 0,1 M (pH = 5), y se mantiene en ultrasonidos durante 15 minutos.

A continuación se realiza un proceso de extracción en fase sólida (C<sub>18</sub>). Se acondiciona la columna de extracción pasando secuencialmente 3 mL de metanol 100%, 3 mL de agua y 3 mL de tampón acetato pH 5. Tras ello se pasa lentamente toda la disolución de la muestra, lavando la columna seguidamente con 3 mL de tampón acetato pH 5 y 3 mL de agua. Se seca en condiciones de vacío durante 5 minutos, para finalmente recoger las sulfonamidas retenidas con 3 mL de acetónitrilo. Por último, se evapora el extracto en corriente de nitrógeno a 40 °C y finalmente se reconstituye en 1 mL de PBS.

#### 4.6.2. Análisis de muestras de miel enriquecidas. Estudios de Recuperación

Para evaluar el método de extracción propuesto, se realizaron estudios de recuperación mediante el análisis de muestras de miel control, enriquecidas con un patrón de sulfatiazol a diferentes niveles, que se extrajeron siguiendo el procedimiento descrito anteriormente. También se incluyó una muestra de miel no fortificada y extraída de forma similar para evaluar el efecto de la matriz.

Todas estas muestras se analizaron por ELISA, y el valor promedio de la absorbancia proporcionado para cada muestra, se interpoló en una curva estándar de STZ preparada en PBS y que también se incluía en la misma placa. Los valores de recuperación se calcularon mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Recuperación} = \left[ \frac{(\text{STZ})_{\text{ELISA}}}{(\text{STZ})_{\text{fortificada}}} \right] \times 100$$

#### 4.6.3. Estudio del efecto matriz

Dada la complejidad de la miel, se llevaron a cabo estudios para evaluar el posible efecto de la matriz. Para ello, se prepararon curvas estándar de sulfatiazol utilizando muestras previamente analizadas por el método cromatográfico de referencia exentas de sulfatiazol, extraídas utilizando el protocolo descrito anteriormente, resuspendiendo el extracto seco obtenido tras el secado en corriente de nitrógeno con PBS, para finalmente enriquecerlas con el patrón de STZ a las mismas concentraciones de la curva estándar. Para evaluar la influencia que tiene la matriz, se compararon los parámetros analíticos  $B_0$  e  $IC_{50}$  de las curvas de inhibición obtenidas en las muestras fortificadas, con los de la curva control en tampón de ensayo (PBS).

#### 4.7. ANÁLISIS DE MUESTRA REALES: ESTUDIO COMPARATIVO CON CROMATOGRAFÍA LC-MS. FIABILIDAD DE LA METODOLOGÍA ANALÍTICA PROPUESTA

Para comprobar la fiabilidad del inmunoensayo desarrollado, se seleccionaron 4 muestras comerciales de miel de 500 g, exentas de sulfonamidas, y se enriquecieron con sulfatiazol a tres niveles (2, 5 y 10  $\mu\text{g L}^{-1}$ ). Con esas muestras de miel enriquecidas, también se preparó una mezcla que contenía 200 g de cada una de ellas para realizar el mismo ensayo. De cada una de las muestras se hicieron dos lotes para realizar determinaciones mediante ELISA y cromatografía y tres extracciones por concentración de STZ y lote (18 en total). El método de cromatografía utilizado fue el descrito en el Capítulo III.

Cada una de las muestras se analizó por triplicado por cada una de las metodologías (ELISA/HPLC-MS). Para evaluar la validez de los resultados obtenidos mediante los inmunoensayos desarrollados, se estableció una comparación con los obtenidos por cromatografía.

#### 4.8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La caracterización de los sueros se realizó en un trabajo previo por el grupo de investigación del Instituto Interuniversitario de Reconocimiento Molecular y Desarrollo Tecnológico (IDM), del Departamento de Química de la Universidad Politécnica de Valencia, quienes realizaron los ensayos de titulación (actividad),

para seleccionar el formato y la combinación de inmunoreactivos con mejores prestaciones. Las combinaciones de inmunorreactivos se seleccionaron en función del parámetro  $IC_{50}$ , eligiéndose las combinaciones de mayor sensibilidad (apartado 3.3), o lo que es lo mismo, menor valor de  $IC_{50}$ .

#### 4.8.1. Optimización del ensayo

Una vez seleccionadas las combinaciones de inmunorreactivos más idóneas, se estudió la influencia de una serie de variables tales como pH, fuerza iónica y concentración de tensoactivo, que pueden ser determinantes en la sensibilidad, selectividad o reproducibilidad de un ensayo. El criterio utilizado para evaluar la influencia de estos parámetros fisicoquímicos en las condiciones de ensayo fue la  $IC_{50}$ , valores máximos y mínimos de absorción, y pendiente de las curvas dosis-respuesta obtenidas. El valor de la absorbancia máxima ( $B_0$ ) representa la unión del anticuerpo al hapteno conjugado a OVA (formato CI) o al trazador enzimático (formato AI) en ausencia de analito, y la  $IC_{50}$ , representa la afinidad del anticuerpo hacia el sulfatiazol.

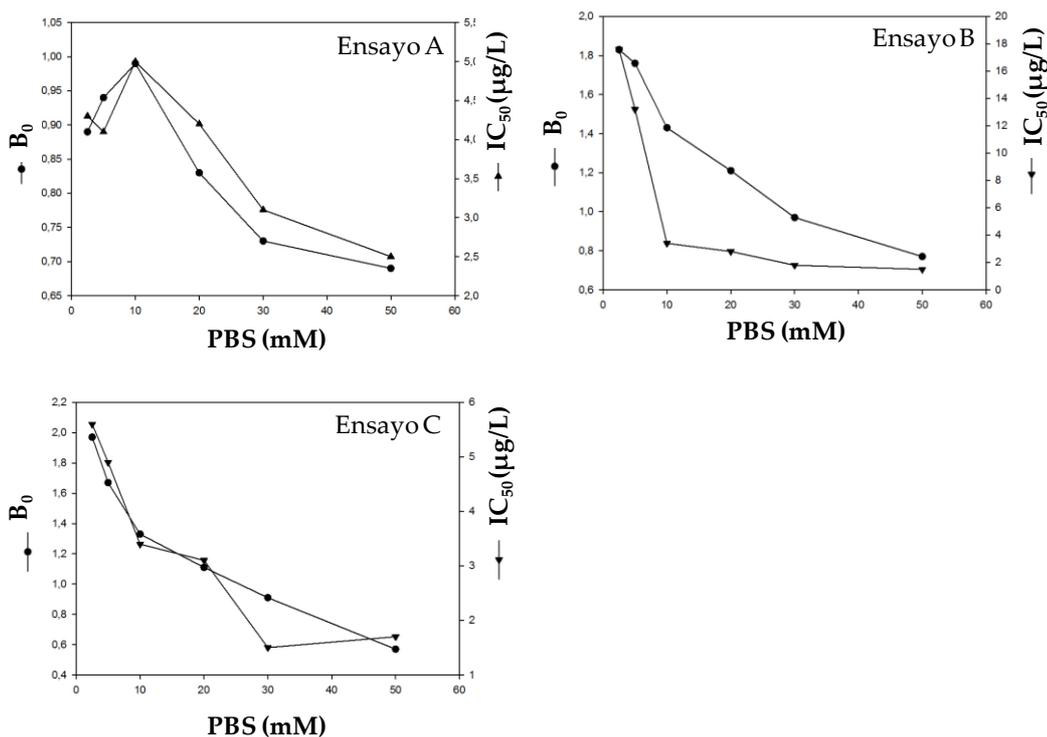
La fuerza iónica del tampón donde tiene lugar la competición influye sobre la reacción ya que, generalmente, un aumento de la misma incrementa la afinidad de los anticuerpos por el analito, es decir, disminuye la  $IC_{50}$ . Jefferis y Deverill, en 2011, observaron que si las interacciones químicas predominantes entre analitos y anticuerpos son hidrofóbicas, éstas se ven favorecidas por un aumento de la fuerza iónica del medio de trabajo. Sin embargo, si prevalecen las interacciones electrostáticas, se produce el efecto contrario. También en 1991, estudios realizados por Li y *col.*, demuestran que la afinidad de un anticuerpo por un analito polar, puede aumentar al hacerlo la fuerza iónica.

##### 4.8.1.1 Influencia de la fuerza iónica

Para evaluar la influencia de la concentración del tampón sobre los parámetros de ensayo, se utilizó PBS (pH 7,4) a concentraciones comprendidas entre 5 y 40 mM. Los resultados obtenidos se muestran en la **Figura IV.1**.

Al evaluar el efecto de la fuerza iónica, se observa que los valores de  $B_0$  disminuyen a medida que aumenta la concentración salina. Respecto a los valores de  $IC_{50}$  se advierte un incremento de la sensibilidad a medida que la fuerza iónica

del tampón aumenta hasta 10 mM en el el ensayo del STZ en formato directo (ensayo A). Para los ensayos de STZ formato indirecto (ensayo B), así como para el ensayo genérico (ensayo C), la mejor sensibilidad se obtiene a concentraciones de PBS 30 mM.



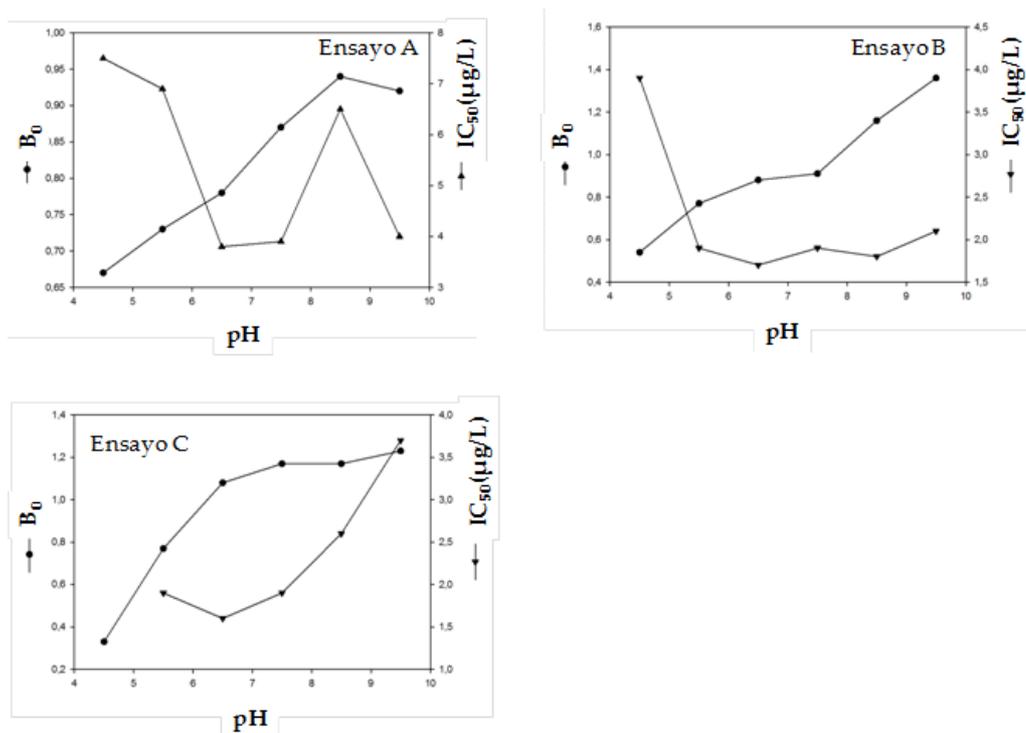
**Figura IV.1. Influencia de la fuerza iónica del tampón (PBS) sobre las características analíticas del ensayo.** Cada punto representa la media de tres determinaciones. *Ensayo A: Formato directo: BSA-S3-I/HRP-S4; Ensayo B: Formato indirecto: BSA-S3-I/OVA-S2; Ensayo C: Formato indirecto: BSA-S3-I/OVA-S8.*

Como podemos observar en los tres ensayos, a medida que aumenta la fuerza iónica del medio se produce una mejora de la sensibilidad (menor valor de  $IC_{50}$ ), como consecuencia del incremento de interacciones electrostáticas entre el analito y el anticuerpo. Este efecto ya ha sido descrito previamente para analitos poco solubles en agua (Jefferis y Deverill, 1991) como sulfatiazol, donde las interacciones hidrofóbicas entre analitos y anticuerpos se ven favorecidas por el aumento de la fuerza iónica del medio de trabajo (Deshpande, 2012). En este

sentido, la modificación de la fuerza iónica del medio puede ser una herramienta útil para modular la sensibilidad del inmunoensayo (Sahin, Grillo, Perkins Roberts, 2010). En consecuencia, se escogieron como óptimos concentraciones de PBS 10 mM para el ensayo A y PBS 30 mM para los ensayos B y C, ya que condujeron a los inmunoensayos con mayor relación  $B_0/IC_{50}$ .

#### 4.8.1.2. Influencia del pH

Otro de los factores descritos por su influencia en la inmunorreacción competitiva es el pH del tampón de ensayo, modificando tanto la sensibilidad como la señal máxima de los inmunoensayos. Para valorar la influencia del pH se realizaron ensayos a diferentes valores de pH, entre 4,5 y 9,5 (Figura IV.2).



**Figura IV.2 Influencia del pH del tampón (PBS) sobre las características analíticas del ensayo.** Cada punto representa la media de tres determinaciones. Ensayo A: Formato directo: BSA-S3-I/HRP-S4; Ensayo B: Formato indirecto: BSA-S3-I/OVA-S2; Ensayo C: Formato indirecto: BSA-S3-I/OVA-S8.

Se observa que el pH del tampón en el que tiene lugar la etapa de competición influye tanto en la sensibilidad del ensayo ( $IC_{50}$ ) como en la señal de absorbancia máxima ( $B_0$ ). De hecho, en las tres gráficas (A, B, y C) los valores de  $IC_{50}$  y  $B_0$  aumentan a medida que lo hace el pH de la disolución tampón. Se seleccionó como óptimo el pH en el que se obtuvo la mayor relación  $B_0/IC_{50}$ , que correspondió a un pH de 7,5 en el formato directo, y un pH de 6,5 para el formato indirecto (ensayo individual para sulfatiazol) y el ensayo genérico (ensayos B y C, respectivamente).

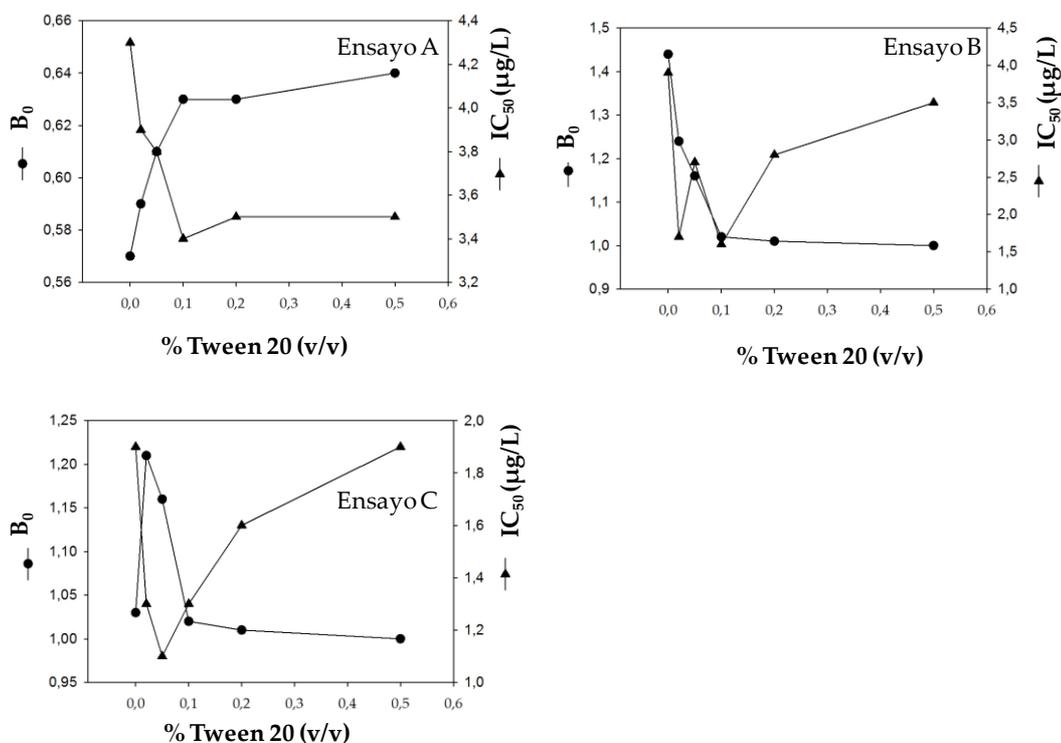
#### 4.8.1.3. Influencia de la concentración de Tween 20

Con el objeto de disminuir las interacciones inespecíficas que pueden aparecer en el desarrollo de las técnicas inmunoquímicas, es habitual el empleo de ciertos detergentes. El polisorbato 20, más conocido por su denominación comercial registrada (Tween 20), es el tensioactivo más empleado. Así, se realizaron ensayos competitivos en presencia de diferentes concentraciones de Tween 20 para evaluar su efecto sobre los ELISAs (**Figura IV.3**).

Para el ensayo en forma directa para STZ (ensayo A) se observó que la concentración de Tween 20 no tiene ningún efecto significativo sobre el valor de absorbancia máxima, seleccionándose una concentración de 0,1 % de Tween 20, que permitía obtener valores de señal  $B_0$  y de  $IC_{50}$  aceptables.

Para los ensayos en formato indirecto, tanto el ensayo específico de sulfatiazol (ensayo B) como el genérico (ensayo C), se observa que a medida que aumenta la concentración de Tween 20, tanto los valores de  $IC_{50}$  como los de  $B_0$  disminuyen primero para aumentar después gradualmente, por lo que tanto la señal como la sensibilidad disminuyen a medida que aumenta la concentración de Tween 20.

El tensioactivo, además de evitar las interacciones inespecíficas de las proteínas con el material de las placas, puede interferir en el reconocimiento anticuerpo-analito, siendo el efecto más acusado, cuanto mayor es la concentración de tensioactivo. Estas observaciones, han sido descritas previamente en la bibliografía, y el efecto parece que se ve reforzado a medida que disminuye la polaridad del analito, como ocurre con STZ que es muy poco soluble en agua. En este sentido, para los formatos indirectos se seleccionó una concentración de 0,2 % Tween 20, como compromiso entre sensibilidad y señal.

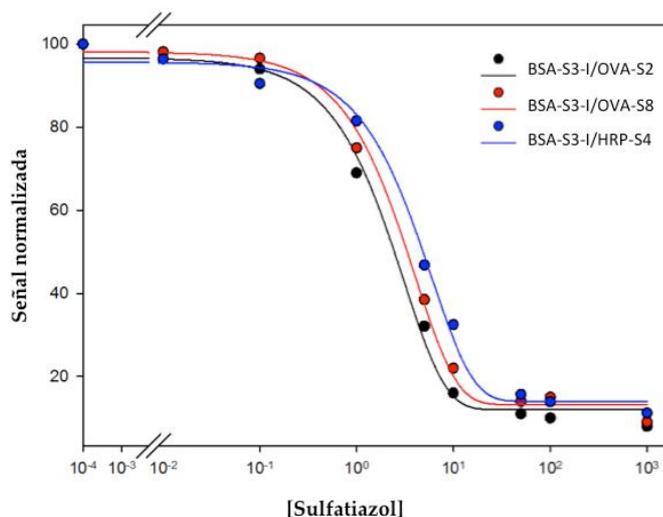


**Figura IV.3. Influencia del % Tween 20 (v/v) sobre las características analíticas del ensayo.** Cada punto representa la media de tres determinaciones. *Ensayo A:* Formato directo: BSA-S3-I/HRP-S4; *Ensayo B:* Formato indirecto: BSA-S3-I/OVA-S2; *Ensayo C:* Formato indirecto: BSA-S3-I/OVA-S8.

#### 4.8.2. Características analíticas de los inmunoensayos propuestos

En las condiciones optimizadas para cada combinación de inmunoreactivos se realizaron una serie de curvas de competición ( $n=50$ ) en tampón de ensayo, utilizando patrones de STZ (**Figura IV.4**). Las curvas de calibrado se normalizaron, siendo la absorbancia obtenida para cada concentración de analito ( $B$ ), el porcentaje de la respuesta máxima ( $B_0$ ), tal y como se describe en la siguiente ecuación:

$$\text{Señal normalizada} = \left( \frac{B}{B_0} \right) \times 100$$



**Figura IV.4.** Curva de calibrado media (n=50) para STZ en: a) formato directo BSA-S3-I/HRP-S4: formato directo PBS 10 mM con 0,1 % Tween, pH 7,5; b) formato indirecto BSA-S3-I/OVA-S2 formato indirecto PBS 30 mM con 0,2 % Tween, pH 6,5; c) Curva de calibrado media (n=50) para el ensayo genérico, BSA-S3-I/OVA-S8, formato indirecto, PBS 30 mM con 0,2 % Tween, pH 6,5.

Los parámetros analíticos obtenidos con los ELISAs optimizados para las combinaciones de inmunorreactivos seleccionadas se muestran en la **Tabla IV.2**.

**Tabla IV.2.** Valores paramétricos de las curva de calibrado de los ELISAs optimizados para STZ (A y B) y genérico (C) para varias sulfonamidas.

|                                   | IC <sub>50</sub><br>(µg L <sup>-1</sup> ) | A <sub>0</sub><br>(U.A.) | RD<br>(µg L <sup>-1</sup> ) | LD<br>(µg L <sup>-1</sup> ) |
|-----------------------------------|---|--------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| <b>BSA-S3-I/HRP-S4 (Ensayo A)</b> | 4,8                                       | 0,69                     | 1,2 - 16                    | 0,4                         |
| <b>BSA-S3-I/OVA-S2 (Ensayo B)</b> | 2,5                                       | 1,154                    | 0,7 - 6,8                   | 0,2                         |
| <b>BSA-S3-I/OVA-S8 (Ensayo C)</b> | 3,2                                       | 1,18                     | 0,8-10                      | 0,4                         |

IC<sub>50</sub>: Sensibilidad; B<sub>0</sub>: Absorbancia máxima (U.A.: unidades de absorbancia); RD: Intervalo de trabajo; LD: Límite de detección.

Si nos fijamos en los ELISAs unianálito, al emplear el par BSA-S3-I/OVA-S2 (formato CI), se obtienen mejores valores paramétricos que con el par BSA-S3-

I/HRP-S4 (formato AI), cuya sensibilidad ( $IC_{50}$ ) es aproximadamente el doble del valor obtenido con el formato de CI, observando una tendencia similar con el LD. Utilizando como tapizado OVA-S2 se obtiene un ensayo específico para STZ, mientras que al utilizar el OVA-S8 (ensayo C), el ensayo presenta un carácter genérico, pudiendo detectar residuos de las seis sulfonamidas a concentraciones  $\geq 0,4 \mu\text{g L}^{-1}$  en tampón de ensayo, presentando un grado reconocimiento analito/antígeno similar al obtenido con en el ensayo específico.

En resumen, los inmunoensayos en formato indirecto (ensayos B y C), aunque implican una etapa más que el directo, presentaron mayor sensibilidad y señal en ausencia de analito. No obstante, todos los inmunoensayos desarrollados son adecuados para determinar residuos de STZ a los niveles recomendados por diferentes organizaciones gubernamentales y laboratorios de referencia.

#### 4.8.2.1. Especificidad. Estudios de reactividad cruzada

La especificidad de los inmunoensayos en las condiciones optimizadas, se evaluó determinando la capacidad del suero BSA-S3-I para reconocer a otros compuestos relacionados estructuralmente con STZ. A partir de las curvas de inhibición obtenidas (por cuadruplicado), se determinó la  $IC_{50}$  de cada uno de los competidores y se calculó la reactividad cruzada (RC, %).

Los resultados de RC obtenidos se recogen en la **Tabla IV.3**, en formato directo e indirecto, respectivamente.

Como puede observarse, el suero BSA-S3-I en formato AI mostró una afinidad relativa hacia sulfametoxipiridazina (RC = 19,20%) y sulfametizol (RC = 15,40%). Para el resto de compuestos evaluados, los valores de RC encontrados fueron inferiores al 9,5%.

En el ensayo B (formato CI), los valores de reactividad cruzada son muy bajos (RC < 7,8%), lo que indica la alta selectividad de este inmunoensayo.

En el ensayo genérico (ensayo C), se observa una alta RC (> 10%) frente a seis sulfonamidas, pudiendo utilizar este ensayo para determinar STZ, SMT, SMP, SPD, SSZ y PSTZ en muestras de miel.

**Tabla IV.3.** Valores de reactividad cruzada obtenidos mediante ELISA directo e indirecto (ensayo individual y genérico), para compuestos relacionados con el STZ.

| Sulfonamida                              | Ensayo A         |        | Ensayo B         |        | Ensayo C         |        |
|--|------------------|--------|------------------|--------|------------------|--------|
|  | IC <sub>50</sub> | RC (%) | IC <sub>50</sub> | RC (%) | IC <sub>50</sub> | RC (%) |
| Sulfatiazol(STZ)                         | 3,30             | 100    | 1,12             | 100    | 1,47             | 100    |
| Sulfadiazina(SDZ)                        | 202,3            | 1,63   | 164,4            | 7,77   | 19,80            | 7,42   |
| Sulfamerazina(SMZ)                       | 121,3            | 2,72   | 41,0             | 2,73   | 17,30            | 8,50   |
| Sulfametizol(SMT)                        | 21,40            | 15,40  | 27,7             | 4,04   | 3,80             | 38,70  |
| Sulfametoxazol(SMX)                      | >10.000          | <0,11  | 673,0            | 0,16   | 78,4             | 1,87   |
| Sulfametoxipiridazina(SMP)               | 17,10            | 19,20  | 22,30            | 5,02   | 12,4             | 11,85  |
| Sulfapiridina( SPD)                      | 38,60            | 8,54   | 21,70            | 5,16   | 3,8              | 38,60  |
| Sulfadimetoxina (SMD)                    | 82,30            | 4,00   | 64,80            | 1,72   | 141,6            | 1,38   |
| Sulfasalazina(SSZ)                       | 34,80            | 9,48   | 29,52            | 3,79   | 3,10             | 47,20  |
| N <sup>4</sup> -ftatilsulfatiazol (PSTZ) | 152,4            | 2,16   | 96,21            | 1,16   | 7,60             | 19,30  |

Concentraciones  $\mu\text{g L}^{-1}$ . %RC =  $(\text{IC}_{50} \text{ analito} / \text{IC}_{50} \text{ interferente}) \times 100$ .

#### 4.8.3. Aplicación de los inmunoensayos al análisis de sulfonamidas en muestras de miel. Tratamiento de la muestra

Una vez que el método analítico ha sido optimizado, el siguiente paso consiste en demostrar su aplicabilidad mediante el análisis de muestras reales. En esta tesis, también se ha abordado la validación de estos inmunoensayos utilizando dos aproximaciones. En primer lugar se ha evaluado la exactitud y precisión mediante estudios de recuperación utilizando matrices fortificadas. En segundo lugar, se ha evaluado la exactitud de la metodología mediante la comparación de los resultados obtenidos con el método de referencia.

Para el tratamiento y extracción de las muestras de miel, se utilizó el protocolo descrito en la *sección 4.6*.

#### 4.8.3.1. Estudio del efecto de la matriz

Habitualmente, determinados compuestos presentes en la matriz objeto de análisis provocan una disminución o aumento de la respuesta analítica del analito objeto de estudio. En otras palabras, para la misma concentración de analito, el análisis de una muestra real o de una disolución estándar del analito puro no proporciona la misma respuesta analítica debido al efecto de la matriz, provocando un error sistemático proporcional a la concentración de analito en la muestra.

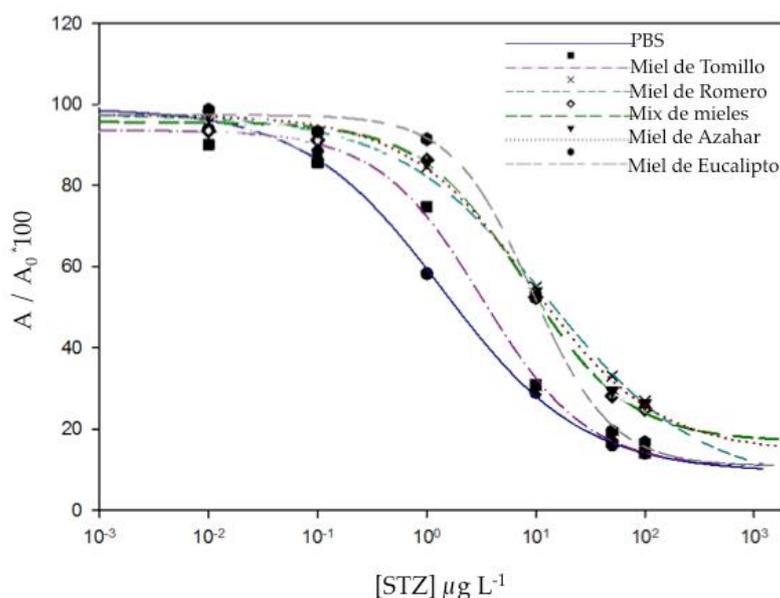
Cuando se trata de muestras líquidas, el efecto matriz puede minimizarse por simple dilución de la muestra, mediante una tamponación adecuada de la misma. También, se puede incluir un sencillo paso de filtración para eliminar partículas interferentes. Sin embargo, cuando se trata de matrices sólidas o líquidas más complejas, es necesario aplicar tratamientos más laboriosos, como la extracción en fase sólida (Jiang, Shi, WuyWang, 2011).

Para minimizar el efecto de la matriz, se recomienda seguir el método de adición estándar, que consiste en la adición de cantidades conocidas y crecientes del analito a la muestra problema, la lectura de las correspondientes respuestas instrumentales y la construcción posterior de la recta de calibrado en matriz (Miller, 2000). La cuantificación del analito se realiza por extrapolación de la recta de calibrado al punto del eje de abscisas donde la respuesta es cero.

Así, para extraer las sulfonamidas de las muestras de miel, se siguió el procedimiento descrito en el apartado de cromatografía (sección 3.6). Se seleccionaron cuatro tipos de miel de distintas variedades y características (color y textura), cubriendo así un amplio rango de variabilidad. Se compararon las curvas de inhibición obtenidas en tampón de ensayo y las construidas adicionando estándar de STZ a diferentes concentraciones directamente a la miel extraída previamente (**Figura IV.5**).

Los resultados muestran un intenso efecto de la matriz, más acusado cuanto mayor era el color de la miel enriquecida, con un desplazamiento máximo de la curva hacia la derecha (miel de eucalipto), y menos acusado a menor coloración y viscosidad de la miel (miel de tomillo). Los resultados obtenidos en este ensayo, son similares a los descritos en la validación del método cromatográfico (Capítulo III). Estos resultados concuerdan con los descritos por Bohm, Stachel y Gowik

(2012), que realizaron estudios sobre la influencia de la miel como matriz en la determinación de varios antibióticos por LC-MS/MS, evidenciando que a medida que aumentaba la intensidad del color de la miel, las diferencias se hacían más acusadas.



**Figura IV.5.** Influencia del efecto matriz de la miel sobre los inmunoensayos desarrollados. Cada valor representa el promedio de tres experimentos independientes sobre mieles de diferentes características y una mezcla de ellas frente a la curva obtenida en tampón de ensayo.

En los últimos años diferentes autores también han evaluado el efecto matriz de la miel, observando que debido a su complejidad es capaz de producir interferencias en la señal analítica, tanto en métodos *screening* como cromatográficos. En un estudio realizado por Bonvehí y Gutiérrez (2007), para comprobar que la miel de origen vasco (*“Basque country”*, NE Spain) estaba libre de residuos de antibióticos, observaron que la señal obtenida tanto por un método de *screening* (Charm), como por uno de referencia (HPLC-MS), variaba en función de la composición de la miel y el origen floral. En un estudio similar, Khong, Hammel y Guy, (2005) evidenciaron el efecto matriz al analizar tetraciclinas en muestras de miel por LC-MS/MS, ya que las pendientes de las rectas de calibrado

obtenidas en fase móvil (1.979) y en miel (4.471), eran significativamente diferentes. Estas diferencias apoyan el empleo de una curva en matriz dada la complejidad de la miel.

Recientemente, Barreto, Ribeiro, Barcellos Hoff y Dalla Costa (2012), validaron un método cromatográfico LC-MS/MS, para determinar residuos de cloranfenicol en diferentes matrices, incluyendo la miel. Llevaron a cabo una comparación entre las curvas de calibrado obtenidas (I) en fase móvil, (II) miel bruta enriquecida a los mismos niveles, sometida a extracción posterior, y (III) fortificaciones sobre el extracto de miel. Si bien no observaron diferencias significativas entre las opciones II y III, sí evidenciaron diferencias al comparar los resultados obtenidos entre I-II y I-III, llegando a obtener diferencias en la concentración de cloranfenicol tras interpolar en la recta correspondiente la señal obtenida, próximas al 50%.

Por esta razón, en este capítulo se propone el empleo de la curva en matriz, siguiendo la aproximación III, para evitar interferencias de la matriz a la hora de asignar valores de STZ, utilizando como curva de calibración un extracto de miel enriquecido a diferentes concentraciones.

#### 4.8.3.2. Análisis de muestras de miel fortificadas

Los estudios de recuperación se hicieron utilizando el ensayo en formato indirecto optimizado para STZ, ya que presenta mejor sensibilidad. Para tal fin, extractos de miel -libres de sulfonamidas-, se enriquecieron con un patrón de STZ en el intervalo de 5 a 100  $\mu\text{g kg}^{-1}$  (pbb), interpolando la señal obtenida en la curva de calibrado en matriz. Los resultados obtenidos se muestran en la **Tabla IV.4**.

**Tabla IV.4.** Estudio de recuperación de STZ en muestras de miel.

|  | STZ añadido ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ ) |                 |                 |                  |                  |                   |
|--|---------------------------------------|-----------------|-----------------|------------------|------------------|-------------------|
|  | 5                                     | 10              | 15              | 30               | 50               | 100               |
| STZ encontrado ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ ) | 5,4 $\pm$ 0,22                        | 9,89 $\pm$ 0,29 | 15,7 $\pm$ 0,12 | 29,88 $\pm$ 0,21 | 51,89 $\pm$ 0,14 | 112,35 $\pm$ 0,27 |
| R (%)                                    | 108,8                                 | 98,9            | 104,6           | 99,6             | 103,78           | 112,35            |

Valores expresados como media  $\pm$  SD (n=3).

Los valores de recuperación (en %) oscilaron en el intervalo 98,9 y 112,35 %. En base a estos valores se confirma que el método de extracción propuesto es adecuado para el análisis de este tipo de muestras, mostrando buenos resultados de exactitud, precisión y recuperación. Dado que la miel es una muestra compleja a continuación se procedió a evaluar las posibles interferencias en la señal según las características de la muestra.

#### **4.8.4. Análisis de muestra reales: estudio comparativo con cromatografía LC-MS. Fiabilidad de la metodología analítica propuesta**

La finalidad de esta investigación ha sido desarrollar un inmunoensayo que pueda ser utilizado como método analítico para la determinación de STZ en muestras de miel, aportando rapidez, sencillez, portabilidad y capacidad de trabajo.

Así, la última etapa de esta investigación fue comprobar la validez de la metodología desarrollada, aplicando el ELISA optimizado a la determinación de STZ en muestras reales, o en su defecto, en muestras a las que se les adicionó el analito (muestras reforzadas). Los resultados obtenidos mediante ELISA se compararon con los obtenidos mediante cromatografía.

En la **Tabla IV.5** se muestran las concentraciones y las recuperaciones de STZ obtenidas para las muestras seleccionadas –miel de tomillo, azahar, romero y eucalipto, y un mix de las cuatro-, aplicando la metodología optimizada (extracción-detección) en función del tipo de método de análisis aplicado. En cualquier caso, para evitar el efecto de la matriz las señales obtenidas se interpolaron en la curva de calibrado obtenida en matriz.

Como se observa en la **Tabla IV.5**, a excepción de dos determinaciones para STZ significativamente elevadas, uno obtenido mediante ELISA en miel de eucalipto (145 %) y otro determinado por HPLC-MS en miel de romero (135 %), al nivel de enriquecimiento más bajo ( $2 \mu\text{g kg}^{-1}$ ), los resultados demuestran la efectividad del método de extracción, alcanzándose valores medios de recuperación entre 90 y 114 % mediante ELISA, similares a los obtenidos por cromatografía (94-110 %).

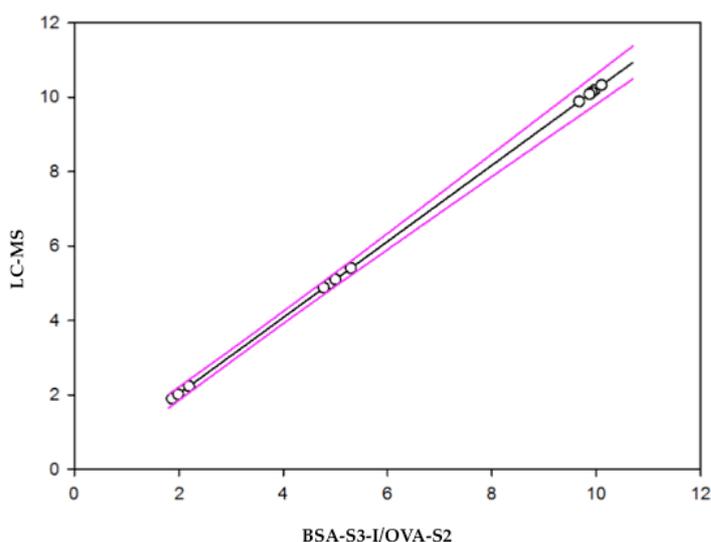
**Tabla IV.5.** Determinación de STZ en muestras de miel reforzadas. Comparación de los resultados obtenidos mediante ELISA y Cromatografía.

| Muestra              | STZ añadido<br>( $\mu\text{g kg}^{-1}$ ) | ELISA indirecto<br>específico para STZ<br>BSA-S3-I/OVA-S2 |          | HPLC-MS                                     |       |
|----------------------|--|---|----------|---|-------|
|                      |  | STZ encontrado<br>( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )               | R<br>(%) | STZ encontrado<br>( $\mu\text{g kg}^{-1}$ ) | R (%) |
| Miel de<br>Tomillo   | 2  | 1,9   | 96,5     | 2,1   | 105,0 |
|                      | 5  | 4,6   | 92,0     | 4,92  | 98,4  |
|                      | 10                                       | 9,0   | 90,0     | 10,8  | 108,0 |
| Miel de<br>Azahar    | 2  | 1,9   | 98,5     | 2,01  | 100,5 |
|                      | 5  | 5,4   | 108,0    | 4,7   | 94,0  |
|                      | 10                                       | 10,1  | 101,1    | 10,4  | 104,0 |
| Miel de<br>Romero    | 2  | 1,8   | 90,0     | 2,7   | 135,0 |
|                      | 5  | 5,0   | 100,2    | 4,7   | 94,0  |
|                      | 10                                       | 9,9   | 99,0     | 10,3  | 103,0 |
| Miel de<br>Eucalipto | 2  | 2,9   | 145,0    | 2,2   | 110,0 |
|                      | 5  | 5,7   | 114,0    | 4,8   | 96,0  |
|                      | 10                                       | 10,7  | 107,0    | 9,7   | 97,0  |
| Mix                  | 2  | 2,1   | 105,5    | 1,9   | 95,0  |
|                      | 5  | 5,3   | 106,0    | 5,4   | 108,0 |
|                      | 10                                       | 9,8   | 98,0     | 10,1  | 101,0 |

*Los resultados corresponden al valor medio de tres determinaciones.*

La exactitud del inmunoensayo desarrollado se evaluó utilizando la regresión de Deming y el software SigmaPlot 9.0 (Jandel Scientific, Erkrath, Alemania), por considerarse un procedimiento más idóneo que la regresión lineal ordinaria para comparar diferentes métodos de análisis.

Al representar gráficamente los valores de concentración obtenidos por el ELISA indirecto específico para STZ (BSA-S3-I/OVA-S2), frente a los valores determinados por LC-MS para los mismos extractos purificados, se observa una buena correlación entre ambos métodos de medida **Figura IV.6.**



**Figura IV.6.** Análisis de regresión Deming entre los resultados obtenidos por ELISA BSA-S/OVA-S2 y por LC-MS para las muestras de miel fortificadas con STZ.

En la **Tabla IV.7**, se muestran los coeficientes de correlación, así como la ordenada en el origen y la pendiente de la recta de regresión, obtenida en la comparación de ambos métodos de análisis.

**Tabla IV.6.** Parámetros de la recta de regresión de Deming obtenidos al comparar los valores de STZ detectados por ELISA y LC-MS en muestras de miel.

| Ensayo                     | a       | b      | r    |
|----------------------------|---------|--------|------|
| ELISA BSA-S/OVA-S2 - LC-MS | -0,0128 | 1,0227 | 0,98 |

a: Ordenada en el origen; b: Pendiente de la recta de regresión Deming; r: Coeficiente de correlación

Como se puede observar, los resultados obtenidos mediante inmunoensayo concuerdan con los valores aportados por LC-MS. En aquellos casos en los que la recta de regresión revela una ordenada en el origen próxima a 0,0 y una pendiente igual a 1,0; se considera que ambos métodos de análisis son estadísticamente comparables.

Los resultados obtenidos evidencian que el procedimiento analítico optimizado es específico para STZ y aplicable al análisis de sus residuos en muestras de miel.

Estos resultados revelan el potencial de las técnicas inmunoquímicas como métodos de cribado, reduciendo enormemente el número de muestras a analizar por cromatografía, justificando así su inclusión en Planes de Vigilancia y control de residuos.

#### 4.9. CONCLUSIONES

De acuerdo con las investigaciones realizadas y a los resultados obtenidos, se pueden extraer las siguientes conclusiones:

1. Se han desarrollado, caracterizado y validado tres inmunoensayos, basados en sueros policlonales, dos de ellos específicos para determinar la presencia STZ en muestras de miel, y un tercero capaz de reconocer simultáneamente a seis sulfonamidas.
2. El ELISA desarrollado para STZ, muestra una elevada sensibilidad y selectividad, aconsejando su empleo en la determinación de sus residuos en muestras de miel.
3. El ELISA genérico puesto a punto, permite la determinación simultánea de STZ, SMP, SPD, SMT, SSZ Y PSTZ, aconsejando su empleo para obtener un índice de las sulfonamidas más comunes en miel, de forma rápida y sencilla, pudiendo discriminar aquellas mieles aptas para consumo, de un análisis posterior mediante cromatografía.
4. La aplicación de inmunoensayos como métodos de análisis, permite procesar simultáneamente un mayor número de muestras que mediante cromatografía, reduciendo considerablemente el tiempo requerido para la presentación de resultados, con valores de recuperación similares a los obtenidos aplicando la metodología de referencia.

## 4.10. BIBLIOGRAFÍA

- Anklam, E., Stroka, J., Boenke, A. (2002). Acceptance of analytical methods for implementation of EU legislation with a focus on mycotoxins. *Food Control*, 13(3), 173-183.
- Barreto, F., Ribeiro, C., Hoff, R. B., Costa, T. D. (2012). Determination and confirmation of chloramphenicol in honey, fish and prawns by liquid chromatography-tandem mass spectrometry with minimum sample preparation: validation according to 2002/657/EC Directive. *Food Additives and Contaminants: Part A Chemistry, Analysis, Control, Exposure and Risk Assessment*, 29(4):550-8.
- Beyer, A., Biziuk, M. (2008). Methods for determining pesticides and polychlorinated biphenyls in food samples--problems and challenges. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 48(10), 888-904.
- Bohm, D. A., Stachel, C. S., Gowik, P. (2012). Validation of a multi-residue method for the determination of several antibiotic groups in honey by LC-MS/MS. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 403(10), 2943-2953.
- Bonvehí, J. S., Gutiérrez, A. L. (2009). Residues of antibiotics and sulfonamides in honeys from Basque Country (NE Spain). *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 89(1), 63-72.
- Chiou, J., Leung, A. H. H., Lee, H. W., Wong, W. (2015). Rapid testing methods for food contaminants and toxicants. *Journal of Integrative Agriculture*, 14(11), 2243-2264.
- Darouj, E., Massouh, L., Ghanem, I. (2016). Investigation of Ochratoxin A in Syrian consumed baby foods. *Food Control*, 62, 97-103.
- Deshpande, S. S. (2012). *Enzyme Immunoassays: From Concept to Product Development*. Springer Science and Business Media.
- Esteve-Turrillas, F. A., Agulló, C., Abad-Fuentes, A., Abad-Somovilla, A., Mercader, J. V. (2012). Immunoreagent generation and competitive assay development for cyprodinil analysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(19), 4803-4811.
- Galarini, R., Diana, F., Moretti, S., Puppini, B., Saluti, G., Persic, L. (2014). Development and validation of a new qualitative ELISA screening for multiresidue detection of sulfonamides in food and feed. *Food Control*, 35(1),

300-310.

- Gaudin, V., Hedou, C., Soumet, C., Verdon, E. (2014). Evaluation and validation of biochip multi-array technology for the screening of six families of antibiotics in honey according to the European guideline for the validation of screening methods for residues of veterinary medicines. *Food Additives and Contaminants. Part A, Chemistry, Analysis, Control, Exposure and Risk Assessment*, 31(10), 1699-1711.
- Gil Hernández, M. (2010). *Tratado de Nutrición. Tomo II: Composición y Calidad Nutritiva de los Alimentos*. Editorial Médica Panamericana.
- Girotti, S., Ghini, S., Maiolini, E., Bolelli, L., Ferri, E. N. (2013). Trace analysis of pollutants by use of honeybees, immunoassays, and chemiluminescence detection. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 405(2-3), 555-571.
- Jefferis, R., Deverill, I. (1991). *The antigen antibody reaction*. En P. C. P. Price, D. D. J. Newman (Eds.), *Principles and Practice of Immunoassay* (pp. 1-18). Palgrave Macmillan UK.
- Jiang, X., Li, D., Xu, X., Ying, Y., Li, Y., Ye, Z., Wang, J. (2008). Immunosensors for detection of pesticide residues. *Biosensors and Bioelectronics*, 23(11), 1577-1587.
- Jiang, X.-X., Shi, H.-Y., Wu, N., Wang, M.-H. (2011). Development of an enzyme-linked immunosorbent assay for diniconazole in agricultural samples. *Food Chemistry*, 125(4), 1385-1389.
- Jornet, D., González-Martínez, M. A., Puchades, R., Maquieira, A. (2010). Antibiotic immunosensing: determination of sulfathiazole in water and honey. *Talanta*, 81(4-5), 1585-1592.
- Kavanagh, O., Elliott, C. T., Campbell, K. (2015). Progress in the development of immunoanalytical methods incorporating recombinant antibodies to small molecular weight biotoxins. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 407(10), 2749-2770.
- Khong, S.-P., Hammel, Y.-A., Guy, P. A. (2005). Analysis of tetracyclines in honey by high-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry: RCM*, 19(4), 493-502.
- Law, J. W.-F., AbMutalib, N.-S., Chan, K.-G., Lee, L.-H. (2014). Rapid methods for the detection of foodborne bacterial pathogens: principles, applications, advantages and limitations. *Frontiers in Microbiology*, 5, 770.

- Lee, N. A., Kennedy, I. R. (2001). Environmental monitoring of pesticides by immunoanalytical techniques: validation, current status, and future perspectives. *Journal of AOAC International*, 84(5), 1393-1406.
- Li, Q. X., Zhao, M. S., Gee, S. J., Kurth, M. J., Seiber, J. N., Hammock, B. D. (1991). Development of enzyme-linked immunosorbent assays for 4-nitrophenol and substituted 4-nitrophenols. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 39(9), 1685-1692.
- Li, Z., Yu, Y., Li, Z., Wu, T. (2015). A review of biosensing techniques for detection of trace carcinogen contamination in food products. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 407(10), 2711-2726.
- Marques, A., Lourenço, H. M., Nunes, M. L., Roseiro, C., Santos, C., Barranco, A., ... Cencic, A. (2011). New tools to assess toxicity, bioaccessibility and uptake of chemical contaminants in meat and seafood. *Food Research International*, 44(2), 510-522.
- Mbundi, L., Gallar-Ayala, H., Khan, M. R., Barber, J. L., Losada, S., Busquets, R. (2014). *Chapter Two - Advances in the Analysis of Challenging Food Contaminants: Nanoparticles, Bisphenols, Mycotoxins, and Brominated Flame Retardants*. En J. C. F. and J. M. Heilman (Ed.), *Advances in Molecular Toxicology* (Vol. 8, pp. 35-105). Elsevier.
- Miller NM, Miller JC. (2000). *Estadística y Quimiometría para Química Analítica*, 4<sup>a</sup> ed. Prentice Hall, Madrid,
- Pastor-Navarro, N., Gallego-Iglesias, E., Maquieira, A., Puchades, R. (2007). Development of a group-specific immunoassay for sulfonamides. Application to bee honey analysis. *Talanta*, 71(2), 923-933.
- Pastor-Navarro, N., García-Bover, C., Maquieira, A., Puchades, R. (2004). Specific polyclonal-based immunoassays for sulfathiazole. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 379(7-8), 1088-1099.
- Plana, E., Moreno, M.-J., Montoya, Á., Manclús, J. J. (2014). Development and application of recombinant antibody-based immunoassays to tetraconazole residue analysis in fruit juices. *Food Chemistry*, 143, 205-213.
- Posyniak, A., Sniegocki, T., Zmudzki, J. (2002). Solid phase extraction and liquid chromatography analysis of sulfonamide residues in honey. *Bulletin-Veterinary Institute in Pulawy*, 46(1), 111-118.
- Quintana-Rizzo, J., Salter, R., Saul, S. (2005). Solid phase extraction procedures for

- validation of charm II sulfonamide, streptomycin and chloramphenicol positives and detection in honey. *Apiacta*, 40, 55-62.
- Ren, L., Meng, M., Wang, P., Xu, Z., Eremin, S. A., Zhao, J., ... Xi, R. (2014). Determination of sodium benzoate in food products by fluorescence polarization immunoassay. *Talanta*, 121, 136-143.
- Rotariu, L., Lagarde, F., Jaffrezic-Renault, N., Bala, C. (2016). Electrochemical biosensors for fast detection of food contaminants – trends and perspective. *Trends in Analytical Chemistry*, 79, 80-87.
- Sahin, E., Grillo, A. O., Perkins, M. D., Roberts, C. J. (2010). Comparative effects of pH and ionic strength on protein-protein interactions, unfolding, and aggregation for IgG1 antibodies. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 99(12), 4830-4848.
- Selvaraj, J. N., Zhou, L., Wang, Y., Zhao, Y., Xing, F., Dai, X., Liu, Y. (2015). Mycotoxin detection – Recent trends at global level. *Journal of Integrative Agriculture*, 14(11), 2265-2281.
- Tafintseva, I. Y., Zherdev, A. V., Eremin, S. A., Dzantiev, B. B. (2010). Enzyme immunoassay for determination of sulfamethoxypyridazine in honey. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 46(2), 216-220.
- Verma, N., Bhardwaj, A. (2015). Biosensor technology for pesticides--a review. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 175(6), 3093-3119.
- Wang, J., Katani, R., Li, L., Hegde, N., Roberts, E. L., Kapur, V., DebRoy, C. (2016). Rapid Detection of Escherichia coli O157 and Shiga Toxins by Lateral Flow Immunoassays. *Toxins*, 8(4), 92.
- Wutz, K., Niessner, R., Seidel, M. (2011). Simultaneous determination of four different antibiotic residues in honey by chemiluminescence multianalyte chip immunoassays. *Microchimica Acta*, 173(1-2), 1-9.
- Xu, F., Ren, K., Yang, Y., Guo, J., Ma, G., Liu, Y., ... Li, X. (2015). Immunoassay of chemical contaminants in milk: A review. *Journal of Integrative Agriculture*, 14(11), 2282-2295.
- Xu, Z.-L., Shen, Y.-D., Beier, R. C., Yang, J.-Y., Lei, H.-T., Wang, H., Sun, Y.-M. (2009). Application of computer-assisted molecular modeling for immunoassay of low molecular weight food contaminants: A review. *Analytica Chimica Acta*, 647(2), 125-136.
- Zhang, A., Ma, Y., Feng, L., Wang, Y., He, C., Wang, X., Zhang, H. (2011).

Development of a sensitive competitive indirect ELISA method for determination of Ochratoxin A levels in cereals originating from Nanjing, China. *Food Control*, 22(11), 1723-1728.

Zhang, H., Wang, S. (2009). Review on enzyme-linked immunosorbent assays for sulfonamide residues in edible animal products. *Journal of Immunological Methods*, 350(1-2), 1-13.



## **CAPÍTULO V**

### **DESARROLLO DE UN INMUNOENSAYO EN FLUJO LATERAL PARA LA DETERMINACIÓN DE SULFATIAZOL EN MUESTRAS DE MIEL**



## 5. DESARROLLO DE UN INMUNOENSAYO EN FLUJO LATERAL PARA LA DETERMINACIÓN DE SULFATIAZOL EN MUESTRAS DE MIEL

Para la monitorización de la presencia de residuos en alimentos, se recomienda seguir la siguiente estrategia analítica: i) utilizar un método *screening* que permita analizar un gran número de muestras a un bajo coste, con una presentación de resultados rápida, y que posibilite realizar un cribado de muestras diferenciando entre las libres de residuos y aquellas que superan el límite de determinación (*cut off* en versión anglosajona), del método utilizado; ii) confirmar los resultados positivos utilizando un método analítico de referencia, habitualmente cromatografía acoplada a espectrometría de masas (Anton Kaufmann, Roth, Ryser, Widmer y Guggisberg, 2002; Stolker y Brinkman, 2005; Companyó, Granados, Guiteras y Prat, 2009).

Así, en la última década se han desarrollado nuevas herramientas analíticas para dar respuesta a la necesidad de disponer de métodos de *screening* (Babacar Ngom, Yancheng Guo, Xiliang Wang y Dingren Bi, 2010; Sajid, Kawde y Daud, 2015), especialmente rápidos en la presentación de resultados, de fácil manejo y transporte, sensibles y específicos, adaptados al diagnóstico en el sitio donde pueda presentarse el problema (*in situ*). Generalmente, en estas técnicas la presentación de resultados es de tipo binario, (sí/no, positivo/negativo), tomando como referencia el valor establecido como punto de corte, *cut off* o *Point of Care* -POC- (Sajid y col., 2015).

En la actualidad, los (inmuno) ensayos en flujo lateral (LFIA) basados en técnicas inmunocromatográficas, se emplean frecuentemente en programas de monitorización para controlar la presencia de compuestos bióticos y abióticos: bacterias patógenas, toxinas, virus, micotoxinas, plaguicidas y residuos de tratamientos veterinarios a lo largo de la cadena alimentaria, así como en centros sanitarios para diagnóstico clínico. En la **Tabla V.1** se recogen los LFIA desarrollados para el análisis de sulfonamidas en diferentes tipos de muestras.

**Tabla V.1.** *Inmunoensayos en flujo lateral (LFIA) descritos en la bibliografía para la determinación de sulfonamidas en alimentos y fluidos biológicos.*

| Analito  | Marcador                      | Muestra                              | Sensibilidad                | Referencia              |
|--|-------------------------------|--------------------------------------|-----------------------------|-------------------------|
| SMTZ   | NPs de Carbón                 | Orina                                | 6,3 ng mL <sup>-1</sup>     | (O'Keeffe y col., 2003) |
| SMM<br>SDM<br>SDZ<br>SMDZ                      | NPs de Oro                    | Huevos,<br>Pollo                     | 20 - 40 ng mL <sup>-1</sup> | (X. Wang y col., 2007)  |
| SMM  | NPs de Oro                    | Suero de cerdo                       | 15 ng mL <sup>-1</sup>      | (G. Zhang y col., 2008) |
| SMTZ   | NPs de Oro                    | Leche,<br>Carne de cerdo,<br>Pescado | 20 µg kg <sup>-1</sup>      | (L. Wang y col., 2008)  |
| SSX<br>STZ<br>SMDZ<br>SMP<br>SPD<br>SMT<br>SCP | Peroxidasa                    | Leche,<br>Carne de cerdo             | 1 - 10 µg L <sup>-1</sup>   | (H. Zhang y col., 2008) |
| SMTZ   | NPs de Oro                    | Orina de cerdo                       | 8,0 µg L <sup>-1</sup>      | (Li y col., 2009)       |
| SMTZ<br>SDZ<br>SQX                             | NPs de Oro                    | Huevos,<br>Pollo                     | 80 µg kg <sup>-1</sup>      | (Guo y col., 2010)      |
| SQX  | NPs de Oro                    | Pollo                                | 0,5 ng mL <sup>-1</sup>     | (Ngom y col., 2011)     |
| STZ  | NPs de Oro                    | Miel                                 | 15 ng g <sup>-1</sup>       | (Guillén y col., 2011)  |
| STZ<br>SDZ<br>SPD<br>SMX                       | NPs de Oro                    | Leche,<br>Orina de cerdo             | 10 ng mL <sup>-1</sup>      | (L. Nie, y col., 2013)  |
| SMTZ   | Microesferas<br>fluorescentes | Leche                                | 0,11 µg L <sup>-1</sup>     | (Chen y col., 2013)     |

*NPs: Nanopartículas; SMM: Sulfamonometoxina; SDM: Sulfadimetoxina; SDZ: Sulfadiazina; SMDZ: Sulfametoxidiazina; SMTZ: Sulfametazina; SQX: Sulfaquinoxalina; STZ: Sulfatiazol; SPD: Sulfapiridina; SMX: Sulfametoxazol; SSX: Sulfisoxazol; SMP: Sulfametoxipiridazina; SMT: Sulfametizol; SCP: Sulfacloropiridazina*

### 5.1. OBJETIVOS

El **objetivo general** de las investigaciones de este capítulo ha sido el desarrollo de una metodología analítica que pueda ser utilizada como método de campo y/o *screening*, permitiendo detectar *in situ* la presencia de sulfatiazol en

muestras de miel, sirviendo como indicador de la contaminación de estas muestras.

Para ello se plantearon los siguientes **objetivos particulares**:

1. Realizar la síntesis, conjugación y funcionalización de nanopartículas de oro para enlazarlas a la fracción constante del suero policlonal específico para sulfatiazol .
2. Optimizar y validar el inmunoensayo en flujo lateral desarrollado.
3. Aplicar la metodología desarrollada a muestras reales de miel y comparar con los resultados obtenidos por el método cromatográfico de referencia.

## 5.2. PARTE EXPERIMENTAL

### 5.2.1. Reactivos químicos

El analito objeto de estudio, Sulfatiazol (STZ), así como otras sulfonamidas relacionadas estructuralmente con STZ utilizadas para evaluar la especificidad del ensayo: Sulfadiazina (SDZ), Sulfadimetoxina (SDM), Sulfamerazina (SMZ), Sulfametizol (SMT), Sulfametoxazol (SMX), Sulfametoxipiridazina (SMP), Sulfapiridina (SPD) y Sulfisoxazol (SSX), fueron suministradas por Fluka-Sigma-Aldrich Química (Madrid).

Todos los disolventes empleados (grado analítico), fueron adquiridos a Scharlab (Barcelona).

El tampón fosfato (PBS) se preparó a pH 7,5 y a una concentración de sales 137 mmol L<sup>-1</sup> NaCl, 10 mmol L<sup>-1</sup> fosfato sódico, 2,7 mmol L<sup>-1</sup> KCl.

El anticuerpo secundario de cabra anti-conejo empleado como control fue suministrado por Sigma (Madrid).

La membrana de nitrocelulosa CNPC-S3I se adquirió a Advanced Microdevices Pvt. Ltd. (India). La almohadilla o capa para depositar la muestra, la membrana para inmovilizar el conjugado y el control, así como la almohadilla o capa absorbente de parada, fueron suministradas por Schleicher y Schuell GmbH (Alemania). El soporte de poliestireno sobre el que se superponen la membrana y

las diferentes capas se adquirieron a Estok Plastics (USA), y la carcasa que protege a toda la estructura fue suministrada por Acon Biotech (China).

### 5.2.2. Instrumentación

La determinación del tamaño de partícula de oro se llevó a cabo empleando un microscopio electrónico de transmisión (modelo S-3700N, Hitachi High-Technologies Europe GmbH, Alemania).

La densidad óptica de la solución coloidal se midió usando un espectrofotómetro modelo UV-1063 Shimadzu (IZASA, Barcelona).

Para la impresión de la línea test y la línea control, así como para la impresión del conjugado (suero específico enlazado a las partículas de oro), se utilizó un dispensador programable (Isoflow, Imogene Technology, Hanover, Alemania).

Las tiras reactivas se cortaron usando una guillotina modelo CM4000 (Biodot Inc., Irvine, CA).

La centrífuga (Hereaus multifuge 3S-R) se adquirió a VWR International Eurolab S.L. (Madrid, España).

### 5.2.3. Inmunorreactivos

Para el desarrollo de la tira reactiva de STZ, se utilizó la combinación de bioreceptores antisuero/conjugado BSA-S3-I/OVA-S2, obtenidos por el Grupo de investigación del Instituto Interuniversitario de Reconocimiento Molecular y Desarrollo Tecnológico (IDM) del Departamento de Química de la Universidad Politécnica de Valencia, ya que fue el par que mostró mayor sensibilidad para STZ en placa ELISA, tal y como se ha indicado en el capítulo anterior.

### 5.2.4. Preparación de las disoluciones de trabajo

#### 5.2.4.1. Preparación de los patrones de sulfonamidas

Se prepararon disoluciones estándar (0,5 mg L<sup>-1</sup> en MeOH) para STZ y cada una de las sulfonamidas utilizadas en los estudios de reactividad cruzada. Estas

disoluciones estándar se almacenaron en frascos topacio a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  y protegidas de la luz hasta su uso.

#### 5.2.4.2. *Tratamiento de la muestra*

El procedimiento de extracción de las muestras de miel consiste en añadir a 1,25 g de miel, 12,5 mL de tampón acetato sódico 0,1 M a pH 5. Esta mezcla se mantiene en agitación durante 5 minutos, permitiendo alcanzar una completa solubilización de las muestras de miel.

#### 5.2.4.3. *Preparación de las nanopartículas de oro coloidal: sistema de amplificación de la señal*

Para conseguir una señal visual en los dispositivos de inmunoensayo en flujo lateral que permitan una discriminación objetiva, se han utilizado diferentes materiales cuyo denominador común es su reducido tamaño, clave para favorecer el flujo a través de la membrana (Sajid y *col.*, 2015). Entre ellos, las partículas de látex coloreado junto con las nanopartículas (NPs) de oro, son los sistemas de marcaje más empleados en los inmunoensayos comerciales en flujo lateral (de la Escosura-Muñiz, Parolo, y Merkoçi, 2010).

Entre las razones que nos llevaron a optar por el oro coloidal como marcador y sistema de amplificación de señal del inmunoensayo desarrollado, destacan la facilidad de preparación en el laboratorio y su bajo coste (J, Gurmin T, y Robinson N, 2000; *Colloidal Gold*, 2012).

A grandes rasgos, el oro coloidal está formado por una suspensión de partículas de oro de tamaño nanométrico, generalmente entre 2 y 150 nm, que es estable y uniforme. El líquido suele tener un aspecto rojizo cuando el tamaño de partícula coloidal es inferior a 100 nm, virando a un color azul/violáceo para partículas de mayor tamaño (Daniel y Astruc, 2004; Seydack, 2005; Goryacheva, Lenain, y De Saeger, 2013).

A pesar de que para la síntesis de NPs de oro se han descrito diferentes métodos, todos tienen en común la reducción química de una sal de oro en medio acuoso u orgánico, en presencia de un agente estabilizante o protector adecuado, el cual se une a la superficie de las NPs, aumentando su estabilidad y neutralizando las fuerzas electrostáticas (Ahmed, Annu, Ikram, y Yudha S., 2016).

En nuestro trabajo se siguió el procedimiento descrito por Frens (Frens, 1973), que emplea citrato como agente reductor y que simultáneamente actúa como agente estabilizante impidiendo la formación de agregados, permitiendo obtener de este modo partículas muy homogéneas (Turkevich, 1985). El método de síntesis consiste en la reducción química del ácido cloraurico ( $\text{HAuCl}_4$ ) mediante citrato trisódico a  $100\text{ }^\circ\text{C}$ , produciendo un coloide de excelente estabilidad y distribución de tamaño de partícula uniforme.

En concreto, la disolución acuosa de  $\text{HAuCl}_4$  se calienta a reflujo sometiéndola a una agitación vigorosa, hasta observar que el líquido entra en ebullición. En este instante se añade “de golpe”, la disolución acuosa de citrato trisódico, observando como el color de la mezcla evoluciona de amarillo a incoloro, adquiriendo tonos morados, rosas, hasta llegar a un rojo rubí intenso cuando finaliza la reacción. Al alcanzar la coloración rojiza, se mantiene la mezcla durante 15 minutos en condiciones de agitación y calefacción, y otros 15 minutos sólo en agitación mientras se va enfriando. Finalmente, a la suspensión coloidal obtenida se le añade azida sódica (0,05%, v/v) para evitar su degradación, y se almacena en un frasco de vidrio de color topacio a  $4\text{ }^\circ\text{C}$  hasta su conjugación con el anticuerpo. La disolución coloidal es estable varios meses siempre que se conserve adecuadamente (Hermanson, 1996).

#### 5.2.4.3.1. Determinación de parámetros de validez

La calidad de las NPs de oro obtenidas está relacionada con el tamaño y morfología. Para evaluar estos dos parámetros, habitualmente se recurre a técnicas de microscopía electrónica y espectrofotometría (Cushing, Kolesnichenko y O'Connor, 2004; Burda, Chen, Narayanan y El-Sayed, 2005).

Otros factores de los que depende la estabilidad del oro coloidal son la fuerza iónica del medio, el pH y la cantidad de proteínas a añadir para estabilizarlo. Así, antes de realizar la conjugación de las NPs al bioreceptor (anticuerpo), deben optimizarse las condiciones de ensayo para que la conjugación NP-anticuerpo sea la adecuada. Estos parámetros están muy relacionados con el punto isoeléctrico de la proteína a conjugar (Wong y Tse, 2008).

Para optimizar estos parámetros, en primer lugar se evaluó la estabilidad de las NPs en suspensión, observando la aparición de fenómenos de aglomeración al

modificar las características del medio. El protocolo de trabajo consiste en incubar las NPs con diferentes concentraciones de sal, seleccionando el intervalo de concentración de 50 mM a 2mN de PBS.

Una vez optimizada la concentración de sal, el siguiente paso consistió en determinar la concentración óptima del anticuerpo (suero policlonal) y el pH del oro coloidal para la preparación del conjugado. El pH de la disolución de suero debe estar próximo al punto isoeléctrico de la proteína, de modo que las fuerzas electrostáticas de repulsión y atracción estén equilibradas, consiguiendo así la máxima unión y estabilidad de los complejos.

Para determinar la mínima concentración de anticuerpo que protege al oro (MPC) estabilizándolo (Chun, 2009), se realizó un ensayo de floculación, siguiendo el método descrito por Beesley. El objetivo fue determinar la concentración mínima de anticuerpo capaz de cubrir la superficie de las partículas de oro y estabilizarlas, inhibiendo así la formación de agregados (Xie y *col.*, 2003; Yokota, 2010; Cañaveras, Madueño, Sevilla, Blázquez, y Pineda, 2012). Para ello, a un volumen de NPs de 1 mL, de tamaño constante (40 nm), al pH optimizado anteriormente, se le añaden 0,1 mL de diluciones seriadas de la proteína (suero policlonal), dejando reaccionar durante 10 minutos. Tras ello, a cada disolución se le añadieron 100  $\mu$ L de una disolución de NaCl 10% (p/v), para detener la reacción, coagulando el coloide cuando no está estabilizado por la proteína (Chun, 2009). La floculación se determina por el cambio de color rojo (coloide protegido) a color azul (coloide no protegido) (Anfossi y *col.*, 2011).

#### *5.2.4.4. Funcionalización de las nanopartículas. Conjugación del anticuerpo (suero), con las nanopartículas de oro coloidal*

La funcionalización consiste en incorporar a la superficie de las NPs de oro, moléculas con grupos funcionales específicos, en nuestro caso, anticuerpos policlonales.

Como ya se indicó en el Capítulo I, los anticuerpos son proteínas de la familia de las globulinas. Son moléculas con carga, siendo los anticuerpos de tipo polar ionizables, los que tienen un papel activo para ser conjugados, ya que dependiendo del pH, su carga será positiva o negativa. Los principales tipos de interacciones que pueden darse entre NPs y anticuerpos son del tipo: a)

interacciones electrostáticas entre las cargas negativas de las NPs y las cargas positivas de los residuos polares de aminoácidos; b) adsorción directa sobre la superficie y; c) establecimiento de un enlace cuasicovalente entre los grupos tiol de los anticuerpos y los electrones del metal.

La conjugación de las NPs de oro coloidal con el suero purificado para STZ, se realizó como se describe a continuación. A 50  $\mu$ L de suero se le añaden 10 mL de la solución de NPs de oro, 0,05% de citrato trisódico, 0,20 mM de carbonato potásico y 0,02% de azida sódica. La solución así obtenida se incuba durante toda la noche a temperatura ambiente en una ambiente sellado para evitar la degradación. A continuación, las NPs no conjugadas se bloquean añadiendo 1,0 mL de una solución de BSA al 5%, y se mantiene en agitación durante 30 minutos. El empleo de BSA como agente estabilizante es muy común, se usa habitualmente para bloquear los sitios que no ocupados por los anticuerpos específicos. Posteriormente, la mezcla se centrifuga a 12000g durante 20 minutos a 4 °C, en una microcentrífuga refrigerada. Se elimina el sobrenadante y el pellet obtenido se resuspende en tampón borato (pH 7.4), 2 mM, y la mezcla se centrifuga durante 15 minutos a 10.000 rpm. El pellet obtenido se vuelve a resuspender como se ha descrito, repitiendo este procedimiento dos veces más, eliminando completamente el sobrenadante. Por último, el pellet obtenido se resuspende en un volumen final de 3,0 mL de tampón fosfato, 10 mM (pH 7,2), que contiene: 1% de BSA, 1% de sacarosa y 0,05% de azida sódica como preservativo. La adición de una pequeña cantidad de sacarosa tiene como finalidad estabilizar los reactivos cuando son inmovilizados sobre la almohadilla (Shi, Zhao, Zhang, Hong, y Zhu, 2008; Shi y *col.*, 2008). Esta suspensión de color rojo oscuro, se almacena a 4 °C hasta su uso.

### 5.3. DESARROLLO DE LA TIRA REACTIVA

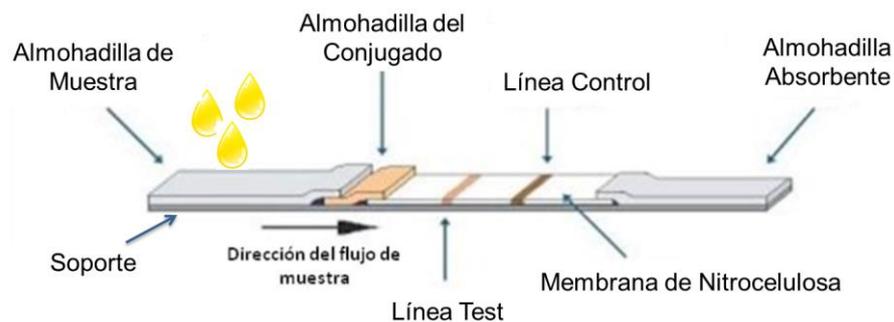
#### 5.3.1. Componentes para el desarrollo de un inmunoensayo en flujo lateral

En la **Figura V.1** se esquematizan los componentes de una tira de flujo lateral (Wong y Tse, 2008), que describimos a continuación.

- **Soporte:** Aporta rigidez a la membrana para evitar su ruptura; debe ser consistente y duro, a la vez que flexible, para permitir su corte

posterior. Sobre él se colocan todos los componentes de la tira para mantenerlos unidos.

- **Almohadilla de muestra / Sample Pad:** Su función principal es la de absorber la muestra y distribuirla hacia la almohadilla donde se encuentra el conjugado (anticuerpo-partícula de oro). Además, actúa como prefiltro reteniendo partículas de la muestra que pueden inhibir el flujo o provocar interferencias en el ensayo. Para reducir las uniones inespecíficas y minimizar las posibles adsorciones del analito a la membrana, ésta se puede tratar con un pequeño porcentaje de BSA o Tween 20, a una concentración muy baja, y posterior secado en estufa a 37 °C durante 1-2 horas. En el mercado existen Pads de diferentes materiales: poliéster, papel o fibra de vidrio.



**Figura V.1.** Esquema general de los principales componentes de un inmunoensayo en flujo lateral.

- **Almohadilla del Conjugado / Conjugate Pad:** Sobre esta almohadilla se realiza la inmovilización del anticuerpo primario específico marcado con oro, siendo su función más importante la de permitir la transferencia uniforme del reactivo de detección y la muestra sobre la membrana de nitrocelulosa. El único parámetro crítico para que el conjugado salga por completo de la almohadilla es el volumen de la muestra a analizar. Entre los materiales usados para confeccionar esta almohadilla destacan la fibra de vidrio, celulosa y poliéster.

• *Membrana de Nitrocelulosa / Nitrocellulose Membrane:* Es el soporte sobre el que se inmovilizan los inmunorreactivos de la línea control y test, sobre ella se desarrolla el inmunoensayo, por lo que se considera la parte más importante de la tira. Se emplean como materiales para esta membrana nitrocelulosa, fluoruro de polivinilideno o nylon, seleccionándose uno u otro en función de la finalidad del ensayo a desarrollar, ya que cada uno de estos materiales aporta características diferentes. Los dos materiales más conocidos y usados en investigación son la nitrocelulosa y el nylon, ambos poseen suficiente capacidad de unión de proteínas, lo que permite su uso para realizar ensayos inmunoquímicos que inmovilicen anticuerpos. Una característica muy importante de esta membrana es su porosidad. El tamaño de poro de la membrana junto con una distribución homogénea y regular de los mismos, son factores importantes, ya que condicionan la velocidad de flujo. A mayor velocidad de flujo, menos tiempo de contacto entre el antígeno y anticuerpo, por lo que el ensayo puede ser menos sensible. Generalmente se trabajan con membranas de nitrocelulosa de 5 a 15  $\mu\text{m}$ , que permite un flujo óptimo de los inmuno-reactivos, y mantiene unidas las proteínas por fuerzas de naturaleza electrostática.

• *Almohadilla Absorbente / Absorbent Pad:* Su única función consiste en absorber el exceso de reactivos que fluyen por la membrana, creando un flujo capilar continuo y unidireccional, impidiendo así el reflujos de la muestra hacia las zonas de ensayo. La única optimización posible del pad de absorción consiste en seleccionar el grado de compactación de la celulosa.

• *Casetes:* Son el habitáculo de plástico que contiene la tira. Se compone de dos secciones que encajan una en la otra. Su diseño y estructura interna es fundamental en el desarrollo y resultado del test (**Figura V.2**).



**Figura V.2** Diseño de la carcasa de plástico.

La parte superior lleva unas pestañas de presión que hacen que los reactivos fluyan por la membrana al obligarlos a salir de la almohadilla de muestra y llegar a la almohadilla de absorción. Una presión insuficiente hace que la señal sea más baja de lo esperado, pudiendo provocar resultados erróneos.

Es importante conocer las características de cada componente, ya que actuando sobre cada uno de ellos se puede mejorar la sensibilidad del ensayo (O'Farrell, 2013).

### 5.3.2. Inmovilización de los reactivos de captura

Para la impresión de los inmunorreactivos se usó el dispensador de reactivos líquidos Isoflow, que consta de tres bombas de trabajo y dos agujas de impresión (**Figura V.3**).

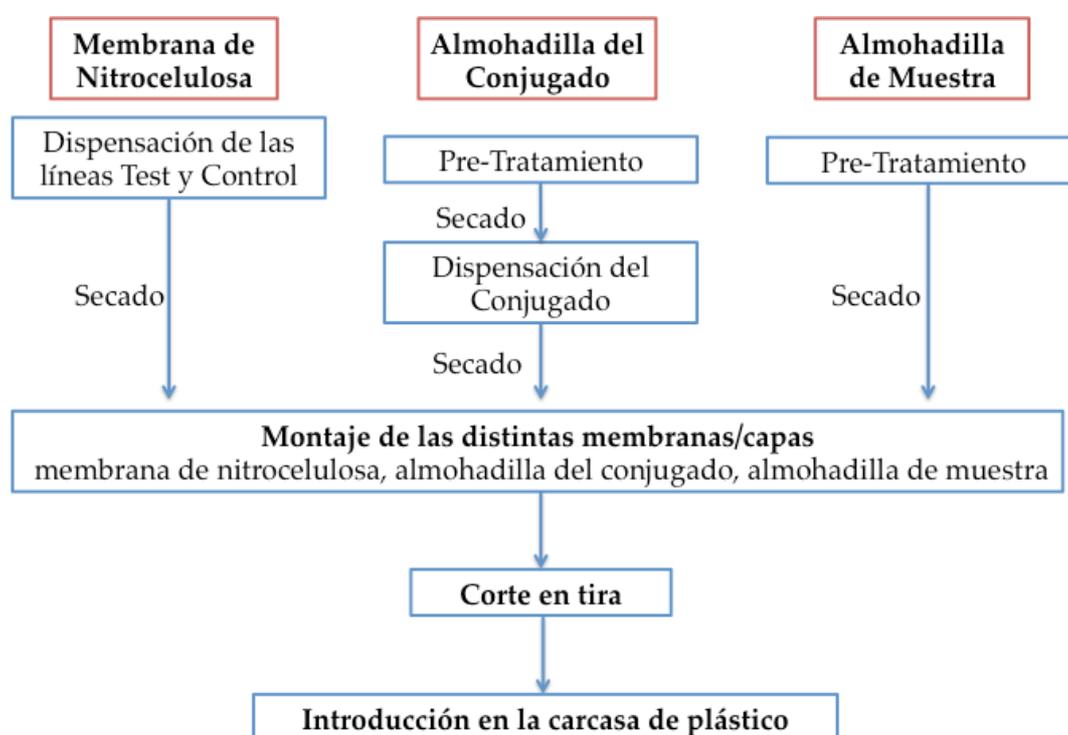


**Figura V.3.** *Equipo de impresión Isoflow dispenser.*

Sobre la membrana de nitrocelulosa se imprimen dos líneas que se corresponden con la banda control (C - Control Line), sobre la que se inmoviliza el anticuerpo secundario, y la banda de ensayo o test (T - Test Line), sobre la que se imprime el conjugado OVA-S2 para STZ. Las impresiones se hicieron en el intervalo de concentraciones de 0,05 a 2,0  $\mu\text{L}/\text{cm}$ , para después seleccionar la combinación de mayor sensibilidad.

Tras su impresión, las distintas membranas de nitrocelulosas se secaron en una estufa a 37 °C durante 12 horas, y posteriormente se guardaron en condiciones de baja humedad (<20% humedad relativa) y temperatura ambiente hasta su uso.

Con la solución de anticuerpo primario conjugado a oro, se procedió del mismo modo que con las anteriores, utilizando como rango de concentraciones de impresión 0,1 a 2,5 mg/mL, sobre una membrana de poliéster. Posteriormente se deja secar durante 1 hora a 37 °C, y a continuación se guarda en condiciones de baja humedad (<20% humedad relativa) hasta su uso. En la **Figura V.4** se muestra el esquema de trabajo seguido para la obtención y optimización de las tiras reactivas.



**Figura V.4.** Esquema general de trabajo para el desarrollo de tiras reactivas.

Una vez inmovilizados todos los inmunorreactivos en sus correspondientes soportes, se procede a montar la tira (**Figura V.1**). La membrana de nitrocelulosa, que tiene inmovilizados los bioreceptores de la línea test y la línea control, está adherida al soporte (parte inferior gris oscura). Sobre la membrana se disponen las diferentes almohadillas con el solapamiento suficiente para permitir un flujo óptimo. Así, la almohadilla de muestra (gris) solapa con la almohadilla que

contiene el conjugado (naranja), y ésta sobre la membrana. Al final se encuentra la almohadilla de absorción, que recogerá el flujo sobrante. Finalmente se recorta y coloca dentro de la carcasa de plástico.

### 5.3.3. Optimización de las concentraciones de inmunorreactivos

Para la **optimización** de las concentraciones de inmunorreactivos, se prepararon distintas tiras utilizando combinaciones de concentraciones crecientes de suero (anticuerpo primario) específico, secundario y conjugado (hapteno enlazado a proteína, línea test). El esquema de trabajo seguido se refleja en la **Tabla V.2.**

**Tabla V.2.** Concentraciones ensayadas de inmunorreactivos.

|  | Tira Reactiva |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|--|---------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
|  | T1            | T2  | T3  | T4  | T5  | T6  | T7  | T8  | T9  | T10 |
| <b>Anticuerpo Primario mg/mL</b>                         | 0,1           | 0,2 | 0,3 | 0,4 | 0,5 | 0,8 | 1,0 | 1,5 | 2,0 | 2,5 |
| <b>Conjugado <math>\mu\text{L/cm}</math></b>             | 0,05          | 0,1 | 0,4 | 0,8 | 1,0 | 1,2 | 1,4 | 1,6 | 1,8 | 2,0 |
| <b>Anticuerpo Secundario <math>\mu\text{L/cm}</math></b> | 0,05          | 0,1 | 0,4 | 0,8 | 1,0 | 1,2 | 1,4 | 1,6 | 1,8 | 2,0 |

Sobre cada una de las combinaciones de inmunorreactivos (T1-T10), se ensayaron distintas cantidades de muestras de miel, tal y como se recogen en la **Tabla V.3.**

**Tabla V.3.** Cantidades en peso de muestra ensayadas.

| Muestra           | M1  | M2   | M3   | M4  | M5   | M6   | M7  | M8   | M9   | M10 |
|-------------------|-----|------|------|-----|------|------|-----|------|------|-----|
| <b>gr de miel</b> | 0,5 | 0,75 | 0,80 | 1,0 | 1,25 | 1,50 | 2,0 | 2,25 | 2,50 | 3,0 |

Para cada una de las muestras de miel, se tomaron 10 volúmenes distintos de la disolución de extracción, desde 80 hasta 150  $\mu\text{L}$ , tal y como aparece reflejado en la **Tabla V.4.**

**Tabla V.4.** *Volumen de muestra ensayado.*

| <b>Alícuota</b> | <b>A1</b> | <b>A2</b> | <b>A3</b> | <b>A4</b> | <b>A5</b> | <b>A6</b> | <b>A7</b> | <b>A8</b> | <b>A9</b> | <b>A10</b> |
|-----------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|------------|
| <b>μL</b>       | 80        | 85        | 90        | 95        | 100       | 110       | 120       | 130       | 140       | 150        |

De esta forma, para cada muestra de miel (M), se ensayaron diez volúmenes distintos (A1-A10), con cada una de las tiras (T1-T10), como se describe en la **Tabla V.5.**

Así, para cada cantidad de muestra se ensayaron todos los volúmenes, desde 80 a 100 μL, sobre cada combinación de inmunorreactivos (T1 a T10) inmovilizados. Este esquema de trabajo se repitió con cada cantidad de muestra.

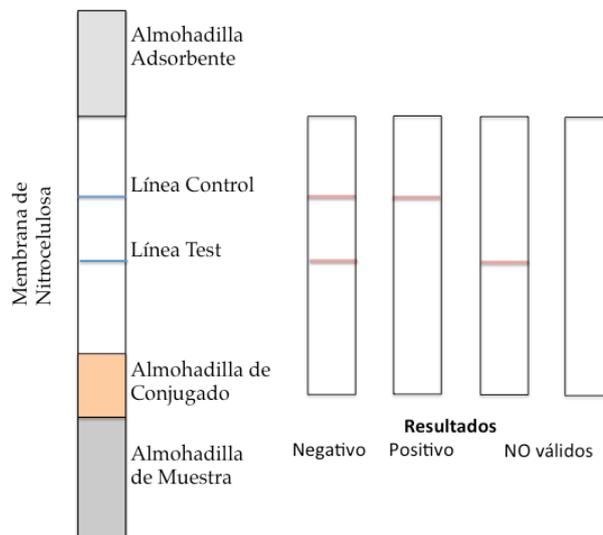
**Tabla V.5.** *Esquema de trabajo para la optimización.*

| <b>Muestra</b> | <b>Combinación Ensayada</b> |        |        |        |        |        |        |        |        |        |
|----------------|-----------------------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| <b>M1</b>      | T1-T10                      | T1-T10 | T1-T10 | T1-T10 | T1-T10 | T1-T10 | T1-T10 | T1-T10 | T1-T10 | T1-T10 |
|                | A1                          | A2     | A3     | A4     | A5     | A6     | A7     | A8     | A9     | A10    |
| <b>M2</b>      | T1-T10                      | T1-T10 | T1-T10 | T1-T10 | T1-T10 | T1-T10 | T1-T10 | T1-T10 | T1-T10 | T1-T10 |
|                | A1                          | A2     | A3     | A4     | A5     | A6     | A7     | A8     | A9     | A10    |
| <b>M3</b>      | T1-T10                      | T1-T10 | T1-T10 | T1-T10 | T1-T10 | T1-T10 | T1-T10 | T1-T10 | T1-T10 | T1-T10 |
|                | A1                          | A2     | A3     | A4     | A5     | A6     | A7     | A8     | A9     | A10    |
| <b>M4</b>      | T1-T10                      | T1-T10 | T1-T10 | T1-T10 | T1-T10 | T1-T10 | T1-T10 | T1-T10 | T1-T10 | T1-T10 |
|                | A1                          | A2     | A3     | A4     | A5     | A6     | A7     | A8     | A9     | A10    |
| <b>M5</b>      | T1-T10                      | T1-T10 | T1-T10 | T1-T10 | T1-T10 | T1-T10 | T1-T10 | T1-T10 | T1-T10 | T1-T10 |
|                | A1                          | A2     | A3     | A4     | A5     | A6     | A7     | A8     | A9     | A10    |
| <b>M6</b>      | T1-T10                      | T1-T10 | T1-T10 | T1-T10 | T1-T10 | T1-T10 | T1-T10 | T1-T10 | T1-T10 | T1-T10 |
|                | A1                          | A2     | A3     | A4     | A5     | A6     | A7     | A8     | A9     | A10    |
| <b>M7</b>      | T1-T10                      | T1-T10 | T1-T10 | T1-T10 | T1-T10 | T1-T10 | T1-T10 | T1-T10 | T1-T10 | T1-T10 |
|                | A1                          | A2     | A3     | A4     | A5     | A6     | A7     | A8     | A9     | A10    |
| <b>M8</b>      | T1-T10                      | T1-T10 | T1-T10 | T1-T10 | T1-T10 | T1-T10 | T1-T10 | T1-T10 | T1-T10 | T1-T10 |
|                | A1                          | A2     | A3     | A4     | A5     | A6     | A7     | A8     | A9     | A10    |
| <b>M9</b>      | T1-T10                      | T1-T10 | T1-T10 | T1-T10 | T1-T10 | T1-T10 | T1-T10 | T1-T10 | T1-T10 | T1-T10 |
|                | A1                          | A2     | A3     | A4     | A5     | A6     | A7     | A8     | A9     | A10    |
| <b>M10</b>     | T1-T10                      | T1-T10 | T1-T10 | T1-T10 | T1-T10 | T1-T10 | T1-T10 | T1-T10 | T1-T10 | T1-T10 |
|                | A1                          | A2     | A3     | A4     | A5     | A6     | A7     | A8     | A9     | A10    |

### 5.3.4. Fundamentos operacionales de una tira en flujo lateral

El inmunoensayo en flujo lateral desarrollado para la detección de sulfatiazol en muestras de miel, es un inmunoensayo de tipo directo basado en una reacción competitiva. El analito presente en la muestra, sulfatiazol, reacciona con el anticuerpo marcado con oro en mayor o menor proporción según su presencia en la muestra, y la cantidad del complejo formada es evaluada en una segunda etapa.

Al añadir la muestra sobre la almohadilla de muestra, ésta se humedece rápidamente y el flujo avanza hacia la zona dónde está impreso el anticuerpo conjugado a oro provocando su solubilización. Al solubilizarse comienza a migrar junto con el frente de flujo de la muestra, hasta la membrana de nitrocelulosa. Si la concentración de STZ en la muestra es baja, quedarán sitios de reconocimiento libres en el suero específico, que al pasar por la zona de la membrana donde está inmovilizado el conjugado (OVA-S2), se unirán a él formando una clara línea test de color rojo (**Figura V.5**).



**Figura V.5.** LFIA competitivo para la detección de STZ usando como marcador NPs de oro.

Por el contrario, si la concentración de STZ es alta en la muestra, se bloquearán los sitios de reconocimiento específico, no uniéndose el suero marcado con oro al conjugado (OVA-S2) al pasar el frente por la línea test. En una u otra situación, el anticuerpo conjugado a oro sigue migrando y será atrapado por la fracción constante por el anticuerpo secundario (GAR), formando la línea control, que siempre debemos observar y servirá como criterio de validez del ensayo.

En resumen, el resultado (positivo o negativo) y la intensidad de la señal de la línea test dependerá de la cantidad de sulfatiazol en la muestra de miel objeto de análisis, es decir, que a mayor concentración de sulfatiazol, menor señal en la línea test, hasta llegar a la desaparición de la línea cuando supera el límite de detección visual (*cut off*).

#### 5.4. CARACTERÍSTICAS DEL ENSAYO Y VALIDACIÓN

Para determinar el límite de detección visual (VLD), junto con las características analíticas del inmunoensayo desarrollado, sensibilidad, especificidad y eficiencia, se preparó una solución patrón de sulfatiazol a una concentración de 100 mg L<sup>-1</sup> en metanol, y a partir de ella se enriquecen diferentes muestras de miel en el intervalo de concentraciones 1,0 a 500 ng g<sup>-1</sup>. Estas muestras enriquecidas junto con un blanco, se sometieron al tratamiento de muestra descrito en la sección 5.2.4.2., para posteriormente ser analizadas con el dispositivo descrito.

La concentración más baja en las muestras de miel enriquecidas que dió un valor positivo e inequívoco, se definió como límite de detección visual (VLD) del dispositivo.

Las muestras de miel fueron analizadas por triplicado por cuatro individuos distintos, a los que se les entrenó previamente en el manejo del sistema de detección. Además, las muestras de miel enriquecidas también se analizaron por HPLC-MS, tomando estos valores como correctos (gold standard), por considerarse la metodología de referencia.

Para determinar la validez del LFIA desarrollado para la detección de STZ en muestras de miel, fue necesario realizar un estudio estadístico. Para valorar la exactitud del método, definida como la capacidad de detectar correctamente una

sustancia cuando está presente y descartarla cuando está ausente, hay que determinar la especificidad y sensibilidad del mismo, definiendo para ello unos criterios operacionales.

Así, los **Falsos positivos (FP)** son los resultados que indican la presencia del analito en la muestra y sin embargo no está presente o bien, está a una concentración próxima al VLD.

Los **Falsos negativos (FN)** se definen como aquellos resultados que indican que no existe analito en la muestra y sin embargo se ha determinado por otra técnica analítica (cromatografía en nuestro caso), que su concentración está por encima del VLD.

Un resultado **Verdadero positivo (TP)** indica que el analito está presente en la muestra a una concentración superior a la del punto de corte.

Un resultado **Verdadero negativo (TN)** indica que realmente el analito está por debajo del punto de corte.

Apoyándonos en estos criterios, se pueden generar tablas de doble entrada (**Tabla V.6**), donde tras evaluar la diagonal de aciertos (TP-TN) y la de errores (FN-FP), podemos establecer la exactitud del método comparando los resultados obtenidos con el valor real. Además, esta tabla también permite calcular otros parámetros.

**Tabla V.6.** *Tabla de doble entrada.*

|                |           | PREDICCIÓN      |                 |                    |
|----------------|-----------|-----------------|-----------------|--------------------|
|                |           | POSITIVO        | NEGATIVO        |                    |
| ESTADO<br>REAL | PRESENCIA | TP              | FN              | TOTAL<br>PRESENCIA |
|                | AUSENCIA  | FP              | TN              | TOTAL<br>AUSENCIA  |
|                |           | TOTAL POSITIVOS | TOTAL NEGATIVOS | TOTAL              |

La **sensibilidad**  $\{(TP/(TP+FN)) \times 100\}$  se define como el porcentaje de resultados positivos con niveles detectables del analito analizado, mientras que la **especificidad**  $\{[TN/(FP+TN)] \times 100\}$  es la capacidad de determinar la ausencia de analito en miel, y se expresa como el porcentaje de resultados negativos con valores por debajo del VLD de la tira.

La **eficiencia**  $\{[TN+TP/(FP+TP+FN+FP)] \times 100\}$  se define como la capacidad del dispositivo para determinar correctamente la presencia o ausencia del analito analizado.

La Decisión 2002/657 establece que para un método de *screening* cualitativo, las características de funcionamiento mínimas a determinar para su validación son: el límite de detección ( $CC\beta$ ), especificidad y estabilidad o robustez (EC 2002).

La capacidad de detección es el contenido mínimo de la sustancia que puede ser detectado, identificado o cuantificado en una muestra, con una probabilidad de error  $\beta$ . El error  $\beta$  se define como la probabilidad de que la muestra analizada sea realmente no conforme aunque se haya obtenido una medición conforme. En el caso de sustancias para las que no se ha establecido un límite máximo de residuo permitido, el  $CC\beta$  se puede calcular analizando un mínimo de 20 muestras blancas, enriquecidas con el analito hasta el límite de decisión y por encima del mismo. En este caso, la capacidad de detección del método es igual al nivel de concentración en el que sólo se obtenga menos del 5% de resultados de falsos conformes. Para ello, se procesan como mínimo 20 muestras a cada nivel, para garantizar así a fiabilidad de los resultados.

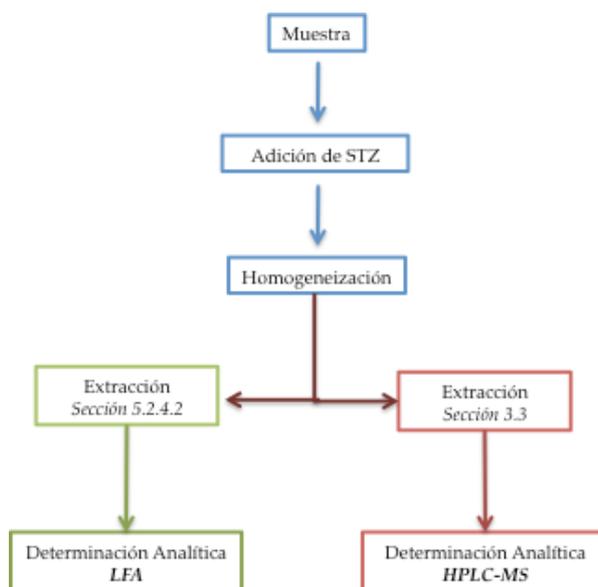
En los estudios de *estabilidad o robustez*, se introducen variaciones (operarios, lotes de disolventes y reactivos, muestras, etc.), que puedan influir en los resultados. Es importante que el método analítico distinga entre el analito y sustancias relacionadas estructuralmente.

Por ello, para establecer la **especificidad** (reactividad cruzada) del ensayo para STZ, se evaluó el grado de reconocimiento del suero BSA-S3-I hacia otros compuestos relacionados estructuralmente con el STZ (SDZ, SDM, SMZ, SMT, SMX SMP, SPD y SSX). De cada uno de estos compuestos se preparó una disolución patrón en DMSO a una concentración  $100 \text{ mg L}^{-1}$ , así como una mezcla que contenía a todos ellos excepto STZ, que fueron conservadas a  $4 \text{ }^\circ\text{C}$ . Las

disoluciones de trabajo se prepararon por dilución de los respectivos patrones con tampón acetato sódico 1,2 M, en el rango de concentraciones de 0,01 a 50 mg L<sup>-1</sup>. Para realizar los dopajes de muestras se utilizaron muestras de miel, analizadas previamente por cromatografía, y libres de residuos de sulfonamidas.

La reactividad cruzada se estableció a partir de las determinaciones visuales, indicando los resultados obtenidos como +/- (respuesta binaria).

Para estudiar la **fiabilidad** del LFIA desarrollado, se diseñó el siguiente esquema de trabajo (**Figura V.6**), que consiste en analizar cada muestra de miel por dos métodos de análisis de forma simultánea, comparando los resultados obtenidos por cada uno de ellos, el aquí propuesto (LFIA) y el descrito y validado en el Capítulo III (HPLC-MS).



**Figura V.6.** Esquema de trabajo para estudiar la fiabilidad de la nueva metodología desarrollada.

Cada muestra de miel objeto de análisis fue identificada con una letra, y dopada con STZ a varios niveles (0, 1, 5, 10, 20, 50, 100, 200 y 500 ng gr<sup>-1</sup>). Tras dejarlas incubar durante 30 minutos para conseguir una buena homogeneización del analito en la matriz, se tomaron dos submuestras de cada concentración para

realizar su extracción: i) por el protocolo descrito en la sección 5.2.4.4, para su determinación analítica por LFIA, o ii) mediante el procedimiento descrito en el apartado de cromatografía, sección 3.3., para su posterior determinación por HPLC-MS, utilizando este resultado como verdadero para establecer la comparación entre ambas metodologías.

La precisión se estableció utilizando triplicados de cada muestra y nivel de fortificación, realizando cada una de las determinaciones también por triplicado.

## 5.5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 5.5.1. Selección del marcador, optimización y caracterización de las nanopartículas (NPs) de oro coloidal

A la hora de seleccionar un marcador u otro deben tenerse en cuenta si el ensayo diseñado es cuantitativo o cualitativo, si se requiere la unión covalente al soporte, el nivel de sensibilidad que se requiere, si es un ensayo simple o multianalito, e incluso el coste del proceso de fabricación (Wong y Tse, 2008). En base a estas hipótesis de partida, el test a diseñar en esta memoria no requerirá la unión covalente a la membrana y será cualitativo, proporcionando una sensibilidad adecuada para poder discriminar entre muestras positivas y negativas para STZ, seleccionando en consecuencia oro coloidal como marcador, dadas sus excelentes prestaciones, ya que permite conjugar proteínas en su superficie de forma sencilla, se trata de un material versátil, estable y de fácil preparación y no forma agregados con facilidad (Tweney, 2006).

Para la obtención de NPs de oro coloidal, se han desarrollado distintos protocolos de laboratorios que permiten obtener partículas de distinto tamaño (Oliver, 1999). En general, todos los métodos utilizan un agente reductor (citrato sódico, ácido ascórbico, borohidruro de sodio, entre otros), que transforma las partículas iónicas de oro presentes en ( $\text{HAuCl}_4$ ) en átomos de metal libres. Como se indicó en el apartado 5.2.4.3., el método que utilizado en esta memoria es el descrito por Frens, que permite obtener NPs de un tamaño de 40 nm.

En la preparación del oro coloidal es muy importante mantener estables las condiciones de fabricación, ya que cambios en la relación entre concentraciones de reactivos y fluctuaciones de temperatura, provocan cambios en el diámetro

promedio de las partículas obtenidas (Xia, Xiahou, Zhang, Ding y Wang, 2016). Así, la disminución en la temperatura de la reacción acarrea la síntesis de partículas de mayor tamaño y de formas irregulares.

El tamaño de las nano-partículas de oro coloidal depende directamente de la cantidad de citrato trisódico (Jana, Gearheart, y Murphy, 2001; Nguyen, Kim, So, y Kim, 2010) (**Tabla V.7**), actuando éste como agente reductor y estabilizador aniónico, aportando cargas negativas que inducen fuerzas de repulsión entre las nanopartículas, favoreciendo el estado monodisperso y su mantenimiento en suspensión, indefinidamente (Horisberger y Vauthey, 1984; Hermanson, 2013).

**Tabla V.7** Variación del diámetro de las NPs en función del volumen de citrato sódico adicionado.

| Volumen (ml) de disolución de citrato sódico al 1 % | Diámetro, nm |
|---|--------------|
| 1,00  | 16           |
| 0,75  | 25           |
| 0,50  | 41           |
| 0,40  | 72           |
| 0,21  | 98           |
| 0,16  | 147          |

A nivel práctico, se ha descrito que es preferible añadir el agente reductor sobre la solución de oro que viceversa. La adición debe ser rápida y la agitación vigorosa (Wong y Tse, 2008). Otro aspecto a tener en cuenta para obtener NPs de oro de calidad es que todo el material de cristal empleado tiene que estar muy limpio, y ser enjuagado con agua destilada para eliminar trazas de detergentes antes de su uso.

Obtenida la solución de oro coloidal, el siguiente paso consiste en comprobar la calidad de la misma, utilizando para su caracterización técnicas de microscopía electrónica y espectrofotometría.

El estudio del espectro de absorción de la muestra proporciona información sobre el tamaño de las partículas en la solución. Todas las suspensiones de oro coloidal muestran un único pico de absorción en el rango del visible, a longitudes de onda comprendidas entre 510 y 550 nm, y para las NPs esféricas de oro, los espectros de absorción aparecen en el intervalo de  $\lambda$  (518 nm - 565 nm), que se relacionan con tamaños de partículas entre 9 nm y 100 nm (Chun, 2009).

Las partículas de oro coloidal de tamaño 20-40 nm son la más empleadas en inmunocromatografía, produciendo un pico característico a 520 nm (Mallick, Wang, y Pal, 2001), observándose una disminución en la longitud de onda con el tamaño de partícula, así como una ligera disminución de la absorbancia que sigue una relación inversamente proporcional al tamaño de la misma ( $1/r$ ), donde  $r$  es el radio de la partícula. En la caracterización de nuestra suspensión coloidal se obtuvo un pico de absorbancia a 525 nm para un tamaño de diámetro medio de 40 nm.

La microscopía electrónica de transmisión proporciona imágenes de las NPs, que permiten analizar tanto el tamaño medio, como la distribución de tamaños de las NPs de oro coloidal obtenidas. En las microfotografías obtenidas, se observó una buena dispersión de las partículas de oro (preparación monodispersa) sin formar agregados y un diámetro uniforme, comparable con el del oro coloidal comercial (40 nm).

Otros trabajos descritos en la bibliografía corroboran que el tamaño (40 nm de diámetro) seleccionado en este trabajo para las NPs de oro coloidal es óptimo para el desarrollo de este tipo de ensayos (Laitinen y Vuento, 1996; Christopher, Robinson y Shaw, 2005; Shim y *col.*, 2006; Wong y Tse, 2008; Cvak, Pum, Molinelli y Krska, 2012).

Una vez caracterizada la suspensión de NPs de oro coloidal, y antes de utilizarla como marcador, hay que controlar su estabilidad en disolución, de forma que se asegure una distribución uniforme del conjugado en el soporte (Almohadilla de Conjugado, ver **Figura V.1**).

Para conseguir una conjugación óptima entre las NPs de oro coloidal y las proteínas, en nuestro caso anticuerpos (suero policlonal), hay que establecer previamente las condiciones de reacción, controlando la molaridad máxima o fuerza iónica que toleran las NPs antes de agregarse irreversiblemente, así como

el pH del tampón a emplear y la concentración del anticuerpo policlonal (Hermanson, 2013; Colloidal Gold, 2012; Jazayeri, Amani, Pourfatollah, Pazoki-Toroudi, y Sedighimoghaddam, 2016). El objetivo es minimizar la agregación entre NPs y maximizar la cantidad de proteínas unidas por las NPs (Seydack, 2005).

En el estudio de la respuesta de agregación de las NPs al modificar la concentración salina del medio, se observa un desplazamiento de la banda de absorción a medida que aumenta la concentración salina. El resultado concuerda con el descrito por Jonas Ljungblad (2009), que evidenció que a mayor concentración de sal en el medio de reacción, mayor es la agregación de las NPs, y en consecuencia, disminuye la absorbancia a la longitud de onda esperada ( $\lambda_{\max}$  520 nm), ya que se produce un cambio de color (de rojo a azul), como consecuencia del incremento de tamaño de las partículas. El aumento de cationes del medio al aumentar la concentración salina, equilibra parcial o totalmente la carga negativa del anion citrato, provocando la desestabilización de las NPs, dando lugar así a la formación de agregados.

La suspensión de NPs se mantiene estable hasta valores de PBS 10 mM, seleccionando ésta como concentración óptima tanto para el mantenimiento de los anticuerpos como para su adición a las NPs.

Una vez optimizada la concentración salina del medio, se realizaron estudios de estabilidad de las NPs de oro en función del pH. El pH de la disolución de los anticuerpos debe estar próximo a su punto isoeléctrico, de forma que las fuerzas de repulsión y atracción electrostáticas estén equilibradas, consiguiendo así una máxima unión y estabilidad de los complejos. Para asegurar un predominio de cargas positivas que permitan la interacción con las cargas negativas de las NPs, se seleccionó un pH de trabajo de 7, ligeramente por encima del punto isoeléctrico (Hermanson, 2013). Estas condiciones de pH de trabajo son compatibles con el tampón (PBS) utilizado (Wong y Tse, 2008).

Esta selección de pH también puede explicarse utilizando como base las referencias bibliográficas que apuntan que el principal factor responsable de la estabilidad del coloide es la carga de los aniones citrato. El ácido cítrico es un ácido triprótico cuyos valores de pKs son los siguientes:  $pK_1=3,28$ ;  $pK_2=4,76$ ; y

$pK_3=6,4$  (Brown, Jr, Bursten y Burdge, 2004); y la carga que exhibe depende directamente del pH del medio.

De esta forma, modificaciones del pH del medio hacen que el comportamiento del ácido cítrico varíe, modificándose la estabilidad del coloide. A  $pH > 6,4$ , el citrato se encuentra en forma trianiónica, existiendo una gran densidad de carga negativa en la superficie que contribuye a la estabilización del coloide. En los intervalos de pH (4,76–6,4), y (3,28–4,76), sigue existiendo carga negativa aunque inferior a la que existía por encima de pH 6,4, pero suficiente para mantener la dispersión estable. Cuando el pH desciende por debajo de 3,3, la forma predominante de citrato es la neutra, de manera que al carecer de carga negativa el coloide se vuelve inestable al no existir fuerza repulsiva que lo estabilice.

La mínima cantidad de proteína necesaria para impedir la floculación (MPC), es considerada como la concentración óptima para mantener estables las NPs (Colloidal Gold, 2012). Por debajo de esta concentración de proteína el oro se agrega, mientras que si superamos la MPC, aunque las partículas se mantengan estables, no se consigue una ganancia en la respuesta (sensibilidad). Así, la MPC corresponde a la primera concentración de proteína donde se observa una caída significativa en el valor de absorbancia, y ésta se hace relativamente constante (Yokota, 2010). En nuestro caso, el máximo de estabilización se alcanzó a una concentración de proteína (suero policlonal) de 1,45 mg/mL, fijando ésta como MPC.

Optimizadas las condiciones de bioconjugación, ésta se llevó a cabo siguiendo el procedimiento descrito en la sección 5.2.4.4. Según Hermanson, (1996), los anticuerpos se adsorben al oro coloidal por la región constante (Fc), dejando libre la región variable (Fab) para permitir su unión al antígeno. Esta unión se ve estabilizada por la interacción entre la carga negativa de la superficie de las NPs de oro, con la carga positiva de aminoácidos (Ejemplo: lisina) del anticuerpo, o también por las interacciones hidrofóbicas entre la superficie negativa de las NPs y los aminoácidos aromáticos (Ejemplo: triptófano) (Luttmann, Bratke, Kupper, y Myrtek, 2006).

### 5.5.2. Selección de los materiales y optimización de la velocidad de flujo

La selección de los distintos soportes y membranas, es sin duda uno de los aspectos más importantes en el desarrollo de un inmunoensayo en flujo lateral.

Como se ha señalado anteriormente, el principal componente es la membrana, y su elección es fundamental para que el test a desarrollarse alcance el éxito que se le presupone. La membrana utilizada habitualmente en la mayoría de inmunoensayos en flujo lateral ha sido la de nitrocelulosa (Leung y *col.*, 2003; van Dam y *col.*, 2004; Jin y *col.*, 2005; Wong y Tse, 2008). Se han desarrollado y evaluado otros materiales como nylon modificado o fluoruro de polivinilideno, que no han terminado de entrar en el mercado, bien por su mayor coste, limitada utilidad, o incluso por la gran experiencia acumulada durante años de empleo de la nitrocelulosa (Deshpande, 2012).

Entre las ventajas de la nitrocelulosa cabe destacar su bajo coste, facilidad de manejo y buen flujo capilar. Sin embargo, no está exenta de inconvenientes, ya que muestra escasa reproducibilidad de resultados entre lotes distintos, condicionando a los fabricantes al desarrollo de estrategias adecuadas para solventar estos inconvenientes (Mansfield, 2005).

Así, para una adecuada selección de la membrana se deben optimizar previamente diferentes parámetros como la capacidad de unión de la proteína, la porosidad y la fuerza de tensión (Henderson y Stewart, 2002; Posthuma-Trumpie, Korf, y Amerongen, 2008; Deshpande, 2012).

La porosidad de la membrana está relacionada con la velocidad de flujo, siendo éste un aspecto crítico en el diseño de estos dispositivos. Para la puesta a punto del LFIA para STZ se seleccionó una membrana de nitrocelulosa de 15  $\mu\text{m}$  de tamaño de poro, utilizada habitualmente en el desarrollo de este tipo de inmunoensayos ya que permite un amplio rango de velocidades de flujo. Membranas con tamaño de poro menor retrasan la presentación de resultados, ya que requieren mayores tiempos de flujo capilar (s/cm), impidiendo que se lleven a cabo los ensayos en 5-10 minutos. En el lado opuesto, tamaños de poros mayores provocan un descenso en la sensibilidad del ensayo, ya que al disminuir el tiempo de contacto entre los bioreceptores y analito no se desarrolla adecuadamente la etapa de competición, por lo que no son aconsejables (Henderson y Stewart, 2002).

En las membranas de nitrocelulosa, la unión de las proteínas al soporte es de tipo electrostático, favoreciendo así la adsorción de proteínas (O'Farrell, 2013). Para que el funcionamiento del test sea adecuado, la orientación de los anticuerpos y proteínas es esencial, que si bien es un factor incontrolable y aleatorio por el tipo de unión (adsorción pasiva), la mayor parte de las proteínas se inmovilizan de forma adecuada. La inmovilización de los bioreceptores sobre la membrana se realizó de forma automatizada mediante el equipo Isoflow dispenser, que dibuja a razón constante de dosificación la línea del anticuerpo (Control) y la del conjugado (Test), no quedando huecos o bordes más intensos que producirían un resultado erróneo o una acumulación de reactivos (Mansfield, 2005).

Esta membrana se deposita sobre un soporte, para que le proporcione consistencia, sin interferir en el proceso, aportando rigidez (Wong y Tse, 2008).

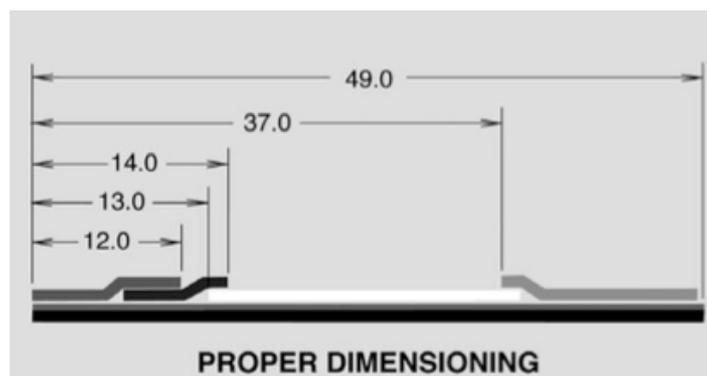
La almohadilla sobre la que se deposita la muestra es de fibra de vidrio, y para reducir las uniones inespecíficas y minimizar las posibles adsorciones del analito a la membrana se le hizo un tratamiento con Twwen 20, a una concentración muy baja, y desecación posterior en estufa a 37 °C durante 1-2 horas.

Para la almohadilla de conjugado se seleccionó como material poliéster, que permite una liberación óptima del flujo del pad cuando se rehidrata con la muestra (Mansfield, 2005). Si el conjugado no se libera de forma uniforme puede provocar modificaciones en la sensibilidad del ensayo, motivado por una mayor o menor concentración del bioreceptor en solución (Wong y Tse, 2008).

En resumen, la tira reactiva consta de una membrana de nitrocelulosa insertada entre las dos almohadillas, que alberga dos líneas impresas: una que tiene inmovilizado el conjugado (OVA-S2) para STZ (línea de reacción o Test Line), y la otra corresponde al anticuerpo secundario (línea control). Las dos almohadillas colocadas en los extremos corresponden a la almohadilla de la muestra y a la almohadilla de parada.

También es importante colocar los pad en el orden correcto y con el solapamiento adecuado para alcanzar la mayor sensibilidad (**Figura V.7**) (Carlberg, 2005; Seydack, 2005).

Por último, se coloca dentro de la carcasa de plástico, diseñada para conseguir que cada uno de los componentes de la tira no modifique su posición, permitiendo además el flujo adecuado de los inmunorreactivos a lo largo del proceso de análisis (Bangs Laboratories, Inc., 2013).



**Figura V.7.** Dimensiones óptimas para el laminado y solapamiento de las almohadillas.

Fuente: (Carlberg, 2005).

La conservación y almacenamiento de las membranas y de las tiras montadas en la carcasa, se realiza en condiciones de humedad y temperatura controladas, y en ausencia de luz (O'Farrell, 2013). Para evitar su deterioro se introducen en sobres de aluminio con desecante (almohadillas de gel de sílice) en su interior, y se almacenan en una vitrina que incorpora un control de humedad, manteniéndola por debajo del 20%.

### 5.5.3. Optimización de las concentraciones de inmunorreactivos

Siguiendo el esquema de trabajo descrito en la sección 5.3.3, se evaluaron diferentes concentraciones de inmunorreactivos (**Tabla V.2**), para seleccionar como óptima aquella con la que se obtuviera una mejor sensibilidad en base a las apreciaciones visuales del color desarrollado en la membrana (líneas test y control), tras adicionar 100  $\mu\text{L}$  de tampón de ensayo (PBS), enriquecido con un patrón de STZ a diferentes concentraciones (0-500  $\text{ng g}^{-1}$ ).

La combinación de concentraciones que proporcionó la sensibilidad adecuada se recoge en la **Tabla V.8**.

**Tabla V.8.** *Concentración óptima de inmunorreactivos en LFIA que condujo al ensayo más sensible para STZ en tampón de ensayo.*

|                                     |                          |
|-------------------------------------|--------------------------|
| Anticuerpo primario conjugado a oro | 0,25 mg mL <sup>-1</sup> |
| Conjugado OVA-S2                    | 1 µL cm <sup>-1</sup>    |
| Anticuerpo secundario               | 1 µL cm <sup>-1</sup>    |

Dado que la señal obtenida (intensidad de color) fue similar utilizando una concentración de anticuerpo primario conjugado a oro de 0,25 mg mL<sup>-1</sup> o el doble (0,5 mg mL<sup>-1</sup>) manteniendo las concentraciones del resto de inmunorreactivos, se decidió por economía de proceso seleccionar como óptima la concentración menor (0,25 mg mL<sup>-1</sup>).

Seleccionadas las concentraciones de inmunorreactivos en tampón de ensayo, se procedió a continuación a evaluar las prestaciones del dispositivo utilizando como matriz la miel. En la **Tabla V.3** se describen las cantidades de muestra utilizadas para optimizar el proceso de análisis (0,5g a 3,0g).

Al aplicar el procedimiento de análisis en muestras de miel, se observó una pérdida de intensidad de señal en la banda correspondiente al control (anticuerpo secundario) con respecto a los resultados obtenidos en PBS. En este sentido se decidió incrementar la concentración de anticuerpo primario enlazado a oro a 0,5 mg mL<sup>-1</sup>. Los resultados obtenidos con esta aproximación en cuanto a la intensidad de color en la línea, fueron comparables a los obtenidos con PBS. Este hecho puede deberse a la interferencia propia de la matriz, ya observada en otras metodologías de análisis (cromatografía y ELISA) puestas a punto y validadas en la presente Tesis, corrigiendo la interferencia mediante la elaboración de rectas de calibrado en miel. En este caso, al tratarse de un método cualitativo, logramos subsanar el efecto de la matriz duplicando la cantidad de anticuerpo específico conjugado a oro.

Con respecto a la cantidad de muestra a someter al proceso de extracción (descrito en la sección 5.2.4.2., hidrólisis rápida de la muestra con acetato sódico a pH 5), y el volumen de extracto a aplicar en el dispositivo, los mejores resultados se obtuvieron cuando se extraen 1,25 gr de miel y se aplican 100  $\mu$ L en el pad de muestra.

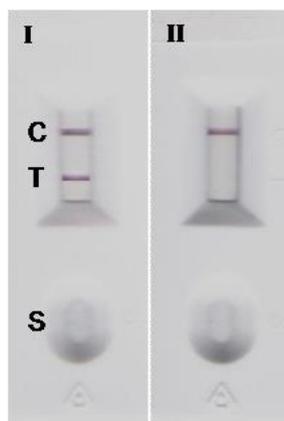
Se evaluaron mediante ensayos de prueba y error, diferentes cantidades de muestra y volumen a aplicar con el objetivo de seleccionar la mayor cantidad (representatividad), que permitiese obtener una señal nítida (sin que apareciesen manchas en la membrana de nitrocelulosa), permitiendo una velocidad de flujo de muestra continuo y limpio.

#### **5.5.4. Características analíticas del inmunoensayo en flujo lateral optimizado. Validación**

Para evaluar las prestaciones del dispositivo, se enriquecieron diez muestras de miel (50 g) con un patrón de STZ a diferentes concentraciones (0-500 ng g<sup>-1</sup>). Tras mantenerlas en agitación en ultrasonidos durante 1 h, de cada concentración se tomaron doce submuestras de 1,25 g y se adicionan a un tubo falcon de 50 mL de fondo plano, añadiendo a cada una de ellas 12,5 mL de tampón acetato sódico 0,1 M a pH 5. Tras agitación manual durante 5 minutos (hasta conseguir la solubilización completa de la muestra de miel), se toman 100  $\mu$ L de la parte superior con una mini-pipeta pasteur y se depositan en la tira optimizada, estableciendo como límite de detección visual (VLD) la concentración más baja del enriquecido que muestra un valor positivo (no aparición de línea roja en la línea test). Como se muestra en la **Figura V.8**, las muestra de miel que no contienen STZ o están contaminados con el analito a concentraciones por debajo del LDV darán lugar a la aparición de dos líneas en el dispositivo (I) y en consecuencia el ensayo será considerado como negativo; mientras las muestras de miel que presentan concentraciones superiores de STZ serán positivas, apareciendo sólo una línea roja en la zona correspondiente a control (II).

Al depositar el extracto de la muestra (100  $\mu$ L) sobre la almohadilla, ésta se humedece actuando como prefiltro, avanzando por flujo lateral hasta alcanzar la zona donde está impreso el anticuerpo conjugado a oro, provocando su solubilización. En ese momento, la muestra donde se encuentra o no el analito de

interés (STZ), interacciona con los sitios de reconocimiento específico del anticuerpo primario marcado con el trazador, en nuestro caso NPs de oro.



**Figura V.8.** Fotografía representativa de los resultados obtenidos al aplicar el sistema LFIAT a extractos de miel. En el panel I, la imagen representa el resultado de un extracto de la muestra de miel enriquecido con  $5 \text{ ng g}^{-1}$  de sulfatiazol. En el panel II, la muestra analizada contenía  $15 \text{ ng g}^{-1}$  de sulfatiazol. S - pocillo de aplicación de la muestra; T - línea de ensayo (test); C - línea control.

La competición es de tipo secuencial, ya que en primer lugar el anticuerpo primario específico interacciona con el analito presente en el extracto, avanzando la solución hasta la zona de ensayo donde se encuentra inmovilizado el conjugado, pudiendo darse las siguientes situaciones (*Figura V.8*):

**Situación I:** Si el extracto añadido no contiene analito, o si la concentración de STZ es baja, los centros de unión –o gran parte de ellos– del anticuerpo primario quedan libres y al solubilizarse y fluir hasta la zona donde se encuentra el conjugado se uniría al mismo, dando como resultado la aparición de una banda –línea test–, migrando el exceso de anticuerpo primario específico marcado hacia la zona donde está inmovilizado el anticuerpo secundario (cabra anti conejo en nuestro caso, GAR), que se enaza al específico por la fracción constante, dando como resultado global dos bandas de color rojo, una debida al control y la otra debida a la zona de ensayo, siendo el ensayo negativo.

*Situación II:* Por el contrario, si la concentración de STZ en el extracto es elevada, los centros de reconocimiento del anticuerpo (molécula bifuncional), estarán bloqueados y cuando el frente pase por la zona en la que está inmovilizado el conjugado, éste no será reconocido y por tanto, no aparecerá banda en la zona de ensayo (test). Sin embargo el anticuerpo primario específico sigue fluyendo y reacciona con el anticuerpo secundario tal y como se describe en la Situación I, de modo que se visualiza una sólo banda en la zona correspondiente al control, siendo el resultado positivo.

La última etapa de este estudio se dirigió a establecer la sensibilidad y comprobar la validez del LFIA optimizado, aplicándolo a la determinación de STZ en muestras reales, o en su defecto, en muestras de miel a las que se les adicionó el analito (muestras reforzadas). Como método confirmatorio, los extractos se analizaron también utilizando el método de referencia.

Para tal fin se instruyó a cuatro voluntarios en el procedimiento de análisis de muestras de miel mediante tiras reactivas en flujo lateral. Una vez formados y tras comprobar que hacían el ensayo de forma correcta, a cada uno de ellos se les entregaron 10 tubos falcon (muestras ciegas de miel) marcados con las letras A a J, una bolsa de tubos falcon vacíos, 50 tiras, tampón acetato sódico 0,1 M a pH 5, mini-pipetas pasteur y una tabla para anotar los resultados obtenidos. En paralelo, las muestras de miel fueron analizadas por cromatografía (HPLC-MS, ver capítulo I). La **Tabla V.9** recoge los resultados del ensayo llevado a cabo por los voluntarios que sirvieron para establecer el VLD del dispositivo para STZ en miel, así como los valores obtenidos por la metodología de referencia.

Como se puede ver en la **Tabla V.9**, a partir de los datos proporcionados por los observadores entrenados (determinación visual), el ensayo dio un resultado positivo inequívoco a 15 ng g<sup>-1</sup> de STZ (12 positivos de 12 ensayos), mientras que a una concentración de STZ de 10 ng g<sup>-1</sup> se obtuvo un resultado que puede inducir a error, ya que 5 ensayos fueron interpretados como positivos por los observadores y 7 como negativos. Teniendo en cuenta los criterios operacionales descritos en la sección 5.4, el tratamiento estadístico aplicado a los resultados aportados por los observadores (**Tabla V.9**), sugiere que la sensibilidad, especificidad y eficiencia del LFIA mejoran considerando 15 ng g<sup>-1</sup> como límite de detección visual (VLD), tal y como se recoge en la **Tabla V.10**.

En base a los resultados obtenidos, el VLD del ensayo se encuentra en el intervalo de 10 a 15 ng g<sup>-1</sup>. Sin embargo, considerando como VLD 15 ng g<sup>-1</sup> el ensayo dará como positivas todas las muestras de miel que tienen una concentración de STZ por encima 15 ng g<sup>-1</sup>.

**Tabla V.9.** Resultados obtenidos aplicando la metodología desarrollada (LFIA) y la de referencia (HPLC-MS), en las muestras de miel enriquecidas con STZ.

| Muestra de miel | STZ añadido (ng g <sup>-1</sup> ) | Determinación visual (n positivo/n analizado) | STZ detectado por HPLC-MS (ng g <sup>-1</sup> ) |
|-----------------|-----------------------------------|---|---|
| A               | 0                                 | 0/12  | <LD   |
| B               | 1                                 | 0/12  | <LD   |
| C               | 5                                 | 0/12  | <LD   |
| D               | 10                                | 5/12  | 11,1±0,2  |
| E               | 15                                | 12/12   | 15,8±1,5  |
| F               | 20                                | 12/12   | 22,5±3,0  |
| G               | 50                                | 12/12   | 48,3±3,2  |
| H               | 100                               | 12/12   | 89,4±7,0  |
| I               | 200                               | 12/12   | 212,3±14,4                                      |
| J               | 500                               | 12/12   | 476,5±16,2                                      |

\*Cuatro observadores x tres réplicas de muestras de miel = 12 resultados

Como se aprecia en la **Tabla V.10**, del conjunto de datos proporcionados por los encuestados, si el VLD se fija en 10 ng g<sup>-1</sup>, se obtienen 77 resultados positivos (TP) y 36 negativos (TN) para STZ, si bien, falla en el criterio de validez que establece la Decisión de la Comisión 2002/657/EC para métodos de cribado, que establece que el porcentaje de falsos negativos en el VDL debe ser inferior al 5 %. En este caso (VLD = 10 ng g<sup>-1</sup>), los observadores aportaron 7 resultados

erróneos (FN), que corresponde al 5,8 % del total, no siendo válido en consecuencia el VDL establecido.

Si por el contrario el VLD se establece en 15 ng g<sup>-1</sup>, el total de resultados positivos en base a ese VLD es de 72, y sólo un 4% de los resultados difiere del valor esperado, cumpliendo por tanto los criterios establecidos para métodos de cribado.

**Tabla V.10.** Datos estadísticos de los resultados de la Tabla V.10.

| Parámetro         | VLD 10 ng/g | VLD 15 ng g <sup>-1</sup> |
|-------------------|-------------|---------------------------|
| TP                | 77          | 72                        |
| FN                | 7           | 0                         |
| TN                | 36          | 43                        |
| FP                | 0           | 5                         |
| Sensibilidad (%)  | 91,7        | 100                       |
| Especificidad (%) | 100         | 89                        |
| Eficiencia (%)    | 94,2        | 96                        |

Al comparar los resultados obtenidos por LFIA y HPLC-MS (**Tabla V.9**), se observa que el LFIA desarrollado es capaz de determinar correctamente la presencia de STZ en un 96 % de las muestras analizadas. Así, fijando como VLD para STZ en miel 15 ng g<sup>-1</sup>, la metodología desarrollada ofrece unas prestaciones adecuadas en cuanto a sensibilidad (100%) y eficiencia (96%), para la determinación de STZ en muestras de miel, proporcionando resultados en 10 minutos.

Las características del método en cuanto a sencillez y rapidez, permiten al apicultor llevar a cabo determinaciones de STZ en miel con muy buena sensibilidad, pudiendo utilizarlo como método de *screening in situ*, conociendo el estado sanitario de su miel en tiempo real.

Como se ha descrito previamente, la legislación no recoge LMR alguno para sulfonamidas en miel, pero si utilizamos el valor de referencia de 50 µg kg<sup>-1</sup> fijado

por la Guía de Laboratorios Europeos de referencia (CRL 2007), nuestro dispositivo representa un avance analítico para controlar el nivel de seguridad de la miel antes de entrar en la cadena alimentaria.

De la interpretación de las tabla de doble entrada construidas tanto para un VLD (*cut off*) de 10 ng g<sup>-1</sup> (Tabla V.11) ó 15 ng g<sup>-1</sup> (Tabla V.12), la diagonal de aciertos representada por la suma de TP y TN, y la de fallos correspondiente a la suma de FN y FP, es de 113 y 7 para el valor de 10 ng g<sup>-1</sup>, y de 115 y 5 para el valor de 15 ng g<sup>-1</sup>, respectivamente.

**Tabla V.11.** *Tabla de doble entrada para VLD 10 ng/g.*

|                |           | PREDICCIÓN |          |     |                 |
|----------------|-----------|------------|----------|-----|-----------------|
|                |           | POSITIVO   | NEGATIVO |     |                 |
| ESTADO<br>REAL | PRESENCIA | 77         | 7        | 84  | TOTAL PRESENCIA |
|                | AUSENCIA  | 0          | 36       | 36  | TOTAL AUSENCIA  |
|                |           | 77         | 43       | 120 | TOTAL           |

En consecuencia, la fiabilidad y prestaciones del ensayo mejoran seleccionado como cut off un valor de 15 ng g<sup>-1</sup>.

**Tabla V.12.** *Tabla de doble entrada para VLD 15 ng/g.*

|                |           | PREDICCIÓN |          |     |                 |
|----------------|-----------|------------|----------|-----|-----------------|
|                |           | POSITIVO   | NEGATIVO |     |                 |
| ESTADO<br>REAL | PRESENCIA | 72         | 0        | 72  | TOTAL PRESENCIA |
|                | AUSENCIA  | 5          | 43       | 48  | TOTAL AUSENCIA  |
|                |           | 79         | 41       | 120 | TOTAL           |

Finalmente, para demostrar que el dispositivo desarrollado cumple con los criterios relativos a las características de funcionamiento para las que se ha diseñado, se procedió a evaluar la capacidad analítica de la metodología desarrollada, siguiendo los criterios de la Decisión Europea 2002/657/EC, que introduce el concepto de capacidad de detección ( $CC\beta$ ) para métodos cualitativos o de *screening*, sustituyendo al parámetro límite de detección propio de los métodos cuantitativos.

Para calcular el  $CC\beta$  se enriquecieron 25 muestras de miel (libres de STZ) al nivel del VLD fijado previamente ( $15 \text{ ng g}^{-1}$ ), con un patrón de STZ y se analizaron visualmente por triplicado. El error  $\beta$  del ensayo fue cero dado que no se obtuvo ningún falso negativo, estableciendo un VDL de  $15 \text{ ng g}^{-1}$  de STZ en miel para el LFIA. Estos resultados satisfacen los criterios fijados por la Decisión de la Comisión 2002/657/EC, en la que se establece que para el cribado de muestras se podrán utilizar técnicas analíticas en las que el porcentaje de falsos conformes sea  $<5 \%$  al nivel de interés, que en nuestro caso fue del 0.

Para comprobar la reproducibilidad, estabilidad y robustez de la metodología desarrollada, se repitieron los ensayos utilizando cuatro observadores formados previamente en el manejo de LFIA, obteniendo los mismos resultados sobre las 25 muestras de miel enriquecidas con STZ al VLD. Además se montaron 200 tiras que se introdujeron individualmente en bolsas de aluminio con desecante y se sellaron para su conservación. Quincenalmente se abrían tres bolsas y se testaban por cuatro sujetos distintos utilizando la misma muestra, comprobando así la uniformidad y reproducibilidad en los resultados. Esto se hizo a lo largo de un año, comprobando que las características de diseño y prestaciones se mantenían intactas.

En los estudios de especificidad, desarrollados según lo descrito en la sección 5.5, se evaluó el grado de reconocimiento del suero OVA-S2 frente a compuestos relacionados estructuralmente con el STZ.

Los resultados obtenidos (**Tabla V.13**) indican que en las condiciones de ensayo, el anticuerpo específico inmovilizado en la membrana sólo reconoce a sulfatiazol, apareciendo una pequeña interferencia para SMP ( $\geq 500 \text{ ng g}^{-1}$ ) y SPD ( $\geq 200 \text{ ng g}^{-1}$ ), a las concentraciones más elevadas. Estos resultados demuestran la especificidad del ensayo desarrollado, similar a la obtenida mediante el ELISA

que utiliza el mismo anticuerpo (*ver sección 4.8.2.1.*), y a los descritos por Pastor-Navarro y *col.*, utilizando los mismos inmunorreactivos (Pastor-Navarro, García-Bover, Maquieira y Puchades, 2004)

**Tabla V.13.** Grado de reconocimiento del LFIA desarrollado frente a diferentes sulfonamidas.

| Interferente<br>ng g <sup>-1</sup> | SDZ | SDM | SMZ | SMT | SMX | SMP | SPD | SSX | Mezcla de<br>sulfonamidas | STZ |
|------------------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|---------------------------|-----|
| 0                                  | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -                         | -   |
| 1                                  | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -                         | -   |
| 5                                  | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -                         | -   |
| 10                                 | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -                         | -   |
| 15                                 | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -                         | +   |
| 20                                 | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -                         | +   |
| 50                                 | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -                         | +   |
| 100                                | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -                         | +   |
| 200                                | -   | -   | -   | -   | -   | -   | +   | -   | -                         | +   |
| 500                                | -   | -   | -   | -   | -   | +   | +   | -   | +                         | +   |

En la bibliografía consultada no se ha encontrado ningún método analítico de características semejantes al desarrollado en esta memoria para la detección de residuos de STZ en miel. Cuando comparamos con estrategias de análisis convencionales que utilizan como principio analítico la reacción inmunoquímica, la tecnología LFIA utilizando NPs de oro como marcador y detección visual pueata a punto, ofrece la ventaja de tener resultados de forma rápida y sencilla, interpretables visualmente sin necesidad de equipamiento adicional, sensibles y específicos, lo que los convierte en métodos ideales para ser usados por los apicultores tanto a pie de colmena como por las envasadoras de miel.

La portabilidad, simplicidad de manejo y fácil interpretación de los resultados, permitirá a los usuarios detectar STZ en muestras de miel en tiempo real y en el sitio donde pueda presentarse el problema, pudiendo tomar acciones correctoras con agilidad.

También ayudará al envasador de miel a tomar decisiones comerciales estratégicas –aceptación o rechazo de partidas de miel nacionales o a importar de otros países–, asegurando la inocuidad del producto a adquirir.

En definitiva, el desarrollo de nuevos métodos analíticos especialmente rápidos (como el propuesto), para el control de sustancias tóxicas en alimentos, que respalden el cumplimiento de la legislación vigente, conllevará a la consecución de alimentos saludables, seguros y de alta calidad, con objeto de satisfacer las necesidades del consumidor y potenciar la competitividad de la industria alimentaria española. Además, aumentará el grado de confianza de los consumidores hacia los productos comercializados puesto que éstos habrán sido objeto de un control exhaustivo a lo largo de todo el proceso productivo (trazabilidad), garantizando de este modo la inocuidad de la miel.

Una simple búsqueda usando como descriptores “*drug residues honey*” en la base de datos de PubMed, acotada a los 10 últimos años, ofrece 128 resultados. Entre los resultados obtenidos encontramos diferentes estudios focalizados en la búsqueda de un solo analito o bien evaluando diferentes familias de antibióticos en una sola determinación (Vidal, Aguilera-Luiz, Romero-González y Frenich, 2009; Popa, Schiriac, y Cuciureanu, 2012; Šerniene, Stimbirys y Daunoras, 2013; Dubreil-Chéneau, Pirotais, Verdon, y Hurtaud-Pessel, 2014; A. Kaufmann, Butcher, Maden, Walker, y Widmer, 2015), aplicando protocolos de tratamiento de muestra más o menos complejos (J. Wang y Leung, 2012; Mackie, Marley y Donnelly, 2013; Sajid et al., 2013; Farajzadeh, Mogaddam y Ghorbanpour, 2014; Azzouz y Ballesteros, 2015; Mousavi, Arefhosseini, Nabili, Mahmoudpour, y Nemati, 2016; Shendy, Al-Ghobashy, Gad Alla, y Lotfy, 2016), y diferentes métodos de detección (Z. Wang, Zhang, Ding, Eremin, y Shen, 2008; Kanda y col., 2010; V. Gaudin, Rault y Verdon, 2012; Lucas-Abellán y col., 2014; Venable, Haynes, y Cook, 2014).

Sin embargo, la mayoría de ellos requieren laboriosos procedimientos de preparación de muestra, equipos caros y de complejo manejo que entorpecen la presentación de resultados, no siendo adecuados para poder ser aplicados *in situ*.

En el mercado encontramos diferentes ensayos rápidos para la determinación de sustancias con actividad farmacológica aplicables a la mayoría de las matrices alimentarias, incluida la miel.

Por ejemplo, el kit SuLFIASensor (KIT033, Unisensor diagnostic engineering) en formato dipstick para detectar la presencia de sulfonamidas en muestras de miel permite realizar el ensayo en 30 minutos, y ofrece una sensibilidad de  $25 \mu\text{g kg}^{-1}$ . Otro kit comercial es el ofrecido por R-biopharm (Ridascreen® Sulfonamide), que es un inmunoensayo competitivo en formato ELISA aplicable a diecinueve sulfonamidas en varias matrices, variando el límite de detección en función de la matriz: huevo ( $1,5 \mu\text{g kg}^{-1}$ ), pescado ( $2 \mu\text{g kg}^{-1}$ ), carne de pollo ( $1,5 \mu\text{g kg}^{-1}$ ), carne de cerdo ( $2 \mu\text{g kg}^{-1}$ ), camarones ( $2 \mu\text{g kg}^{-1}$ ), miel ( $2 \mu\text{g kg}^{-1}$ ) y leche ( $3,5 \mu\text{g kg}^{-1}$ ). Para su aplicación a muestras de miel requiere una extracción previa empleando cartuchos en fase sólida ( $C_{18}$ ), alargando así el tiempo de presentación de resultados.

Otras opciones analíticas son los ensayos ofrecidos por Biacore AB (Qflex® Kit sulfonamidas) y Cham Sciences Inc. (Charm II test). Ambos ensayos requieren instrumental adicional al empleado en placa ELISA, incluso detectores específicos. Así, el Qflex® Kit detecta la presencia de 20 sulfonamidas, con un amplio rango de sensibilidad ( $8,5$  a  $101,7 \mu\text{g kg}^{-1}$ ), utilizando la tecnología de resonancia de plasmón de superficie. El ensayo Charm II se puede utilizar para detectar tetraciclinas, sulfonamidas, macrólidos,  $\beta$ -lactámicos, amphenicol y aminoglucósidos en una amplia variedad de matrices como huevos, leche y miel. Como resultado se obtiene un valor global para la familia de antibióticos evaluados (valor índice) en la matriz analizada, no dando un resultado individual.

El reciente desarrollo de nuevos métodos de análisis va íntimamente ligado al avance alcanzado en diferentes disciplinas científicas como la inmunología, química, informática, electrónica e ingeniería y a la formación de equipos de investigación multidisciplinarios. Como resultados se han conseguido ensayos más sensibles modificando el marcador empleado, por ejemplo, incorporado marcadores quimioluminiscentes (CIA), que requieren un substrato luminiscente que reemplaza al cromógeno utilizado habitualmente en el formato ELISA, una aproximación ampliamente utilizada en química clínica y aplicada recientemente al sector agroalimentario (Zhao, Sun, y Chu, 2009).

Con el propósito de solventar una de las limitaciones atribuidas al inmunoensayo (ensayos unianalito), en la última década se han desarrollado métodos de análisis multiparamétricos para residuos de antimicrobianos en miel.

Así, Wutz *y col.*, (2011), desarrollaron un microarray capaz de detectar simultáneamente enrofloxacin (4,2  $\mu\text{g kg}^{-1}$ ), estreptomicina (15,9  $\mu\text{g kg}^{-1}$ ), sulfametazina (81,5  $\mu\text{g kg}^{-1}$ ) y sulfadiazina (192,6  $\mu\text{g kg}^{-1}$ ) en muestras de miel, simplemente diluyendo la muestra en PBS a pH 7,6.

Posteriormente, Popa *y col.*, (2012) pusieron a punto otro microarray con el mismo fundamento, pero esta vez para detectar simultáneamente quinolonas, cefalosporinas, tianfenicol, estreptimicina, tylosina y tetraciclinas, en el intervalo de concentración de 1 a 9  $\mu\text{g kg}^{-1}$ , con resultados comparables a los obtenidos por el método cromatográfico de referencia.

Basados también en técnicas inmunoquímicas, y con el objetivo de dar respuesta a la necesidad creciente de disponer de métodos analíticos multianalito, transportables, de fácil manejo y tratamiento de muestra sencillo, que puedan ser aplicados como métodos *screening*, se están desarrollando otras metodologías. Encontramos varias aplicaciones desarrolladas centradas en miel, que utilizan biosensores. En 2010, Jornet *y col.*, desarrollaron un inmunosensor no específico para determinar sulfatiazol en muestras de agua y miel, ya que mostró reactividad cruzada frente a sulfametoxipiridazina, sulfametizol y sulfapiridina, con un rango de trabajo de 0, a 24  $\mu\text{g kg}^{-1}$ . Muriano *y col.*, (2013) desarrollaron un inmunodetector electroquímico que emplea nanopartículas magnéticas, capaz de detectar hasta 10 sulfonamidas a concentraciones por debajo de las recomendadas en algunos países de la Unión Europea (25  $\mu\text{g kg}^{-1}$ ), pudiendo ser utilizado como método de *screening*. El tratamiento de la muestra incluye una hidrólisis ácida, sin necesidad de más tratamientos de limpieza.

También se han desarrollado microinmunoensayos multiplexados, capaces de detectar varias analitos de distintos grupos en una misma muestra. Siguiendo esta estrategia, en bibliografía está recogida la validación de un biochip multiarray (Evidence Investigator®), aplicable a muestras de miel, capaz de detectar seis familias de antibióticos, aunque no incluye sulfonamidas (Valérie Gaudin, Hedou, Soumet, y Verdon, 2014).

## 5.6. CONCLUSIONES

1. La conjugación a NPs de oro coloidal de un suero específico para STZ, y su inmovilización posterior sobre una membrana de nitrocelulosa, ha permitido desarrollar un inmunoensayo en flujo lateral capaz de detectar  $15 \text{ ng g}^{-1}$  de STZ en muestras de miel.
2. La metodología desarrollada ofrece unas prestaciones adecuadas en cuanto a sensibilidad (100%) y eficiencia (96%), para la determinación de STZ en muestras de miel, proporcionando resultados en 10 minutos.
3. Los resultados de validación del sistema analítico realizado por observadores entrenados en muestras de miel enriquecidas, demuestran que la metodología permite detectar STZ en muestras de miel de forma visual e inequívoca, a un nivel de concentración inferior al umbral recomendado ( $50 \text{ ng g}^{-1}$ ). Además, dichos resultados concuerdan con los obtenidos por cromatografía.
4. El ensayo es específico para sulfatiazol, ya que sólo se detecta una pequeña interferencia para SMP y SPD a concentraciones elevadas, superiores a  $200 \text{ ng g}^{-1}$ .
5. La sensibilidad alcanzada en formato de inmunoensayo en flujo lateral fue inferior a la obtenida en placa ELISA. Sin embargo, su rapidez de respuesta, facilidad de manejo y eficacia, aconsejan su uso como método *screening*.

## 5.7. BIBLIOGRAFÍA

- Adrian, J., Font, H., Diserens, J.-M., Sánchez-Baeza, F., Marco, M.-P. (2009). Generation of Broad Specificity Antibodies for Sulfonamide Antibiotics and Development of an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) for the Analysis of Milk Samples. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(2), 385-394.
- Ahmed, S., Annu, Ikram, S., Yudha S., S. (2016). Biosynthesis of gold nanoparticles: A green approach. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 161, 141-153.
- Anfossi, L., D'Arco, G., Calderara, M., Baggiani, C., Giovannoli, C., Giraudi, G. (2011). Development of a quantitative lateral flow immunoassay for the detection of aflatoxins in maize. *Food Additives and Contaminants. Part A, Chemistry, Analysis, Control, Exposure and Risk Assessment*, 28(2), 226-234.
- Azzouz, A., Ballesteros, E. (2015). Multiresidue method for the determination of pharmacologically active substances in egg and honey using a continuous solid-phase extraction system and gas chromatography-mass spectrometry. *Food Chemistry*, 178, 63-69.
- Babacar Ngom, Yancheng Guo, Xiliang Wang, Dingren Bi. (2010). Development and application of lateral flow test strip technology for detection of infectious agents and chemical contaminants: a review. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 397(3), 1113-1135.
- Bangs Laboratories, Inc. (2013). Lateral Flow Tests. TechNote 303.
- Berlina, A. N., Zherdev, A. V., Dzantiev, B. B., Sakharov, I. I. (2007). Use of soybean peroxidase for the enzyme immunoassay of sulfamethoxypyridazine in milk. *Prikladnaia Biokhimiia I Mikrobiologiia*, 43(5), 614-620.
- Brown, T. L., Jr, H. E. L., Bursten, B. E., Burdge, J. R. (2004). Química. Pearson Educación.
- Burda, C., Chen, X., Narayanan, R., El-Sayed, M. A. (2005). Chemistry and Properties of Nanocrystals of Different Shapes. *Chemical Reviews*, 105(4), 1025-1102.
- Carlberg, D. (2005). Lateral-Flow Assays. En R. C. W. M. MBA and H. Y. T. MBA

- (Eds.), *Drugs of Abuse* (pp. 99-114).
- Chandler J., Gurmin T., Robinson N. (2000). The Place of Gold in Rapid Tests. *IVD Technology*, 6, 37-49.
- Chen, R., Li, H., Zhang, H., Zhang, S., Shi, W., Shen, J., Wang, Z. (2013). Development of a lateral flow fluorescent microsphere immunoassay for the determination of suLFIAmethazine in milk. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 405(21), 6783-6789.
- Christopher, P., Robinson, N., Shaw, M. K. (2005). Antibody-Label Conjugates in Lateral-Flow Assays. En R. C. W. M. MBA and H. Y. T. MBA (Eds.), *Drugs of Abuse* (pp. 87-98).
- Chun, P. (2009). Colloidal Gold and Other Labels for Lateral Flow Immunoassays. En R. Wong and H. Tse (Eds.), *Lateral Flow Immunoassay* (pp. 1-19).
- Hayat, M. A. (2012). *Colloidal Gold: Principles, Methods, and Applications*. Elsevier.
- Companyó, R., Granados, M., Guiteras, J., Prat, M. D. (2009). Antibiotics in food: legislation and validation of analytical methodologies. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 395(4), 877-891.
- CRL Guidance Paper. (2007). CRLs view on state of the art analytical methods for national residue control plans.
- Cushing, B. L., Kolesnichenko, V. L., O'Connor, C. J. (2004). Recent Advances in the Liquid-Phase Syntheses of Inorganic Nanoparticles. *Chemical Reviews*, 104(9), 3893-3946.
- Cvak, B., Pum, D., Molinelli, A., Krska, R. (2012). Synthesis and characterization of colloidal gold particles as labels for antibodies as used in lateral flow devices. *Analyst*, 137(8), 1882-1887.
- Daniel, M.-C., Astruc, D. (2004). Gold nanoparticles: assembly, supramolecular chemistry, quantum-size-related properties, and applications toward biology, catalysis, and nanotechnology. *Chemical Reviews*, 104(1), 293-346.
- de la Escosura-Muñiz, A., Parolo, C., Merkoçi, A. (2010). Immunosensing using nanoparticles. *Materials Today*, 13(7-8), 24-34.
- Deshpande, S. S. (2012). *Enzyme Immunoassays: From Concept to Product Development*. Springer Science and Business Media.
- Dubreil-Chéneau, E., Pirotais, Y., Verdon, E., Hurtaud-Pessel, D. (2014).

- Confirmation of 13 sulfonamides in honey by liquid chromatography-tandem mass spectrometry for monitoring plans: validation according to European Union Decision 2002/657/EC. *Journal of Chromatography A*, 1339, 128-136.
- European Commission. (2002). Commission Decision of 12 August 2002, implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results. *Official Journal of the European Communities*, L 221 de 17/08/2002, p. 8-29.
- Farajzadeh, M. A., Mogaddam, M. R. A., Ghorbanpour, H. (2014). Development of a new microextraction method based on elevated temperature dispersive liquid-liquid microextraction for determination of triazole pesticides residues in honey by gas chromatography-nitrogen phosphorus detection. *Journal of Chromatography A*, 1347, 8-16.
- Font, H., Adrian, J., Galve, R., Estévez, M.-C., Castellari, M., Gratacós-Cubarsí, M., ... Marco, M.-P. (2008). Immunochemical assays for direct sulfonamide antibiotic detection in milk and hair samples using antibody derivatized magnetic nanoparticles. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(3), 736-743.
- Franek, M., Diblikova, I., Cernoch, I., Vass, M., Hruska, K. (2006). Broad-specificity immunoassays for sulfonamide detection: immunochemical strategy for generic antibodies and competitors. *Analytical Chemistry*, 78(5), 1559-1567.
- Frens, G. (1973). Controlled Nucleation for the Regulation of the Particle Size in Monodisperse Gold Suspensions. *Nature*, 241(105), 20-22.
- Gaudin, V., Hedou, C., Soumet, C., Verdon, E. (2014). Evaluation and validation of biochip multi-array technology for the screening of six families of antibiotics in honey according to the European guideline for the validation of screening methods for residues of veterinary medicines. *Food Additives and Contaminants. Part A, Chemistry, Analysis, Control, Exposure and Risk Assessment*, 31(10), 1699-1711.
- Gaudin, V., Rault, A., Verdon, E. (2012). Validation of a commercial receptor kit SuLFIA sensor Honey for the screening of sulfonamides in honey according to Commission Decision 2002/657/EC. *Food Additives and Contaminants. Part*

- A, Chemistry, Analysis, Control, Exposure and Risk Assessment*, 29(6), 942-950.
- Goryacheva, I. Y., Lenain, P., De Saeger, S. (2013). Nanosized labels for rapid immunotests. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 46, 30-43.
- Guillén, I., Gabaldón, J. A., Núñez-Delicado, E., Puchades, R., Maquieira, A., Morais, S. (2011). Detection of sulphathiazole in honey samples using a lateral flow immunoassay. *Food Chemistry*, 129(2), 624-629.
- Guo, Y., Ngom, B., Le, T., Jin, X., Wang, L., Shi, D., ... Bi, D. (2010). Utilizing Three Monoclonal Antibodies in the Development of an Immunochromatographic Assay for Simultaneous Detection of SuLFIAmethazine, SuLFIA diazine, and SuLFIAquinoxaline Residues in Egg and Chicken Muscle. *Analytical Chemistry*, 82(18), 7550-7555.
- Heering, W., Usleber, E., Dietrich, R., Märtilbauer, E. (1998). Immunochemical screening for antimicrobial drug residues in commercial honey. *The Analyst*, 123(12), 2759-2762.
- Henderson, K., Stewart, J. (2002). Factors influencing the measurement of oestrone sulphate by dipstick particle capture immunoassay. *Journal of Immunological Methods*, 270(1), 77-84.
- Hermanson, G. T. (1996). Chapter 14 - Preparation of Colloidal-Gold-Labeled Proteins. En *Bioconjugate Techniques (First edition)* (pp. 593-604). Academic Press, San Diego.
- Hermanson, G. T. (2013). Chapter 14 - Microparticles and Nanoparticles. En *Bioconjugate Techniques (Third edition)* (pp. 549-587). Academic Press, San Diego.
- Horisberger, M., Vauthey, M. (1984). Labelling of colloidal gold with protein. *Histochemistry*, 80(1), 13-18.
- Jana, N. R., Gearheart, L., Murphy, C. J. (2001). Seeding Growth for Size Control of 5-40 nm Diameter Gold Nanoparticles. *Langmuir*, 17(22), 6782-6786.
- Jazayeri, M. H., Amani, H., Pourfatollah, A. A., Pazoki-Toroudi, H., Sedighimoghaddam, B. (2016). Various methods of gold nanoparticles (GNPs) conjugation to antibodies. *Sensing and Bio-Sensing Research*, 9, 17-22.
- Jin, S., Chang, Z. Y., Ming, X., Min, C. L., Wei, H., Sheng, L. Y., Hong, G. X. (2005). Fast dipstick dye immunoassay for detection of immunoglobulin G (IgG)

- and IgM antibodies of human toxoplasmosis. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 12(1), 198-201.
- Jonas Ljungblad. (2009). *Antibody-Conjugated Gold Nanoparticles integrated in a Fluorescence based Biochip* (Final Thesis). Linköpings Universitet, Sweden.
- Jornet, D., González-Martínez, M. A., Puchades, R., Maquieira, A. (2010). Antibiotic immunosensing: determination of sulfliazole in water and honey. *Talanta*, 81(4-5), 1585-1592.
- Kanda, M., Kusano, T., Kanai, S., Hayashi, H., Matushima, Y., Nakajima, T., ... Nagayma, T. (2010). Rapid determination of fluoroquinolone residues in honey by a microbiological screening method and liquid chromatography. *Journal of AOAC International*, 93(4), 1331-1339.
- Kaufmann, A., Butcher, P., Maden, K., Walker, S., Widmer, M. (2015). Determination of nitrofurans and chloramphenicol residues by high resolution mass spectrometry versus tandem quadrupole mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, 862, 41-52.
- Kaufmann, A., Roth, S., Ryser, B., Widmer, M., Guggisberg, D. (2002). Quantitative LC/MS-MS Determination of Sulfonamides and Some Other Antibiotics in Honey. *Journal of AOAC International*, 85(4), 853-860.
- Laitinen, M. P., Vuento, M. (1996). Affinity immunosensor for milk progesterone: identification of critical parameters. *Biosensors and Bioelectronics*, 11(12), 1207-1214.
- Lee, N., Holtzapple, C. K., Muldoon, M. T., Deshpande, S. S., Stanker, L. H. (2001). Immunochemical Approaches to the Detection of Sulfliazole in Animal Tissues. *Food and Agricultural Immunology*, 13(1), 5-17.
- Leung, W., Chan, P., Bosgoed, F., Lehmann, K., Renneberg, I., Lehmann, M., Renneberg, R. (2003). One-step quantitative cortisol dipstick with proportional reading. *Journal of Immunological Methods*, 281(1-2), 109-118.
- Li, X., Zhang, G., Liu, Q., Feng, C., Wang, X., Yang, Y., ... Chen, H. (2009). Development of immunoassays for the detection of sulfliazole in swine urine. *Food Additives and Contaminants. Part A, Chemistry, Analysis, Control, Exposure and Risk Assessment*, 26(3), 314-325.
- Liu, N., Han, Z., Lu, L., Wang, L., Ni, G., Zhao, Z., ... Zheng, X. (2013).

- Development of a new rabbit monoclonal antibody and its based competitive indirect enzyme-linked immunosorbent assay for rapid detection of sulfonamides. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 93(3), 667-673.
- Liu, N., Nie, D., Han, Z., Yang, X., Zhao, Z., Shen, J., ... Zheng, X. (2013). Rabbit Monoclonal Antibody-Based Lateral Flow Immunoassay Platform for Sensitive Quantitation of Four Sulfonamide Residues in Milk and Swine Urine. *Analytical Letters*, 46(2), 286-298.
- Lucas-Abellán, C., Guillén, I., Mercader-Ros, M. T., Serrano-Martínez, A., Núñez-Delicado, E., Gabaldón, J. A. (2014). Fluorimetric determination of sulphathiazole in honey by means the formation of CDs inclusion complexes. *Carbohydrate Polymers*, 103, 87-93.
- Luttmann, W., Bratke, K., Kupper, M., Myrtek, D. (2006). *Immunology*. Academic Press.
- Mackie, J., Marley, E., Donnelly, C. (2013). Immunoaffinity column cleanup with LC/MS/MS for the determination of chloramphenicol in honey and prawns: single-laboratory validation. *Journal of AOAC International*, 96(4), 910-916.
- Mallick, K., Wang, Z. L., Pal, T. (2001). Seed-mediated successive growth of gold particles accomplished by UV irradiation: a photochemical approach for size-controlled synthesis. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 140(1), 75-80.
- Mansfield, M. A. (2005). The Use of Nitrocellulose Membranes in Lateral-Flow Assays. En R. C. W. M. MBA and H. Y. T. MBA (Eds.), *Drugs of Abuse* (pp. 71-85). Humana Press.
- Mousavi, M. M., Arefhosseini, S., Nabili, A. A. A., Mahmoudpour, M., Nemati, M. (2016). Development of an ultrasound-assisted emulsification microextraction method for the determination of chlorpyrifos and organochlorine pesticide residues in honey samples using gas chromatography with mass spectrometry. *Journal of Separation Science*.
- Muriano, A., Pinacho, D.-G., Chabottaux, V., Diserens, J.-M., Granier, B., Stead, S., ... Marco, M.-P. (2013). A portable electrochemical magnetoimmunosensor for detection of sulfonamide antimicrobials in honey. *Analytical and*

- Bioanalytical Chemistry*, 405(24), 7885-7895.
- Ngom, B., Guo, Y., Jin, X., Shi, D., Zeng, Y., Le, T., ... Bi, D. (2011). Monoclonal antibody against suLFIAquinoxaline and quantitative analysis in chicken tissues by competitive indirect ELISA and lateral flow immunoassay. *Food and Agricultural Immunology*, 22(1), 1-16.
- Nguyen, D. T., Kim, D.-J., So, M. G., Kim, K.-S. (2010). Experimental measurements of gold nanoparticle nucleation and growth by citrate reduction of H<sub>2</sub>AuCl<sub>4</sub>. *Advanced Powder Technology*, 21(2), 111-118.
- O'Farrell, B. (2013). Chapter 2.4 - Lateral Flow Immunoassay Systems: Evolution from the Current State of the Art to the Next Generation of Highly Sensitive, Quantitative Rapid Assays. *The Immunoassay Handbook* (Fourth Edition) (pp. 89-107). Oxford: Elsevier.
- O'Keeffe, M., Crabbe, P., Salden, M., Wichers, J., Van Peteghem, C., Kohen, F., ... Moneti, G. (2003). Preliminary evaluation of a lateral flow immunoassay device for screening urine samples for the presence of sulphamethazine. *Journal of Immunological Methods*, 278(1-2), 117-126.
- Oliver, C. (1999). Preparation of Colloidal Gold. En L. Javois (Ed.), *Immunocytochemical Methods and Protocols* (pp. 327-330). Humana Press.
- Pastor-Navarro, N., Gallego-Iglesias, E., Maquieira, Á., Puchades, R. (2007). Development of a group-specific immunoassay for sulfonamides: Application to bee honey analysis. *Talanta*, 71(2), 923-933.
- Pastor-Navarro, N., García-Bover, C., Maquieira, A., Puchades, R. (2004). Specific polyclonal-based immunoassays for sulfathiazole. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 379(7-8), 1088-1099.
- Popa, I. D., Schiriac, E. C., Cuciureanu, R. (2012). Multi-analytic detection of antibiotic residues in honey using a multiplexing biochip assay. *Revista Medico-Chirurgicala a Societatei De Medici Si Naturalisti Din Iasi*, 116(1), 324-329.
- Posthuma-Trumpie, G. A., Korf, J., Amerongen, A. van. (2008). Lateral flow (immuno)assay: its strengths, weaknesses, opportunities and threats. A literature survey. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 393(2), 569-582.
- Sajid, M., Kawde, A.-N., Daud, M. (2015). Designs, formats and applications of

- lateral flow assay: A literature review. *Journal of Saudi Chemical Society*, 19(6), 689-705.
- Sajid, M., Na, N., Safdar, M., Lu, X., Ma, L., He, L., Ouyang, J. (2013). Rapid trace level determination of sulfonamide residues in honey with online extraction using short C-18 column by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *Journal of Chromatography A*, 1314, 173-179.
- Serniene, L., Stimbirys, A., Daunoras, G. (2013). Trends in monitoring residues of pharmacologically active group B substances in products of animal origin in Lithuania from 1999 to 2008. *Food Additives and Contaminants. Part B, Surveillance*, 6(3), 187-195.
- Seydack, M. (2005). Nanoparticle labels in immunosensing using optical detection methods. *Biosensors and Bioelectronics*, 20(12), 2454-2469.
- Shendy, A. H., Al-Ghobashy, M. A., Gad Alla, S. A., Lotfy, H. M. (2016). Development and validation of a modified QuEChERS protocol coupled to LC-MS/MS for simultaneous determination of multi-class antibiotic residues in honey. *Food Chemistry*, 190, 982-989.
- Sheth, H. B., Sporns, P. (1990). Enzyme immunoassay for screening of sulflathiazole in honey. *Journal - Association of Official Analytical Chemists*, 73(6), 871-874.
- Shi, C., Zhao, S., Zhang, K., Hong, G., Zhu, Z. (2008). Preparation of colloidal gold immunochromatography strip for detection of methamidophos residue. *Journal of Environmental Sciences (China)*, 20(11), 1392-1397.
- Shim, W.-B., Yang, Z.-Y., Kim, J.-Y., Choi, J.-G., Je, J.-H., Kang, S.-J., ... Chung, D.-H. (2006). Immunochromatography using colloidal gold-antibody probe for the detection of atrazine in water samples. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(26), 9728-9734.
- Stolker, A. a. M., Brinkman, U. A. T. (2005). Analytical strategies for residue analysis of veterinary drugs and growth-promoting agents in food-producing animals--a review. *Journal of Chromatography A*, 1067(1-2), 15-53.
- Thomson, C. A., Sporns, P. (1995). Direct ELISAs for Sulflathiazole in Milk and Honey with Special Emphasis on Enzyme Conjugate Preparation. *Journal of Food Science*, 60(2), 409-415.
- Turkevich, J. (1985). Colloidal gold. Part I. *Gold Bulletin*, 18(3), 86-91.

- Tweney, R. D. (2006). Discovering Discovery: How Faraday Found the First Metallic Colloid. *Perspectives on Science*, 14(1), 97-121.
- van Dam, G. J., Wichers, J. H., Ferreira, T. M. F., Ghati, D., van Amerongen, A., Deelder, A. M. (2004). Diagnosis of schistosomiasis by reagent strip test for detection of circulating cathodic antigen. *Journal of Clinical Microbiology*, 42(12), 5458-5461.
- Venable, R., Haynes, C., Cook, J. M. (2014). Reported prevalence and quantitative LC-MS methods for the analysis of veterinary drug residues in honey: a review. *Food Additives and Contaminants. Part A, Chemistry, Analysis, Control, Exposure and Risk Assessment*, 31(4), 621-640.
- Vidal, J. L. M., Aguilera-Luiz, M. D. M., Romero-González, R., Frenich, A. G. (2009). Multiclass analysis of antibiotic residues in honey by ultraperformance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(5), 1760-1767.
- Wang, J., Leung, D. (2012). The challenges of developing a generic extraction procedure to analyze multi-class veterinary drug residues in milk and honey using ultra-high pressure liquid chromatography quadrupole time-of-flight mass spectrometry. *Drug Testing and Analysis*, 4 Suppl 1, 103-111.
- Wang, L., Wang, S., Zhang, J., Liu, J., Zhang, Y. (2008). Enzyme-linked immunosorbent assay and colloidal gold immunoassay for sulphamethazine residues in edible animal foods: investigation of the effects of the analytical conditions and the sample matrix on assay performance. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 390(6), 1619-1627.
- Wang, X., Li, K., Shi, D., Xiong, N., Jin, X., Yi, J., Bi, D. (2007). Development of an immunochromatographic lateral-flow test strip for rapid detection of sulfonamides in eggs and chicken muscles. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(6), 2072-2078.
- Wang, Z., Zhang, S., Ding, S., Eremin, S. A., Shen, J. (2008). Simultaneous determination of sulphamerazine, sulphamethazine and sulphadiazine in honey and chicken muscle by a new monoclonal antibody-based fluorescence polarisation immunoassay. *Food Additives and Contaminants. Part A, Chemistry, Analysis, Control, Exposure and Risk Assessment*, 25(5), 574-582.

- Wong, R., Tse, H. (2008). *Lateral Flow Immunoassay*. Springer Science and Business Media.
- Wutz, K., Niessner, R., Seidel, M. (2011). Simultaneous determination of four different antibiotic residues in honey by chemiluminescence multianalyte chip immunoassays. *Microchimica Acta*, 173(1-2), 1-9.
- Xia, H., Xiahou, Y., Zhang, P., Ding, W., Wang, D. (2016). Revitalizing the Frens Method To Synthesize Uniform, Quasi-Spherical Gold Nanoparticles with Deliberately Regulated Sizes from 2 to 330 nm. *Langmuir*, 32(23), 5870-5880.
- Yang, T., Ren, X., Li, Y., Chen, F. (2010). Development of a sensitive monoclonal antibody-based ELISA for the detection of sulFIAmethazine in cow milk, honey, and swine urine. *Hybridoma*, 29(5), 403-407.
- Yang, Z.-Y., Shim, W.-B., Kim, M.-G., Lee, K.-H., Kim, K.-S., Kim, K.-Y., ... Chung, D.-H. (2007). Production and characterization of monoclonal and recombinant antibodies against antimicrobial sulfamethazine. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 17(4), 571-578.
- Yokota, S. (2010). Preparation of Colloidal Gold Particles and Conjugation to Protein A, IgG, F(ab')<sub>2</sub>, and Streptavidin. En S. D. Schwartzbach and T. Osafune (Eds.), *Immunolectron Microscopy* (pp. 109-119). Humana Press.
- Zhang, G., Wang, X., Zhi, A., Bao, Y., Yang, Y., Qu, M., ... Liu, Q. (2008). Development of a lateral flow immunoassay strip for screening of sulFIAmomethoxine residues. *Food Additives and Contaminants. Part A, Chemistry, Analysis, Control, Exposure and Risk Assessment*, 25(4), 413-423.
- Zhang, H., Duan, Z., Wang, L., Zhang, Y., Wang, S. (2006). Hapten synthesis and development of polyclonal antibody-based multi-sulfonamide immunoassays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(13), 4499-4505.
- Zhang, H., Wang, L., Zhang, Y., Fang, G., Zheng, W., Wang, S. (2007). Development of an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Seven Sulfonamide Residues and Investigation of Matrix Effects from Different Food Samples. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(6), 2079-2084.
- Zhang, H., Zhang, Y., Wang, S. (2008). Development of flow-through and dip-stick immunoassays for screening of sulfonamide residues. *Journal of Immunological Methods*, 337(1), 1-6.

---

Zhao, L., Sun, L., Chu, X. (2009). Chemiluminescence immunoassay. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 28(4), 404-415.



## **CAPÍTULO VI**

### **RECOPIACIÓN DE CONCLUSIONES**



## CONCLUSIONES

**Capítulo III: Desarrollo y validación de un método de cromatografía líquida, acoplada a espectrometría de masas, para la determinación de residuos de sulfonamidas en muestras de miel.**

1. Se ha puesto a punto una nueva metodología analítica para la determinación de 9 sulfonamidas en muestras de miel, mediante cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas.
2. El método de extracción desarrollado combina una hidrólisis con tampón acetato a pH 5, seguido de SPE, que permite recuperar simultáneamente de la matriz, elevadas concentraciones de las nueve sulfonamidas para su análisis posterior mediante cromatografía.
3. Los datos de la validación demuestran que el método descrito permite cuantificar la presencia de sulfonamidas a unos niveles de concentración CC $\alpha$  y CC $\beta$ , compatibles con la legislación actual en materia de residuos.
4. El método desarrollado presenta buena precisión, exactitud, selectividad y linealidad en el intervalo de concentraciones estudiado, por lo que puede utilizarse de forma fiable para el análisis de rutina de las 9 sulfonamidas en muestras de miel.
5. La comparación de las rectas de calibrado obtenidas en matriz y en fase móvil, revelaron la existencia de un efecto matriz importante para todas las sulfonamidas, por lo que fue necesario utilizar un calibrado en matriz para cuantificar adecuadamente todas las sulfonamidas objeto de estudio.
6. El método se aplicó al análisis de 215 muestras de miel de distinta procedencia, detectándose residuos de sulfonamidas en 45 muestras, correspondiendo a STZ y SMX el mayor número de positivos (26 muestras), superando tres muestras los 100  $\mu\text{g kg}^{-1}$  de STZ.

**Capítulo IV: Desarrollo de métodos inmunoquímicos para el análisis de sulfonamidas en muestras de miel.**

7. Se han desarrollado, caracterizado y validado tres inmunoensayos, basados en sueros policlonales, dos de ellos específicos para determinar la presencia STZ en muestras de miel, y un tercero capaz de reconocer simultáneamente a seis sulfonamidas.
8. El ELISA desarrollado para STZ, muestra una elevada sensibilidad y selectividad, aconsejando su empleo en la determinación de sus residuos en muestras de miel.
9. El ELISA genérico puesto a punto, permite la determinación simultánea de STZ, SMP, SPD, SMT, SSZ Y PSTZ, aconsejando su empleo para obtener un índice de las sulfonamidas más comunes en miel, de forma rápida y sencilla, pudiendo discriminar aquellas mieles aptas para consumo, de un análisis posterior mediante cromatografía.
10. La aplicación de inmunoensayos como métodos de análisis, permite procesar simultáneamente un mayor número de muestras que mediante cromatografía, reduciendo considerablemente el tiempo requerido para la presentación de resultados, con valores de recuperación similares a los obtenidos aplicando la metodología de referencia.

**Capítulo V: Desarrollo de un inmunoensayo en flujo lateral para la determinación de sulfatiazol en muestras de miel.**

11. La conjugación a NPs de oro coloidal de un suero específico para STZ, y su inmovilización posterior sobre una membrana de nitrocelulosa, ha permitido desarrollar un inmunoensayo en flujo lateral capaz de detectar  $15 \text{ ng g}^{-1}$  de STZ en muestras de miel.
12. La metodología desarrollada ofrece unas prestaciones adecuadas en cuanto a sensibilidad (100%) y eficiencia (96%), para la determinación de STZ en muestras de miel, proporcionando resultados en 10 minutos.
13. Los resultados de validación del sistema analítico realizado por observadores entrenados en muestras de miel enriquecidas, demuestran que la

metodología permite detectar STZ en muestras de miel de forma visual e inequívoca, a un nivel de concentración inferior al umbral recomendado (50 ng g<sup>-1</sup>). Además, dichos resultados concuerdan con los obtenidos por cromatografía.

14. El ensayo es específico para sulfatiazol, ya que sólo se detecta una pequeña interferencia para SMP y SPD a concentraciones elevadas, superiores a 200 ng g<sup>-1</sup>.
15. La sensibilidad alcanzada en formato de inmunoensayo en flujo lateral fue inferior a la obtenida en placa ELISA. Sin embargo, su rapidez de respuesta, facilidad de manejo y eficacia, aconsejan su uso como método *screening*.



## **APÉNDICE**



## PUBLICACIONES DERIVADAS

(1) **Guillén, I.**, Gabaldón, J. A., Núñez-Delicado, E., Puchades, R., Maquieira, A., Morais, S. (2011). Detection of sulphathiazole in honey samples using a lateral flow immunoassay. *Food Chemistry*, 129(2), 624-629.

(2) Lucas-Abellán, C., **Guillén, I.**, Mercader-Ros, M. T., Serrano-Martínez, A., Núñez-Delicado, E., Gabaldón, J. A. (2013). Fluorometric determination of sulphathiazole in honey by means the formation of cds inclusion complexes. *Carbohydrate Polymer*, 103(1), 87-93.

(3) **Guillén, I.**, Martínez, A., Gabaldón, J. A., Núñez-Delicado, E., Puchades, R., Maquieira, A. (2011). Development of Lateral Flow Immunoassay for Rapid Detection of Oxytetracycline in Honey Samples. *Food and Environment Safety Journal of Faculty of Food Engineering*, vol. X(1), 5-12.

## PATENTE

Gabaldón, J. A., **Guillén, I.**, Morais, S., Puchades, R., Maquieira, A. (2008). *Sistema para la detección de antibióticos en alimentos*. P200801537. España

## CONTRIBUCIONES A CONGRESOS

(1) **Guillén, I.**, Martínez, A., Gabaldón, J. A., Núñez-Delicado, E., Puchades, R., Maquieira, A. (2010). Development of lateral flow immunoassay for rapid detection of oxytetracycline in honey samples. International Conference "Biotechnologies, Present and Perspectives". Universidad de Suceava. Póster

(2) Lucas-Abellán, C., **Guillén, I.**, Gabaldón, J. A., Navarro, P., Fortea, M. I., Núñez-Delicado, E. (2008). Uso de Ciclodextrinas para determinar residuos de sulfatiazol en muestral de miel. II Congreso Iberoamericano sobre Seguridad Alimentaria. CESIA-CIBSA. Póster.

(3) **Guillén, I.**, Gabaldón, J. A., Morais, S., Puchades, R., Maquieira, A. (2008). Inmunoensayo en flujo lateral (LFIA) para el screening de sulfatiazol en miel. II Congreso Iberoamericano sobre Seguridad Alimentaria. CESIA-CIBSA. Póster.

(4) **Guillén, I.**, Gabaldón, J. A., Puchades, R., Maquieira, A. (2006). Rapid immunoassay for detectin tetraciclins in honey. I Congreso Iberoamericano sobre Seguridad Alimentaria. CESIA-CIBSA. Póster.

(5) **Guillén, I.**, Gabaldón, J. A., Guardiola, L., Morais, S., Garre, J., Martínez, A., Puchades, R., Maquieira, A. (2005). Determinación de sulfonamidas en miel por cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (LC-MS). I Congreso Internacional de Seguridad Alimentaria. ILTRE. Colegio Oficial de Veterinarios de la Región de Murcia. Póster.

(6) **Guillén, I.**, Gabaldón, J. A., Guardiola, L., Morais, S., Puchades, R., Maquieira, A. (2005). Estudio de la incidencia de sustancias con actividad farmacológica en mieles de distinta procedencia. III Congreso Nacional de Ciencia y Tecnología de los Alimentos. Universidad de Burgos. Ponencia.

*“Para acabar las cosas, hay que empezar a hacerlas...”*

*San Josemaría Escrivá de Balaguer*