



[0*] Facultat de Química

Departament de Química Orgànica



Instituto de Agroquímica y
Tecnología de Alimentos

Departamento de Biotecnología

PROGRAMA DE DOCTORADO DEL RD 778/1998

325F Química Orgánica en la Industria Quimicofarmacéutica

***Desarrollo de Métodos Inmunoquímicos para el
Análisis de los Fungicidas Estrobilurínicos
Kresoxim-methyl y Trifloxystrobin***

Trabajo realizado por la Licenciada en Química **Rosario López Moreno** en el Departamento de Química Orgánica de la Universitat de València bajo la dirección del Dr. Antonio Abad Somovilla y en el Departamento de Biotecnología del Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos (CSIC) bajo la dirección del Dr. Antonio Abad Fuentes para optar al grado de Doctora en Química.

Fdo. Rosario López Moreno

Valencia, Mayo 2012

Dr. Antonio Abad Somovilla, Catedrático de Química Orgánica del Departamento de Química Orgánica de la Universidad de Valencia y

Dr. Antonio Abad Fuentes, Científico Titular del Departamento de Biotecnología del Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos (CSIC)

CERTIFICAN

Que la presente Tesis Doctoral, titulada “**Desarrollo de Métodos Inmunoquímicos para el Análisis de los Fungicidas Estrobilurínicos Kresoxim-methyl y Trifloxystrobin**”, ha sido realizada bajo su dirección en el Departamento de Química Orgánica (Universidad de Valencia) y en el Departamento de Biotecnología (Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos), por la Licenciada en Química Dña. Rosario López Moreno y autorizan su presentación para que sea calificada como Tesis Doctoral.

Valencia, Mayo 2012

Fdo. Dr. Antonio Abad Somovilla

Fdo. Dr. Antonio Abad Fuentes

*A mis padres, Diego y Juliana,
a mis hermanos, Antonio y Luis Miguel,
a mis tías Isa y Mary,
a mi marido, Montero
y al resto de mi familia*

*"Nuestra recompensa se encuentra
en el esfuerzo y no en el resultado. Un
esfuerzo total es una victoria completa"*

Mahatma Gandhi

Me gustaría que estas líneas sirvieran para expresar mi más profundo y sincero agradecimiento a todas aquellas personas que me han acompañado en esta aventura y que me han ayudado, directa o indirectamente, en la realización del presente trabajo, sin vosotros no habría sido posible.

Al Dr. Antonio Abad Somovilla y al Dr. Antonio Abad Fuentes, directores de esta investigación, por haber confiado en mí y por haberme brindado la posibilidad de realizar la presente Tesis Doctoral. Además, al Dr. Antonio Abad Somovilla por la orientación, seguimiento y supervisión continúa de la misma, pero sobre todo por su paciencia, motivación, disposición en todo momento, ayuda, dedicación y por todo lo que he aprendido de él a lo largo de estos años, y al Dr. Antonio Abad Fuentes por haberme ayudado y apoyado en todo momento, pero sobre todo por sus comentarios, direcciones, sugerencias y correcciones con las que he podido elaborar una adecuada memoria de todo el trabajo realizado durante estos últimos cuatro años. Gracias a ellos, he participado en congresos, cursos y he recibido una formación que me ha permitido acometer satisfactoriamente este proyecto.

A la Dra. Consuelo Agulló por su apoyo, ayuda, disponibilidad y generosidad desde el primer momento, por sus consejos, por las agradables conversaciones que hemos mantenido durante todo este tiempo, por hacer que me sintiera como en familia.

A Xavi, Nacho y Antonio Gris porque desde que pisé el laboratorio de química orgánica estuvieron siempre dispuestos a ayudarme, por todo lo que he aprendido de ellos, por escucharme, por estar conmigo en los buenos y malos momentos, porque tantas y tantas horas juntos, dentro y fuera del laboratorio, son un recuerdo maravilloso. Por lo buena persona que eres, un compañero ejemplar, un excelente amigo, por tu gran capacidad investigadora y extraordinaria inteligencia, pero sobre todo por lo que te admiro, gracias Xavi. Nacho, gracias por amenizar con tu presencia y compañía todas aquellas tardes a altas horas pasando columnas, por estar siempre dispuesto a ayudarme, por nuestras conversaciones, por lo buena gente que eres. Antonio, eres una de las personas más inteligentes, peculiares e inolvidables con las que me he encontrado, gracias por estar siempre dispuesto a ayudar no sólo a mí sino a todo el que te lo pida, por nuestras discusiones y reconciliaciones, por tus divagaciones y “locuras”, por ser simplemente tú.

A Celia (“codi”), Ana y Laura tengo que agradecerles tantas cosas que necesitaría días y días para hacerlo. Gracias por ser además de unas excelentes compañeras unas grandes amigas, por vuestro entusiasmo, constancia y perseverancia, por la paciencia que habéis tenido conmigo, por haber sabido

comprenderme y escucharme siempre, por todo lo que me habéis enseñado sin pedir nada a cambio, por aguantar mis continuas preguntas al principio y mis quejas al final, por todo lo que hemos compartido juntas tanto en el ámbito científico como personal, por haber sido tres pilares indiscutiblemente esenciales en este periodo de mi vida, por haber tenido en vosotras siempre un hombro donde apoyarme para no derrumbarme, porque gran parte de este trabajo es gracias a vosotras, por lo mucho que os aprecio y os quiero, porque aunque ahora nuestros caminos se han separado siempre podréis contar conmigo.

A Paco (IATA), por tu gran contribución sobre todo en la recta final de este trabajo, por tu capacidad para hacer siempre fácil lo complicado, por estar siempre dispuesto a ayudar, por escucharme y aconsejarme, por todo lo que hemos compartido dentro y fuera del laboratorio, por tu alegría y siempre buen humor, por ser un gran amigo y mejor compañero.

A Jovi, por sus consejos y sugerencias, por su paciencia, por aguantar nuestras locuras en el laboratorio, por ser un buen compañero.

A Estela, porque gracias a ella conseguí ponerme en contacto con mis directores de tesis y realizar esta extraordinaria experiencia, por ser una de las personas que ha pasado por mi vida que me ha dejado huella, tanto por su fortaleza personal como por su capacidad investigadora, por los estupendos años que compartimos piso escuchándonos, apoyándonos, riendo, llorando...

A Aida y Alicia, por estar siempre dispuestas a escucharme y ayudarme, por vuestra simpatía y amistad, por todos los momentos compartidos. Gracias Aida por echarme una mano (por no decir las dos) en la síntesis de la gran cantidad de análogos, por haber sabido aguantarme sin quejarte. Gracias Alicia por todos los momentos vividos, nuestras conversaciones, consejos y sobre todo por todo lo que me has animado y apoyado.

A Vio y Anna, al resto de compañeros de química orgánica y del IATA: Daniel, Santi, Carlos, Javi (3), Víctor, Paco, David, Rocío, Mariola, Ester, Iván, Elena, Roberto, Helena, Agustín, Carlos, Jose, Jaime, Carmen, Emilia y a muchos otros que en algún momento os habéis cruzado en mi camino durante este tiempo, gracias por todas las experiencias que hemos compartido a lo largo de este periodo, por vuestro apoyo, comprensión y confianza, por todos los momentos que hemos pasado juntos tanto dentro como fuera del trabajo, porque la mayoría de vosotros os habéis convertido en verdaderos amigos.

A todo el personal de la secretaría del Departamento de Química Orgánica, Vicenta, Javier e Inma por su atención personal y a Sales e Isabel (servicio de masas) por su esfuerzo y simpatía.

A mis padres, Diego y Juliana, por ser las personas más importantes de mi vida, por ser a quien les debo lo que soy, por su esfuerzo, dedicación y entera confianza, por ser un ejemplo a seguir. Mama tú me enseñaste a levantarme después de cada tropiezo y a tener siempre un colchón para los tiempos difíciles, gracias porque además de ser mi madre eres una gran amiga y por tu ayuda incondicional para poder cumplir mis sueños. Papa gracias por estar siempre a mi lado, por apoyarme en mi carrera, en mis logros y fracasos, en todo.

A mis hermanos, Antonio y Luis Miguel, gracias por sentirnos siempre orgullosos de mí, por todos los momentos inolvidables y porque sois dos pilares importantes en mi vida.

A mis tías, Isa y Mary, a quienes considero como hermanas, gracias por todo el cariño, confianza y apoyo, sobre todo en los momentos difíciles, por compartir momentos significativos conmigo y por siempre estar dispuestas a escucharme y ayudarme en cualquier momento.

A mis peques, Emilio, Lorena, Marcos, Pablo y Carla, por darme muchísimo cariño, amor y felicidad, porque una sonrisa vuestra es capaz de iluminar el día más nublado, porque os quiero con locura.

A mi abuelita, Bárbara, gracias por quererme y tratarme siempre como a una hija, y al resto de mi familia por la confianza que me han dado en todo momento, pero sobre todo por estar, cada uno a su manera, respaldándome, aconsejándome, ayudándome y apoyándome para alcanzar mis objetivos.

Finalmente, mi más sincero agradecimiento es para mi marido, Montero, que durante estos años ha sabido apoyarme para continuar y nunca renunciar, por toda la paciencia que ha tenido conmigo, por su comprensión y ayuda, por estar siempre a mi lado, por hacer que cada día sea mejor que el anterior, por la tranquilidad y felicidad que me aporta, por lo mucho que lo quiero.

La realización de este trabajo ha sido posible gracias a una beca predoctoral FPI concedida por el Ministerio de Educación y Ciencia (BES-2007-16005). Esta Tesis Doctoral se enmarca dentro del proyecto "*Desarrollo de métodos inmunoquímicos para el análisis de fungicidas estrobilurínicos en alimentos: Síntesis de haptenos y producción de anticuerpos monoclonales para fungicidas de la familia de las estrobilurinas*" (AGL2006-12750-C02-02) del Ministerio de Educación y Ciencia, en el que se ha contado con la participación de la empresa Ecología y Protección Agrícola, S.L.

Índice

Abreviaturas	7
1. Introducción	13
1.1. Las estrobilurinas naturales	13
1.1.1. Las estrobilurinas sintéticas. Nuevos fungicidas agroquímicos	19
1.2. Estrobilurinas oximinoacetatos	23
1.2.1. El descubrimiento de kresoxim–methyl	23
1.2.1.1. Propiedades de kresoxim–methyl	26
1.2.1.2. Síntesis de kresoxim–methyl	29
1.2.2. El descubrimiento de trifloxystrobin	33
1.2.2.1. Propiedades de trifloxystrobin	35
1.2.2.2. Síntesis de trifloxystrobin	38
1.3. Residuos de plaguicidas en alimentos. Seguridad alimentaria	39
1.3.1. Kresoxim–methyl y trifloxystrobin: residuos en alimentos	44
1.4. Métodos de análisis de plaguicidas	46
1.4.1. Métodos de análisis de kresoxim–methyl y trifloxystrobin	47
1.5. Métodos inmunoquímicos para la detección de plaguicidas	49
1.6. Etapas en el desarrollo de un inmunoensayo	54
1.6.1. Síntesis de haptenos. La etapa determinante	55
1.6.1.1. Modelización molecular en el diseño de haptenos	59
1.6.1.2. El principio de Landsteiner	61
1.6.2. Preparación de conjugados proteicos	63
1.6.3. Anticuerpos	66
1.6.3.1. Producción de anticuerpos	68
1.6.3.2. Producción de mAbs: tecnología de generación de hibridomas	71
1.6.4. Caracterización de anticuerpos y diseño de inmunoensayos	75
1.6.5. Optimización de la sensibilidad del ensayo	82
1.6.6. Determinación de la selectividad del ensayo	84
1.6.7. Validación analítica de inmunoensayos	85

2. Objetivos	89
3. Resultados y discusión	93
3.1. Diseño de haptenos: planteamiento general	93
3.1.1. Preparación de los brazos espaciadores	99
3.1.2. Síntesis de haptenos para kresoxim–methyl	100
3.1.2.1. Síntesis del hapteno KMa6	100
3.1.2.2. Síntesis del hapteno KMb6	106
3.1.2.3. Síntesis del hapteno KMc6	108
3.1.2.4. Síntesis del hapteno KMe6	112
3.1.2.5. Síntesis del hapteno KMo6	113
3.1.3. Síntesis de haptenos para trifloxystrobin	117
3.1.3.1. Síntesis del hapteno TFa6	117
3.1.3.2. Síntesis del hapteno TFb6	120
3.1.3.3. Síntesis del hapteno TFc6	123
3.1.3.4. Síntesis de los haptenos TF0 y TFe6	127
3.1.3.5. Síntesis del hapteno TFo6	128
3.1.3.6. Síntesis de los haptenosTFt6 y TFf6	129
3.2. Activación de los haptenos	133
3.3. Preparación de conjugados proteicos	135
3.4. Inmunización y producción de anticuerpos	140
3.4.1. Producción de anticuerpos policlonales	140
3.4.2. Producción de anticuerpos monoclonales	141
3.4.2.1. Generación de hibridomas y producción de anticuerpos monoclonales	142
3.5. Caracterización de anticuerpos	145
3.5.1. Caracterización de anticuerpos policlonales de conejo	145
3.5.1.1. Formato directo o de anticuerpo inmovilizado	145
3.5.1.2. Formato indirecto o de conjugado inmovilizado	154
3.5.1.3. Conclusiones generales de la caracterización de los anticuerpos policlonales	158
3.5.2. Caracterización de anticuerpos monoclonales	159
3.5.2.1. Formato indirecto: Efecto de la heterología de hapteno	163
3.5.2.2. Formato directo: Efecto de la heterología de hapteno	169

3.5.2.3. Conclusiones de la caracterización de los mAbs en ambos formatos de ELISA	173
3.6. Evaluación de la especificidad de los anticuerpos monoclonales	174
3.6.1. Especificidad frente a análogos: análisis de agrupación mediante métodos jerárquicos aglomerativos	175
3.6.1.1. Especificidad de los anticuerpos anti-kresoxim-methyl frente a análogos estructurales	177
3.6.1.2. Especificidad de los anticuerpos anti-trifloxystrobin frente a análogos estructurales	183
3.6.2. Especificidad frente a las principales estrobilurinas	190
3.6.3. Especificidad de los ensayos seleccionados	195
3.7. Optimización y caracterización de los ensayos seleccionados	196
3.7.1. Influencia del pH y de la fuerza iónica	197
3.7.2. Influencia de la concentración de Tween 20	201
3.7.3. Tolerancia a disolventes orgánicos	203
3.7.4. Características analíticas de los inmunoensayos propuestos	206
3.8. Aplicación de los inmunoensayos al análisis de muestras vegetales	209
3.8.1. Determinación de kresoxim-methyl y trifloxystrobin en muestras fortificadas	209
3.8.2. Determinación del efecto matriz	210
3.8.3. Estudios de recuperación	214
3.8.4. Análisis de muestras de campo	220
3.8.4.1. Estudio comparativo con GC-MS	221
4. Conclusiones	239
5. Materiales y métodos	243
5.1 Reactivos, aparatos y técnicas generales	243
5.1.1. Síntesis de haptenos y análogos de KM y TF	243
5.1.2. Preparación de conjugados proteicos	245
5.1.3. Cultivos celulares y producción de anticuerpos	246
5.1.4. Análisis por ELISA	246
5.1.5. Análisis de muestras por GC-MS	248
5.2. Síntesis de haptenos	248
5.2.1. Síntesis de los brazos espaciadores	248
5.2.2. Síntesis de haptenos para kresoxim-methyl	249
5.2.2.1. Síntesis del hapteno KMa6	249

5.2.2.2. Síntesis del hapteno KMb6	258
5.2.2.3. Síntesis del hapteno KMc6	262
5.2.2.4. Síntesis del hapteno KMe6	269
5.2.2.5. Síntesis del hapteno KMo6	271
5.2.3. Síntesis de haptenos para trifloxystrobin	276
5.2.3.1. Síntesis del hapteno TFa6	276
5.2.3.2. Síntesis del hapteno TFb6	281
5.2.3.3. Síntesis del hapteno TFc6	289
5.2.3.4. Síntesis de los haptenos TF0 y TFe6	295
5.2.3.5. Síntesis del hapteno TFo6	298
5.2.3.6. Síntesis del hapteno TFf6	300
5.2.3.7. Síntesis del hapteno TFf6	304
5.3. Síntesis de análogos	306
5.3.1. Síntesis de análogos de kresoxim–methyl	306
5.3.1.1. Síntesis de análogos del grupo I	306
5.3.1.2. Síntesis de análogos del grupo II	312
5.3.2. Síntesis de análogos de trifloxystrobin	316
5.3.2.1. Preparación de oximas	316
5.3.2.2. Síntesis de análogos del grupo I	320
5.3.2.3. Síntesis de análogos del grupo II y III	321
5.4. Preparación de conjugados proteína–hapteno	329
5.4.1. Preparación de los conjugados inmunogénicos con BSA	329
5.4.2. Preparación de los conjugados competidores de ensayo	331
5.4.2.1. Preparación de conjugados de tapizado con OVA	331
5.4.2.2. Preparación de trazadores enzimáticos con HRP	332
5.5. Producción de anticuerpos policlonales de conejo	332
5.5.1. Inmunización de conejos	332
5.5.2. Obtención de antisueros de conejo	333
5.6. Producción de anticuerpos monoclonales de ratón	333
5.6.1. Inmunización de ratones	333
5.6.2. Obtención de antisueros de ratón	334
5.6.3. Fusiones celulares para la obtención de hibridomas	334

5.6.4. Selección, clonación y conservación de hibridomas	335
5.6.5. Producción y purificación de anticuerpos monoclonales	337
5.7. Inmunoensayos para la detección de KM y TF	338
5.7.1. Formatos de ELISA competitivos	338
5.7.1.1. ELISA de conjugado inmovilizado (formato indirecto)	338
5.7.1.2. ELISA de anticuerpo inmovilizado (formato directo)	338
5.7.2. Procesamiento de la señal y curvas de inhibición	339
5.7.3. Evaluación de la especificidad de los anticuerpos	340
5.7.3.1. Estudios de reactividad cruzada	340
5.7.3.2. Análisis de agrupación jerárquica	341
5.7.4. Caracterización y optimización de los inmunoensayos	342
5.7.4.1. Influencia del pH, fuerza iónica y concentración de Tween 20	343
5.7.4.2. Tolerancia a disolventes orgánicos	344
5.7.5 Aplicación de los inmunoensayos al análisis de muestras vegetales	345
5.7.5.1. Determinación del efecto matriz	345
5.7.5.2. Análisis de muestras vegetales fortificadas	346
5.7.6. Análisis de muestras de campo: estudio comparativo con GC–MS	346
5.7.6.1. Obtención de muestras de campo de tomate, pepino y fresa	346
5.7.6.2. Procedimiento de extracción para el análisis por GC–MS	347
5.7.6.3. Análisis de las muestras por GC–MS	348
5.7.6.4. Análisis de muestras por ELISA	349
6. Bibliografía	351

Abreviaturas

A_0	absorbancia en ausencia de analito
A o Abs.	absorbancia
Ab	anticuerpo
AESAN	Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición
Ag	antígeno o analito
Ag*	antígeno marcado o conjugado de ensayo
AIBN	2,2-axobisisobutironitrilo
A_{max}	absorbancia máxima
A_{min}	absorbancia mínima
AOAC	<i>Association of Official Analytical Chemists</i>
AP	fosfatasa alcalina
APVMA	<i>Australian Pesticides and Veterinary Medicines Authority</i>
As	antisuero
ATP	adenosín trifosfato
BPA	buenas prácticas agrícolas
BSA	seroalbúmina bovina
c	cuadruplete
CAMM	modelización molecular asistida por ordenador
CAS	Número registrado por <i>Chemical Abstracts Service</i>
CD	compact disc
$CDCl_3$	cloroformo deuterado
cd-ELISA	ELISA de anticuerpo inmovilizado competitivo directo
CE o EC	Comisión Europea (<i>European Commission</i>)
CFI	cloroformiato de isobutilo
ci-ELISA	ELISA de conjugado inmovilizado competitivo indirecto
COSY	correlación homonuclear de protones
d	doblete
da	doblete ancho
DAD	detector de red de diodos
DCC	<i>N,N'</i> -diciclohexilcarbodiimida
dd	doble doblete
ddd	doble doblete doblado
DEPT	incremento no distorsionado por transferencia de polarización
DESI	desorción e ionización por electroespray
DG SANCO	Dirección General de Sanidad y Consumidores
DHFR	dihidrofolato reductasa
DM	dimoxystrobin

DMEM	medio de Eagle modificado por Dulbecco
DMF	<i>N,N</i> -dimetilformamida
DMSO	dimetilsulfóxido
DNA	ácido desoxirribonucleico
DSC	carbonato de <i>N,N'</i> -disuccinimidilo
dt	doble triplete
DT ₅₀	estabilidad y/o fotoestabilidad en agua
DVD	disco versátil digital
EC ₅₀	concentración efectiva media
ECD	detector de captura de electrones
EFSA	<i>European Food Safety Authority</i>
ELISA	inmunoensayo enzimático sobre soporte sólido
EM	espectro de masas
EMAR	espectro de masas de alta resolución
EPA	<i>Environmental Protection Agency</i>
equiv	equivalente
ES	electrospray
ESI	ionización por electrospray
FAB	bombardeo rápido de átomos
FAO	Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura
GAR-HRP	antisuero policlonal de cabra anti-inmunoglobulinas de conejo marcado con HRP
GC	cromatografía de gases
GD	granulado dispersable
HAT	medio de cultivo selectivo con hipoxantina, aminopterin y timidina
HCL	agrupación jerárquica
HFCS	suplemento de fusión y clonación para hibridomas
HGPRT	hipoxantina guanina fosforribosil transferasa
HPLC	cromatografía líquida de alta eficacia
HRP	peroxidasa de rábano picante
HSQC	correlación cuántica heteronuclear sencilla
HT	medio de cultivo con hipoxantina y timidina
<i>I</i>	fuerza iónica
IC ₁₀	concentración de analito que reduce un 10% la señal máxima
IC ₂₀	concentración de analito que reduce un 20% la señal máxima
IC ₅₀	concentración de analito que reduce un 50% la señal máxima
IC ₈₀	concentración de analito que reduce un 80% la señal máxima
IE	impacto electrónico
Ig	inmunoglobulina
IR	infrarrojo

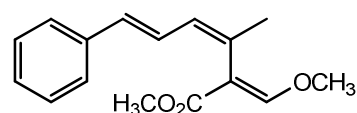
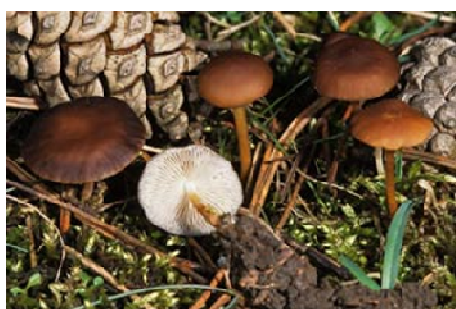
<i>J</i>	constante de acoplamiento
JMPR	<i>Joint Meeting on Pesticide Residues (FAO/WHO)</i>
K_a	constante de afinidad
KM	kresoxim-methyl
K_{OC}	coeficiente de carbono orgánico
LC	cromatografía líquida
LC_{50}	concentración letal 50%
LD_{50}	dosis letal 50%
LDA	di-isopropil amiduro de litio
LIT	trampa de iones lineal
LMR	límite máximo de residuos
LOD	límite de detección
LOQ	límite de cuantificación
m	multiplete
m/z	relación masa/carga
mAb	anticuerpo monoclonal
MARM	Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino
MALDI	desorción/ionización láser asistida por matriz
MIP	polímero de impresión molecular
MS	detector de masas
MS–MS	detector de masas tándem
NADH	nicotinamida adenina dinucleótido reducida
NBS	<i>N</i> -bromosuccinimida
NHS	<i>N</i> -hidroxisuccinimida
NOE	efecto nuclear Overhauser
NOESY	espectroscopía de efecto nuclear Overhauser
NPD	detector de nitrógeno–fósforo
OPD	<i>o</i> -fenilendiamina
OVA	ovoalbúmina
pAb	anticuerpo policlonal
PB	tampón fosfato
PBS	tampón fosfato salino
PBST	tampón fosfato salino con Tween 20
PBT	tampón fosfato con Tween 20
PEG	polietilenglicol
Pf.	punto de fusión
pI	punto isoeléctrico
PMRA	<i>Health Canada's Pest Management Regulatory Agency</i>
P_{ow}	coeficiente de partición octanol-agua
ppb	partes por billón

ppm	partes por millón
ppt	partes por trillón
PSA	amina primaria/secundaria
p/v	relación peso/volumen
q	quintuplete
QuEChERS	<i>Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, and Safe</i>
rAb	anticuerpo recombinante
RAM-HRP	antisuero policlonal de conejo anti-inmunoglobulinas de ratón marcado con HRP
rAs	antisuero policlonal de conejo
RC	reactividad cruzada
Reg.	reglamento
RM	relación molar (proteína:hapteno)
RMN	resonancia magnética nuclear
rpm	revoluciones por minuto
s	singlete
sa	singlete ancho
SBF	suero bovino fetal
S _E Ar	sustitución electrofílica aromática
SIM	<i>Selective Ion Monitoring</i>
SPE	extracción en fase sólida
t	tripleto
t.a.	temperatura ambiente
ta	tripleto ancho
td	triple doblete
TF	trifloxystrobin
TFA	ácido trifluoroacético
THF	tetrahidrofurano
TOF	tiempo de vuelo
TOF-MS	detector de masas con tiempo de vuelo
TRNOE	efecto nuclear Overhauser transferido
UPLC	cromatografía líquida de ultra alta eficacia
UV	ultravioleta
v/v	relación volumen/volumen
Vis	visible

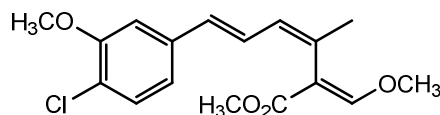
1. Introducción

1.1. Las estrobilurinas naturales

Las estrobilurinas son una nueva familia de fungicidas de origen natural. Su descubrimiento fue inspirado por un grupo de fungicidas naturales derivados del ácido β -metoxiacrílico (Sauter *et al.*, 1999), producidos por una amplia gama de hongos basidiomicetos que crecen en la madera en descomposición. El primer miembro de esta familia de productos naturales fue la estrobilurina A, originalmente llamada “mucidin”, descubierta en la década de los 60 por Mulisken *et al.*, quienes la obtuvieron de *Oudemansiella mucida* (hongo de porcelana), un hongo que crece en el tronco de las hayas (Clough, 1993). Sin embargo, la estructura de la estrobilurina A no fue asignada hasta finales de 1977, cuando T. Anke y colaboradores la aislaron e identificaron, junto con la estrobilurina B, del micelio de la cepa *Strobilurus tenacellus*, un hongo saprófito que crece en las piñas de las coníferas (Anke *et al.*, 1977). Ambas moléculas mostraron una poderosa actividad antibiótica frente a un amplio grupo de especies fúngicas, siendo además unos prometedores agentes antitumorales (Figura 1.1).



Estrobilurina A (1)



Estrobilurina B (2)

Figura 1.1. Primeras estrobilurinas aisladas de *Strobilurus tenacellus*

Tras el hallazgo de esta nueva clase de moléculas, se empezó a llevar a cabo la búsqueda de otras especies de hongos que produjeran estas estrobilurinas. Así, unos años más tarde (Anke *et al.*, 1979) se descubrió que la *Oudemansiella mucida*, además de producir estrobilurina A, también producía

otra estrobilurina, que fue aislada, identificada y denominada oudemansina A, la tercera estrobilurina natural con un elevado poder antifúngico (**Figura 1.2**). La oudemansina difiere de las estrobilurinas en que el segundo doble enlace del sistema triénico esta reducido y presenta un sustituyente metoxilo.

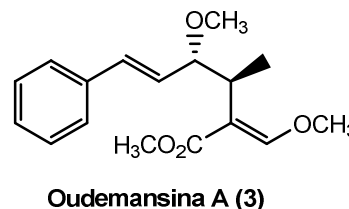


Figura 1.2. *Oudemansiella mucida* y oudemansina A

Posteriormente se descubrió que la abundancia natural de esta nueva clase de fungicidas no estaba confinada a los géneros *Strobilurus* y *Oudemansiella*, ya que también se aislaron un gran número de estrobilurinas a partir de especies pertenecientes a los géneros *Xerula*, *Hydropus*, *Mycena*, *Filoboletus*, *Crepidotus*, *Cyphellopsis* y *Bolinea* (Anke, 1995).

Hasta la fecha, han sido aisladas otras estrobilurinas de una gran variedad de hongos basidiomicetos (Sauter *et al.*, 1999; Balba, 2007), conteniendo todas ellas la estructura base de la estrobilurina A u oudemansina A. Todas poseen una marcada actividad antifúngica debida principalmente al elemento común que presentan, el grupo (*E*)-3-metoxiacrilato de metilo, que constituye el grupo toxóforo principal de las estrobilurinas y es responsable directo de su actividad antibiótica.

En la **Figura 1.3** se muestran las estrobilurinas aisladas, en las cuales varían únicamente los sustituyentes en las posiciones 3 y 4 del anillo aromático.

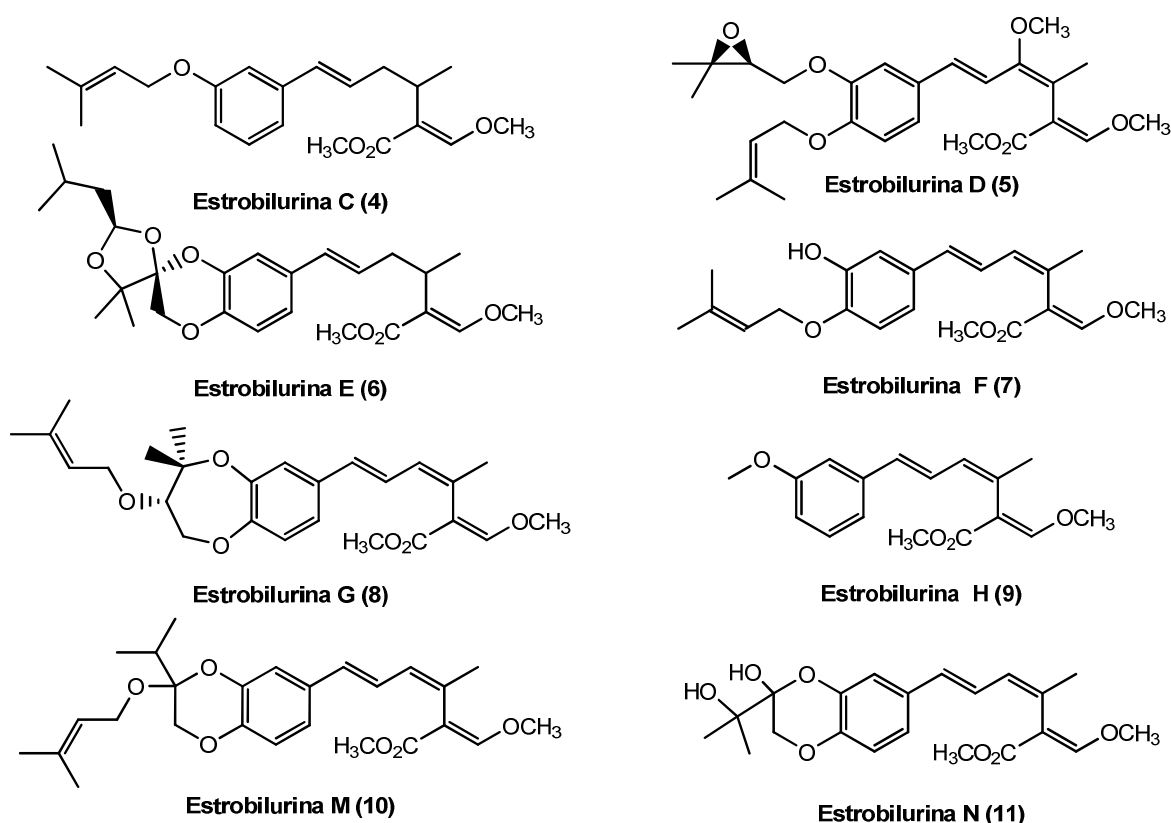


Figura 1.3. Estrobilurinas naturales

La estrobilurina C (4) y la oudemansina B (17) (**Figura 1.5**) fueron aisladas respectivamente de hongos de las especies *Xerula longipes* y *Xerula melanotricha* (Anke *et al.*, 1983); ambas moléculas inhiben el crecimiento de una amplia variedad de hongos saprófitos y fitopatógenos a concentraciones muy bajas. Las D (5) y F (7) fueron aisladas e identificadas en el basidiomiceto *Cyphellopsis anomala* y poseen actividad citostática (Weber *et al.*, 1990a). La estrobilurina E (6), aislada de *Crepidotus fulvotomentosus*, se caracteriza por ser la estrobilurina con mayor actividad citostática (Weber *et al.*, 1990b). Las estrobilurinas G (8) y H (9) fueron descubiertas y aisladas del ascomiceto *Bolinea lutea saccharomyces* (Fredenhagen *et al.*, 1990a y b), siendo la estrobilurina G la que mostró una mayor actividad antitumoral *in vitro*. Las variantes M (10) y N (11) fueron aisladas de un basidiomiceto tropical del género *Mycena* (Daferner *et al.*, 1998), la M presenta propiedades antifúngicas y citostáticas elevadas y, curiosamente, la estrobilurina N fue la primera estrobilurina aislada sin actividad antifúngica (Buchanan *et al.*, 1999). Como se observa, algunas de estas estructuras son relativamente complejas,

destacando las estrobilurinas E (**6**), G (**8**), M (**10**) y N (**11**) que contienen agrupaciones 1,4–dioxano o 1,4–dioxopano unidas a un anillo fenílico (Kroiβ y Steglich, 2004).

Las últimas estrobilurinas naturales en ser descubiertas fueron la estrobilurina O (**12**) y P (**13**), aisladas de *Mycena galericulata* en el año 2000 por Hosokawa y colaboradores. (**Figura 1.4**). Constituyen variantes de la estrobilurina G (**8**) en las que el resto éter isoprénico unido al anillo de 1,4–dioxopano incorpora una función epóxido (O) o una función carbonílica en el metileno (P). Ambas presentan una intensa actividad antitumoral y nematocida (Hosokawa *et al.*, 2000).

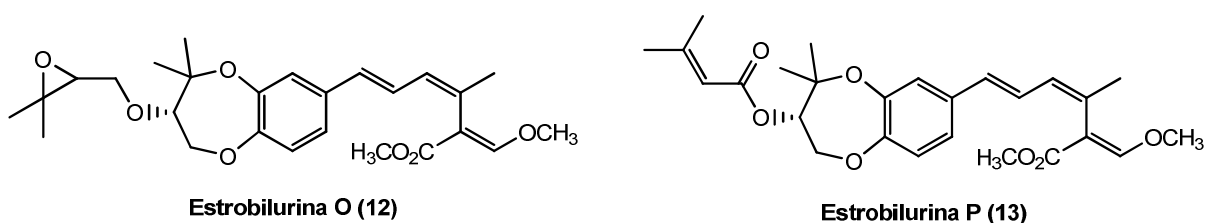


Figura 1.4. Últimas estrobilurinas naturales descubiertas

En la **Figura 1.5** se muestran la hidroxiestrobilurina A (**14**) y las estrobilurinas que, además de variar los sustituyentes en las posiciones 3 y 4, incorporan un grupo metoxilo en la posición 4 del sistema 1,6–triénico de la molécula, junto con el resto de oudemansinas naturales.

La hidroxiestrobilurina A (**14**) se detectó en el caldo de cultivo de un hongo del género *Xerula* (Engler *et al.*, 1995) y la oudemansina X (**18**) de *Oudemansiella radicata* (Anke *et al.*, 1990); ambas son buenos antifúngicos y no presentan actividad antibacteriana.

Sumergidos en el afán de descubrir nuevos compuestos de esta familia, se identificaron dos metabolitos en la especie *Favolaschia pustulosa*, la 9–metoxiestrobilurina K (**15**) y la 9–metoxiestrobilurina L (**16**), compuestos que representan el nexo de unión entre estrobilurinas y oudemansinas (Wood *et al.*, 1996). Estas dos, junto con la oudemansina L (**19**), son potentes citotóxicos.

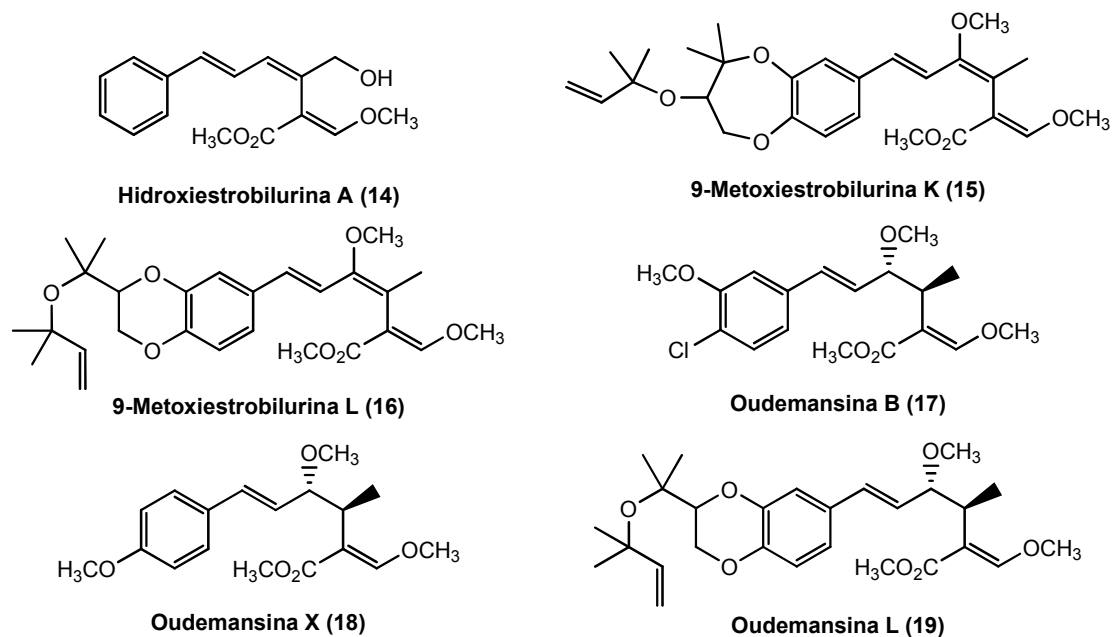


Figura 1.5. Hidroxiestrobilurina, metoxiestrobilurinas y oudemansinas naturales

La importancia de las estrobilurinas se debe a que presentan un mecanismo de acción diferente al de los fungicidas que se conocían con anterioridad, lo que representa una oportunidad para combatir organismos que se han vuelto resistentes al tratamiento con otros fitosanitarios. La actividad fungicida de las estrobilurinas y oudemansinas radica en su capacidad de inhibir la respiración mitocondrial de los hongos (Knight *et al.*, 1997; Bartlett *et al.*, 2002; Balba, 2007). Existen distintos sitios de unión en la vía de la respiración mitocondrial, pero tanto las estrobilurinas como las oudemansinas presentan un nuevo sitio de unión y por lo tanto un nuevo modo de acción. Las estrobilurinas se unen al sitio de oxidación de la ubihidroquinona (Q_0) en el citocromo b, ubicado dentro del complejo citocromo bc1 (denominado también **complejo III**), localizado en la membrana interna mitocondrial de hongos y otros eucariotas (Xia *et al.*, 1997). Cuando un inhibidor, en este caso una estrobilurina, se une al coenzima Q_0 , bloquea el transporte de electrones entre el citocromo b y el citocromo c, interrumpiendo el ciclo energético del hongo, impidiendo la oxidación del NADH y la síntesis de ATP, y causando finalmente su muerte (**Figura 1.6**).

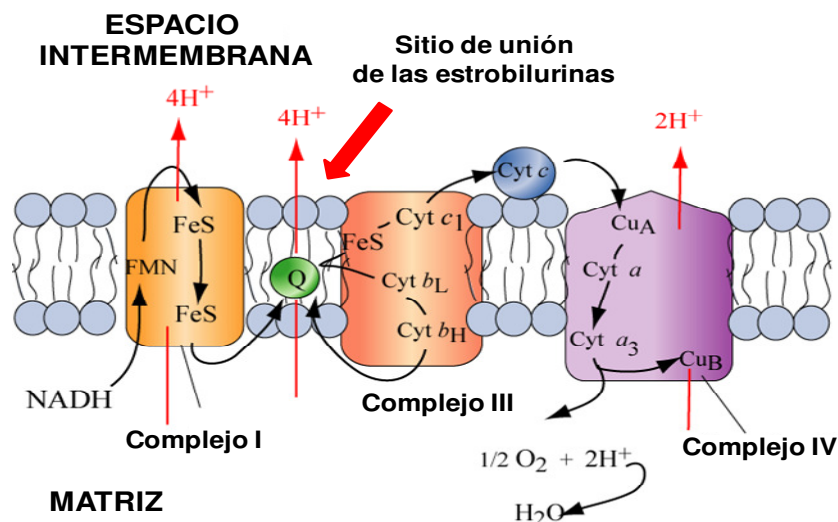


Figura 1.6. Mecanismo de acción de las estrobilurinas en la respiración mitocondrial

El grupo toxóforo de las estrobilurinas y oudemansinas constituye un elemento esencial en su modo de acción, siendo fundamental para conseguir su unión al sitio Q_0 . No es por lo tanto extraño que otros productos naturales aislados de fuentes no fúngicas contengan la agrupación (*E*)-3-metoxiacrilato de metilo, y por lo tanto sean capaces de interrumpir la cadena de transporte electrónico. Así, los mixotiazoles, melitiazoles y cistotiazoles aislados de las mixobacterias *Myxococcus fulvus* y *Angiococcus disciformis* como el mixotiazol Z (**20**) contienen dicha subunidad y son potentes fungicidas (Clough *et al.*, 2006). También, alcaloides como la corinanteína (**21**), aislada de plantas rubiáceas como *Corynanthe pachicereus* (Staerk *et al.*, 2000), contiene el mismo grupo toxóforo y son activos frente al protozoo causante de la leishmaniasis (**Figura 1.7**).

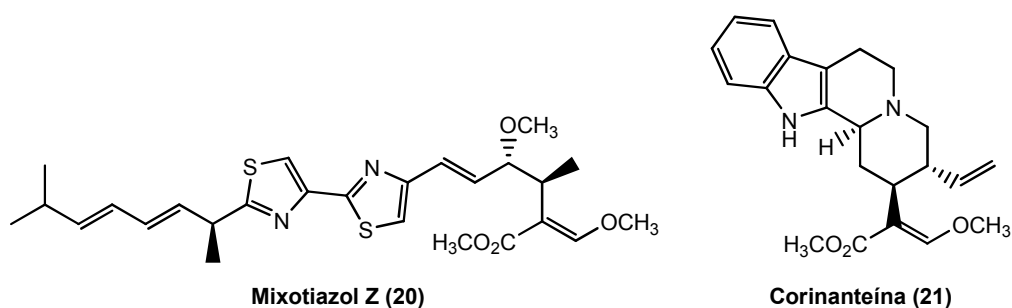


Figura 1.7. Otros productos naturales con el grupo (*E*)-3-metoxiacrilato de metilo

Se conocen muchos inhibidores de la respiración mitocondrial en hongos, pero la importancia de las estrobilurinas está motivada por el nuevo mecanismo de acción. Una circunstancia como ésta se produce muy excepcionalmente y no es de extrañar que pronto estas moléculas llamaran la atención de dos de las empresas que controlan el mercado mundial de agroquímicos, como fue el caso de BASF y Syngenta (Bartlett *et al.*, 2002). Además, estos fungicidas inducen alteraciones fisiológicas en muchos cultivos, particularmente en los cereales, como una intensificada pigmentación del tejido verde de las hojas y un envejecimiento más lento de la planta, lo que los hace potencialmente más beneficiosos en agricultura (Gullino *et al.*, 2000).

No obstante, el hecho de actuar sobre la cadena respiratoria hace a las estrobilurinas potencialmente tóxicas para otros organismos y, por tanto, la toxicidad es un factor muy a tener en cuenta a la hora de proyectar las estrobilurinas al mercado.

1.1.1. Las estrobilurinas sintéticas. Nuevos fungicidas agroquímicos

Como ya se ha comentado, la elevada actividad antifúngica y su nuevo modo de acción convirtió a las estrobilurinas en excelentes candidatos para ser utilizados como compuestos agroquímicos, capaces de controlar numerosas plagas de hongos que atacan a las cosechas de todo el mundo. Sin embargo, aunque los primeros ensayos realizados con la estrobilurina A (**1**) mostraron buena acción fungicida en invernadero, las pruebas realizadas en campo revelaron una baja eficacia, circunstancia debida a la elevada volatilidad del compuesto y a la baja estabilidad del sistema poliénico conjugado a la radiación solar. La acción de los rayos ultravioleta produce una rápida descomposición de la estrobilurina natural una vez aplicada sobre las cosechas, lo que se traduce en una reducción de la sustancia activa, siendo inviable su aplicación (Barrachina *et al.*, 1999). Estos problemas relacionados con su estructura son extensibles a todas las demás estrobilurinas, lo que imposibilita su utilización como fungicidas agroquímicos.

Aun así, debido al gran interés motivado por disponer de fungicidas con una alta actividad antibiótica y nuevos modos de acción, BASF y Syngenta iniciaron un programa de síntesis química con el objetivo de diseñar análogos sintéticos

de las estrobilurinas naturales que, manteniendo su elevada actividad fungicida (en lo posible preservando el grupo *(E)*-3-metoxiacrilato de metilo), mostraran sus propiedades físicas optimizadas, es decir, alta fotoestabilidad y baja volatilidad.

Tras años de exhaustiva investigación, en 1992 se presentaron, casi simultáneamente, las dos primeras estrobilurinas sintéticas: azoxystrobin (Syngenta) y kresoxim-methyl (BASF)¹. Ambos productos pioneros fueron lanzados al mercado por primera vez en 1996, con un gran éxito comercial. Desde entonces, tanto BASF y Syngenta como otras compañías han desarrollado nuevas estrobilurinas comerciales, como son metominostrobin (Shionogi, 1999), trifloxystrobin (Bayer, 1999), picoxystrobin (Syngenta, 2002) y pyraclostrobin (BASF, 2002), de forma que en el año 2002 ya se disponía de un total de seis estrobilurinas sintéticas para uso agroquímico (**Figura 1.8**). Todos estos compuestos se incluyen dentro del grupo de inhibidores denominado Q_oI (Bartlett *et al.*, 2001 y 2002; Balba, 2007) por su unión al coenzima Q_o bloqueando la respiración mitocondrial.

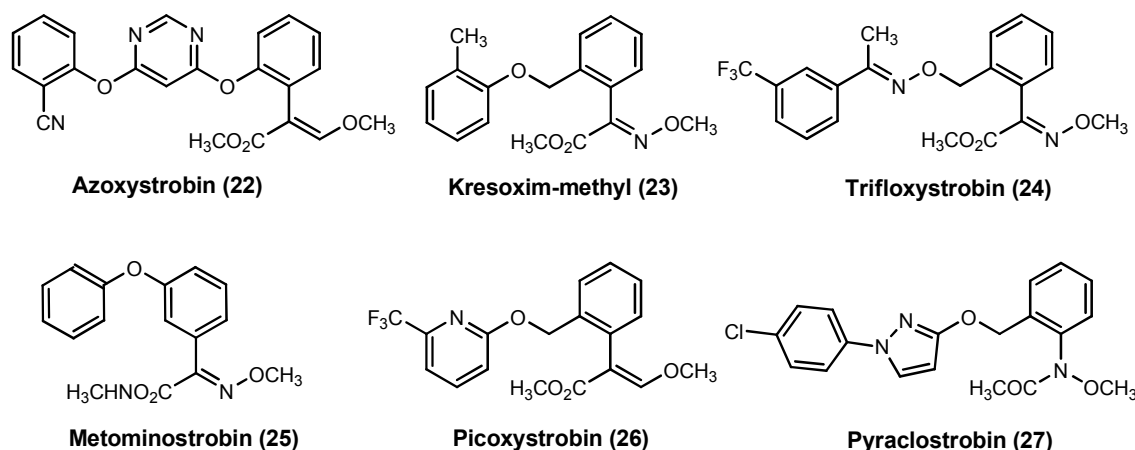


Figura 1.8. Principales fungicidas estrobilurínicos sintéticos

Todavía hoy en día estas seis primeras estrobilurinas sintéticas son las que más se utilizan a nivel mundial, las que más registros han obtenido y por lo tanto las que más beneficios generan.

¹ Para nombrar todos los fungicidas que aparecen en este trabajo se ha adoptado la denominación ISO de los mismos.

El desarrollo de esta nueva clase de fungicidas sigue hoy en día en pleno auge, ya que han continuado apareciendo en el mercado nuevas estrobilurinas con modificaciones estructurales diferentes a las pioneras, ya sea para tratar de mejorar a las anteriores o simplemente para cubrir el mismo mercado sin violar las patentes que las protegen. Recientemente, se han lanzado al mercado cuatro nuevas estrobilurinas sintéticas (**Figura 1.9**): enestroburin (SYRYCI, 2002–2003, registrado sólo en China) (Wang, 2010), fluoxastrobin (Bayer, 2005), dimoxystrobin (BASF, 2006) y oryastrobin (BASF, 2008, registrada sólo en Japón para arroz) (<http://www.alanwood.net/pesticides/>). Todavía se encuentran en fase de incorporación progresiva (Balba, 2007).

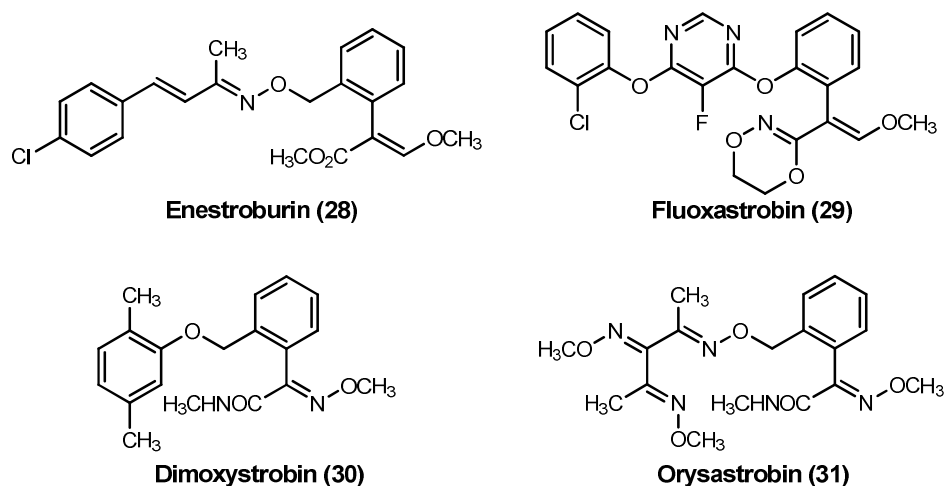


Figura 1.9. Fungicidas estrobilurínicos sintéticos de reciente aparición

En la actualidad, nuevos fungicidas estrobilurínicos se empiezan a abrir camino en el mercado asiático. En particular, la compañía china SYRICI (*Shenyang Research Institute of Chemical Industry*) ha desarrollado tres nuevas estrobilurinas que han sido anunciadas y registradas durante el año 2010 de forma temporal para su uso en China (**Figura 1.10**). Se trata de coumoxystrobin (**32**), pyraoxystrobin (**33**) y pyrametrostobin (**34**). Coumoxystrobin es la primera estrobilurina sintética en incorporar un resto cumarina en la estructura (Liu *et al.*, 2007a), mientras que las otras dos están inspiradas en elementos comunes de azoxystrobin y pyraclostrobin.

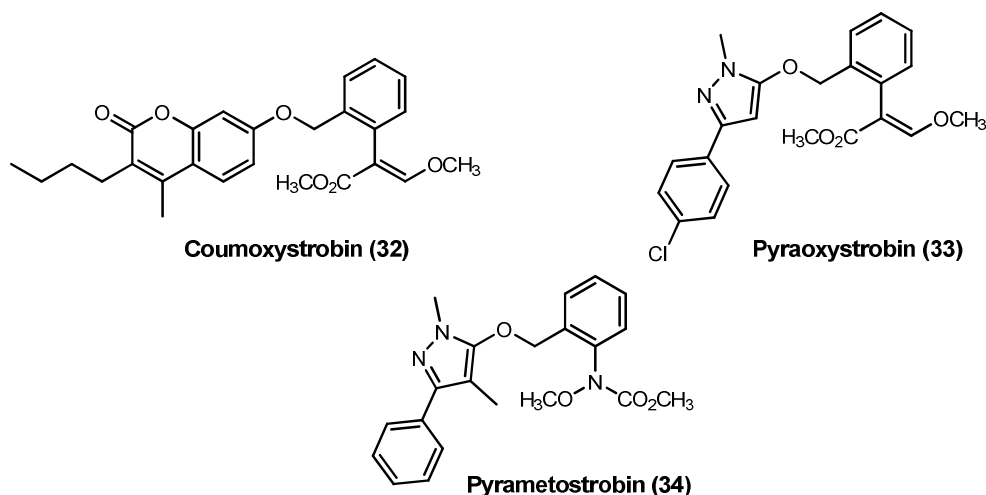


Figura 1.10. Fungicidas estrobilurínicos registrados en 2010 para su uso en China

Con estas tres últimas, actualmente asciende a trece el número de estrobilurinas sintéticas comerciales protegidas por patente, registradas y disponibles como fungicidas agroquímicos. Casi todas las principales compañías (Syngenta, BASF, Bayer, SYRYCI, DuPont, etc.) han participado en proyectos de I + D para la obtención de estrobilurinas y han tenido éxito tras la búsqueda entre más de 70.000 moléculas sintetizadas, habiéndose generado más de 500 patentes. A pesar de ello, el trabajo de investigación para el perfeccionamiento y lanzamiento de nuevos fungicidas sigue muy activo. La filosofía sigue siendo la misma, mantener el grupo toxóforo de las estrobilurinas naturales (o bien sus diferentes variantes) e introducir nuevos sustituyentes que puedan mejorar sus propiedades.

El gran éxito logrado por las estrobilurinas es debido, además de a su innovador modo de acción y su variedad estructural, a su amplio espectro de aplicación. Este grupo de fungicidas ha mostrado ventajas significativas sobre otros compuestos por su excelente capacidad para aumentar el rendimiento de las cosechas, ya que son capaces de combatir efectivamente plagas causadas por todo tipo de hongos en cereales, arroz, césped, patatas, frutos secos y una amplísima variedad de frutas, verduras y hortalizas. Desde su comercialización en 1996, las ventas de estrobilurinas mostraron un crecimiento medio anual del 15,7% en los primeros cinco años, alcanzando los 1636 millones de dólares en 2007 (<http://www.agropages.com/BuyersGuide/category/Strobilurin-Fungicide->

Insight.html). No obstante, actualmente las ventas mundiales de estos nuevos fungicidas superan los 3000 millones de dólares.

A modo de conclusión, se puede afirmar que las estrobilurinas sintéticas se han convertido en una de las familias de fungicidas más útiles y necesarias para la explotación agraria a gran escala, habiendo sustituido a muchos de los fungicidas comerciales utilizados previamente.

1.2. Estrobilurinas oximinoacetatos

Dentro de la familia de las estrobilurinas sintéticas, kresoxim-methyl y trifloxystrobin pertenecen a la clase química de los oximinoacetatos. Hasta la fecha son las dos únicas estrobilurinas sintéticas que presentan como variante de grupo toxóforo la agrupación (*E*)-metoxi-(1-metoxiimino)-2-oxoetilo. En los apartados siguientes se detalla el descubrimiento, la síntesis y las propiedades generales de ambos fungicidas estrobilurínicos.

1.2.1. El descubrimiento de kresoxim-methyl

Kresoxim-methyl (**23**) fue descubierto de forma independiente por la empresa BASF al mismo tiempo que azoxystrobin por Syngenta. En 1983 los químicos de BASF iniciaron una serie de proyectos con el objetivo de desarrollar compuestos sintéticos que, manteniendo la actividad y modo de acción de las estrobilurinas naturales, no presentasen los problemas de inestabilidad de éstas. Así, el equipo de investigadores de BASF, encabezado por el Dr. Hubert Sauter, sintetizó más de 15.000 variantes de estrobilurinas con las cuales se llevaron a cabo infinidad de pruebas para ver si presentaban las características idóneas para ser usados como fungicidas. Tras 13 años de laboriosos trabajos de investigación y desarrollo, en 1992 BASF anunció en la Conferencia Británica de Protección de Cultivos su primer fungicida perteneciente a esta nueva clase de ingredientes activos, en un principio desarrollado bajo el código número BAS490F, al que más tarde se le dio el nombre común de kresoxim-methyl (KM).

De la enorme variedad de estrobilurinas sintetizadas, las que fueron clave para conseguir desarrollar KM se muestran en la **Figura 1.11** (Sauter *et al.*, 1999; Bartlett *et al.*, 2002).

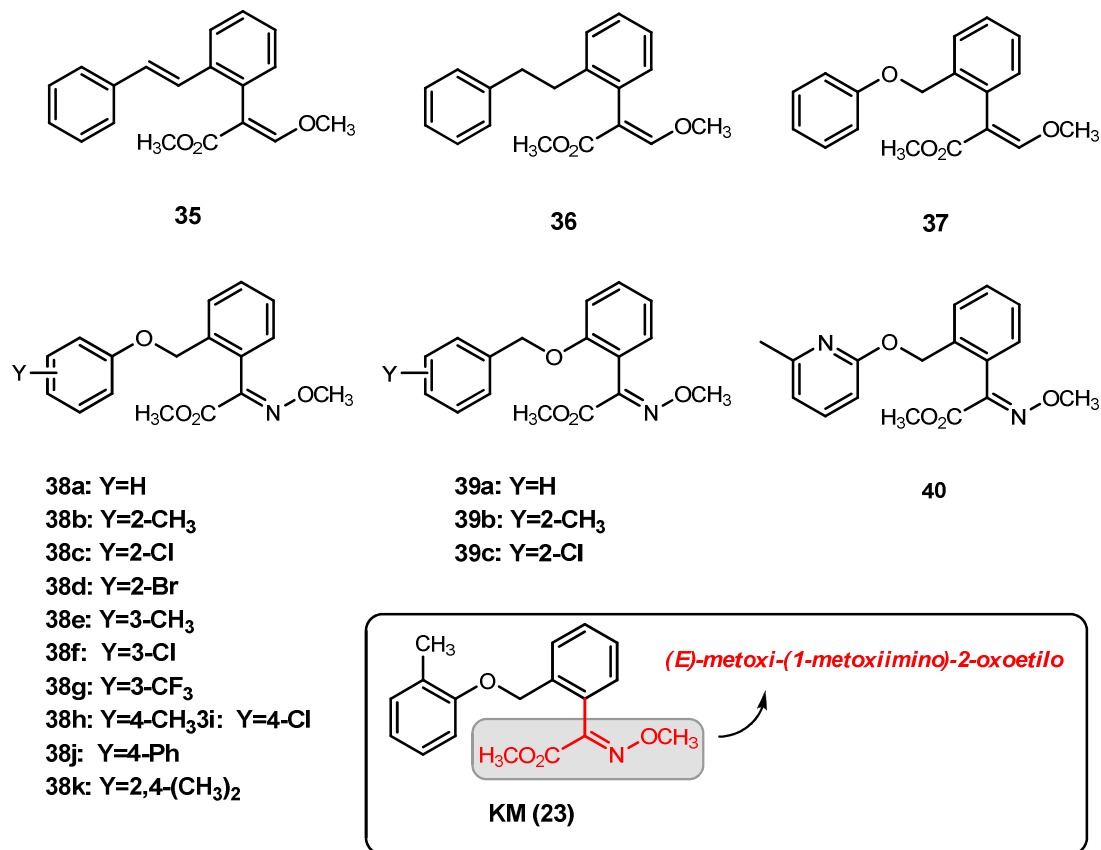


Figura 1.11. Análogos clave en el descubrimiento de KM

En un principio se tomó la estrobilurina A (**1**) como modelo, intentando reproducir su actividad antibiótica, pero ganando en estabilidad y propiedades de distribución en plantas. El primer paso radicaba en eliminar el sistema poliénico, ya que era el principal causante de la inestabilidad fotoquímica. En este sentido, se descubrió que el enlace (*Z*)-olefínico de la estrobilurina A podía ser sustituido por un anillo de benceno *orto*-disustituido para dar el estilbeno **35**, que es mucho menos volátil y más estable a la luz que la estrobilurina natural. Sin embargo, siendo activo frente a hongos en invernadero, este compuesto todavía se degradaba demasiado rápidamente en presencia de luz solar como para poder ser utilizado en campo. Modificaciones sobre **35**, llevaron a los análogos **36** y **37**. Tanto el análogo reducido **36** como el isostérico éter bencílico **37** retenían la actividad fungicida. Llegados a este

punto, el camino hasta el logro de KM fue largo y difícil, en parte porque las primeras patentes alegando estrobilurinas sintéticas que contienen el grupo natural (*E*)-3-metoxiacrilato de metilo fueron presentadas por Syngenta para azoxystrobin (**22**) siete meses antes que la primera estrobilurina patentada por BASF, lo que bloqueó las actividades de investigación de BASF en torno a la naturaleza del toxóforo.

El equipo de BASF eligió como única salida realista modificar el grupo toxóforo, para así poder sortear las reivindicaciones patentadas por Syngenta. El grupo toxóforo es el principal causante de la actividad fungicida en esta clase de sustancias, por lo que cualquier modificación del mismo siempre conlleva un riesgo muy alto ya que puede dar lugar a una drástica pérdida de actividad. Finalmente, el equipo de BASF se embarcó en la tarea de sustituir el grupo éter vinílico del toxóforo por una agrupación alcoxi-imino. Se preservó la configuración *E* del doble enlace, ya que se sabía, por ensayos previos, que los análogos que presentaban la configuración *Z* eran inactivos. Los primeros representantes de estas nuevas estructuras fueron los compuestos **38a** y **39a**, que dieron unos resultados excelentes, tanto en las pruebas realizadas *in vitro* como en invernadero, confirmando el alto potencial biocida de estas estructuras con la agrupación metoxi-imino. Además se comprobó que los derivados tipo **38** eran, en promedio, alrededor de diez veces más activos que los correspondientes regioisómeros **39**. Se llevaron a cabo también una serie de comparaciones entre pares de análogos con la misma estructura pero diferente toxóforo, éter vinílico vs alcoxi-imino, que permitieron comprobar que no existía diferencia de actividad entre unos compuestos y otros. Por lo tanto, tras seleccionar diez variantes de **38** (**38b–38k**), además del heterociclo **40**, se procedió a realizar pruebas de campo. Todos presentaron actividad en mayor o menor grado, en especial contra el mildiu de los cereales, pero también hacia otras infecciones como la mancha parda del trigo. De todas las sustancias activas de tipo **38**, el compuesto **38b** (KM) resultó extraordinariamente eficaz, por lo que fue seleccionado como candidato, debido a que representaba una combinación óptima de alto rendimiento junto con perspectivas favorables para poder llevar a cabo una síntesis comercial rentable. Una elección que con el tiempo se ha demostrado que fue un acierto.

1.2.1.1. Propiedades de kresoxim–methyl

La marcada actividad fungicida de KM se debe, como en todas las estrobilurinas, a la inhibición de la respiración mitocondrial de hongos (**apartado 1.1**). Se emplea sobre una gran variedad de cultivos como agente preventivo, curativo y/o erradicante. Su función principal en el control de enfermedades es proporcionar protección contra una gran variedad de hongos patógenos en plantas. Además, inhibe fuertemente la germinación de esporas, reduciendo así la infección y la propagación del agente patógeno, siendo también capaz de controlar infecciones avanzadas (Ypema y Gold, 1999).

KM posee propiedades biocinéticas y físicas que son la base de su especificidad frente a los agentes patógenos. A temperatura ambiente es un sólido blanco cristalino con un punto de fusión de 102 °C que se descompone a partir de 310 °C. Presenta una baja presión de vapor (1.72×10^{-8} mmHg, a 20 °C), por lo que se considera no volátil en condiciones de campo, una baja solubilidad en agua (2 mg/L a 20 °C) y es soluble en la mayoría de disolventes orgánicos, especialmente en diclorometano (939 g/L a 20 °C). Además, también presenta una lipofilia relativamente alta ($\log P_{ow} = 3.5$ a 25 °C) por lo que tiene una gran afinidad por las superficies cerosas de las plantas. Posee un máximo de absorción UV/Vis a 204 nm y una elevada fotoestabilidad ($DT_{50} = 30$ días) (EC, 1998).

En cuanto a sus propiedades de distribución, KM es activo en fase gaseosa y, además de actuar por contacto en la zona en la que se aplica, posee acción translaminar y se extiende sobre la superficie de las hojas, aunque es absorbido por las plantas en una proporción relativamente baja. Presenta un amplio espectro de actividad fungicida y al igual que pyraclostrobin (**27**) tiene un modo de acción no sistémico. Sin embargo, aunque sus propiedades biocinéticas evitan el transporte dentro de la planta, su difusión en fase gas hace que adquiera una movilidad casi sistémica (Ypema y Gold, 1999).

Hoy en día está siendo usado, bien solo o en combinación con otros fungicidas, en más de 40 tipos de cultivos diferentes, tales como cereales, cítricos, uva, mango, plantas ornamentales, frutas de pepita, fresas, hortalizas, etc. Comercialmente, y como único ingrediente activo, se distribuye bajo los

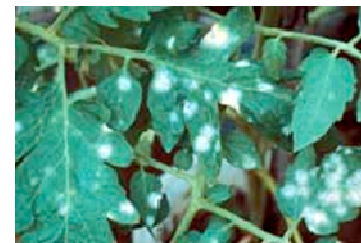
nombres Alliage, Candit, Cygnus, Discus, Kenbyo, Stroby SC y Stroby WG, todos ellos de BASF. Aunque se usa para el tratamiento de los cuatro grandes grupos de hongos patógenos en plantas (Balba, 2007), KM es particularmente eficaz frente a enfermedades causadas por ascomicetos como son las siguientes:

Ascomicetos

Sarna del manzano (*Venturia inaequalis*)
 Oídio del manzano (*Podosphaera leucotricha*)
 Oídio del tomate (*Leveillula taurica*)
 Mancha de hollín del manzano (*Gloeodes pomigena*)
 Podredumbre gris en fresas (*Botrytis cinerea*)
 Sarna en pepinos (*Venturia inaequalis*)
 Sarna del peral (*Venturia pirina*)
 Oídio de la vid (*Uncinula necator*)
 Podredumbre negra de la vid (*Guignardia bidwelli*)
 Oídio de los cereales (*Erys iphegraminis*)
 Oídio de la lechuga (*Erysiphe cichoracearum*)
 Oídio de la cereza (*Podosphaera clandestina*)



Sarna del manzano



Oídio del tomate

KM está considerado como un plaguicida de bajo riesgo. Presenta una muy baja toxicidad en ratas y ratones tanto oral ($LD_{50} > 5000$ mg/kg) como dérmica ($LD_{50} > 2000$ mg/kg), no irrita la piel ni los ojos y no es sensibilizante. Estudios de toxicidad crónica muestran que tampoco es neurotóxico, mutagénico ni genotóxico, aunque causa tumores hepáticos en ratas a dosis elevadas. Además de su baja toxicidad en mamíferos, tampoco es tóxico para aves ni para especies beneficiosas como abejas, lombrices, escarabajos o ácaros depredadores (EPA, 1998; APVMA, 2000; EFSA, 2010a).

Sin embargo, es altamente tóxico para organismos acuáticos, tales como peces ($LC_{50} = 150$ µg/L), invertebrados acuáticos ($EC_{50} = 186$ µg/L) y algas ($EC_{50} = 24$ µg/L). Como consecuencia, estudios recientes han demostrado que presenta una elevada capacidad para alterar sistemas acuáticos a muy baja concentración. Su alta toxicidad sobre invertebrados acuáticos de gran importancia ecológica como *Daphnia magna* disminuye su población y afecta

directamente a la composición del zooplancton y fitoplancton, pudiendo provocar desajustes en la cadena alimentaria en ecosistemas próximos a zonas agrícolas (EFSA, 2010a). No obstante, estudios de adsorción/desorción y filtración han demostrado que presenta una baja movilidad en suelos ($K_{OC} = 150\text{--}500$) y una baja capacidad de filtración, por lo que se considera poco probable que pase a las aguas subterráneas y llegue a estar presente en ecosistemas acuáticos (EPA, 1998; APVMA, 2000a).

En cuanto a su estabilidad, KM es bastante estable a la hidrólisis bajo condiciones ácidas (a pH 5 $DT_{50} = 875$ días), relativamente estable a pH neutro ($DT_{50} = 34$ días) y muy susceptible a la hidrólisis a pH alcalino ($DT_{50} = 7$ horas) (EC, 1998). Las principales vías de degradación son la hidrólisis, el metabolismo y la lixiviación (EPA, 1998).

Estudios en campo han confirmado que KM se disipa rápidamente en suelos ($DT_{50} < 4$ días), apareciendo únicamente cuatro productos de transformación significativos (**Figura 1.12**). Mediante biodegradación se produce el ácido carboxílico **41**, que procede de la hidrólisis del éster metílico de KM. Se trata del principal metabolito en suelos, agua y plantas. El ácido **41** sufre hidroxilación y oxidación dando lugar a los otros tres metabolitos conjugados con glucósidos (Roberts y Hutson, 1998).

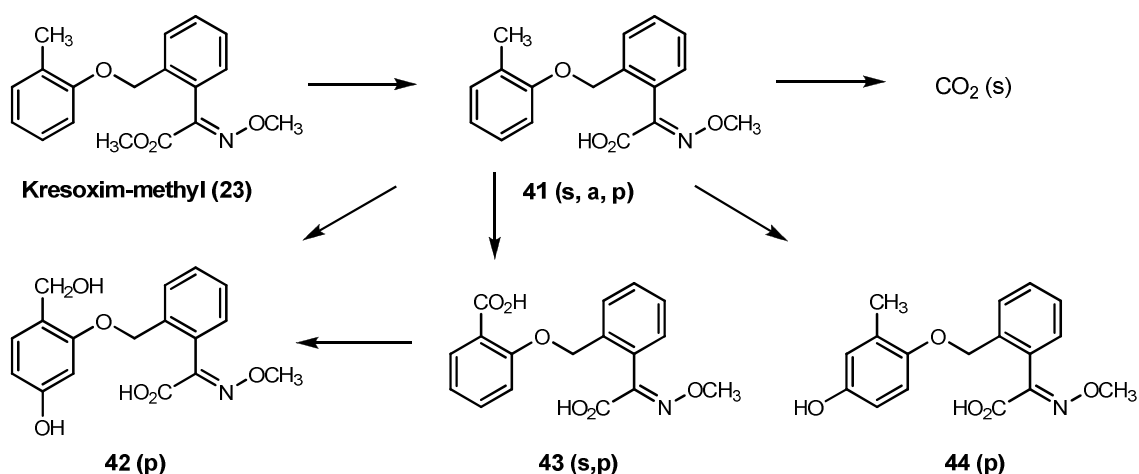


Figura 1.12. Degradación de KM en suelos (s), agua (a) y plantas (p)

No obstante, tras estudiar el metabolismo de KM en diferentes cultivos, se observó que el residuo predominante era el propio fungicida, encontrándose

que los metabolitos estaban presentes sólo en pequeña proporción, por debajo del 10% en todos los casos. Estos productos de degradación son mucho más polares y solubles en agua que KM, por lo que tienen una mayor movilidad en suelos. No obstante, son menos tóxicos para los organismos acuáticos y, además, cuando pasan a los sistemas acuáticos se descomponen por fotólisis, dando subproductos que no suponen un riesgo destacable (EFSA, 2010a). Otro producto que suele encontrarse junto a KM es el isómero *Z* del grupo 2-metoxi-1-(metoxiimino)-2-oxoetilo, normalmente de forma minoritaria (no más del 5%), fruto del reordenamiento fotoquímico del doble enlace (Roberts y Hutson, 1998). Por lo tanto, la UE propuso como definición de residuos de KM en alimentos de origen vegetal solamente al compuesto parental (JMPR, 2001).

El metabolismo de KM en animales es más complejo, ya que se han identificado hasta 34 subproductos en heces y orina de ratas (JMPR, 1998). Sin embargo, a diferencia de las plantas, en los animales KM se metaboliza casi en su totalidad, encontrándose los productos de degradación en mayor proporción que el propio fungicida. Dentro de este contexto, particularmente destacan el ácido **41** y el compuesto hidroxilado **44**; tanto es así que la legislación europea (**Reglamento No 396/2005**) los incluyó en la definición de residuo en alimentos de origen animal para ser cuantificados junto con KM.

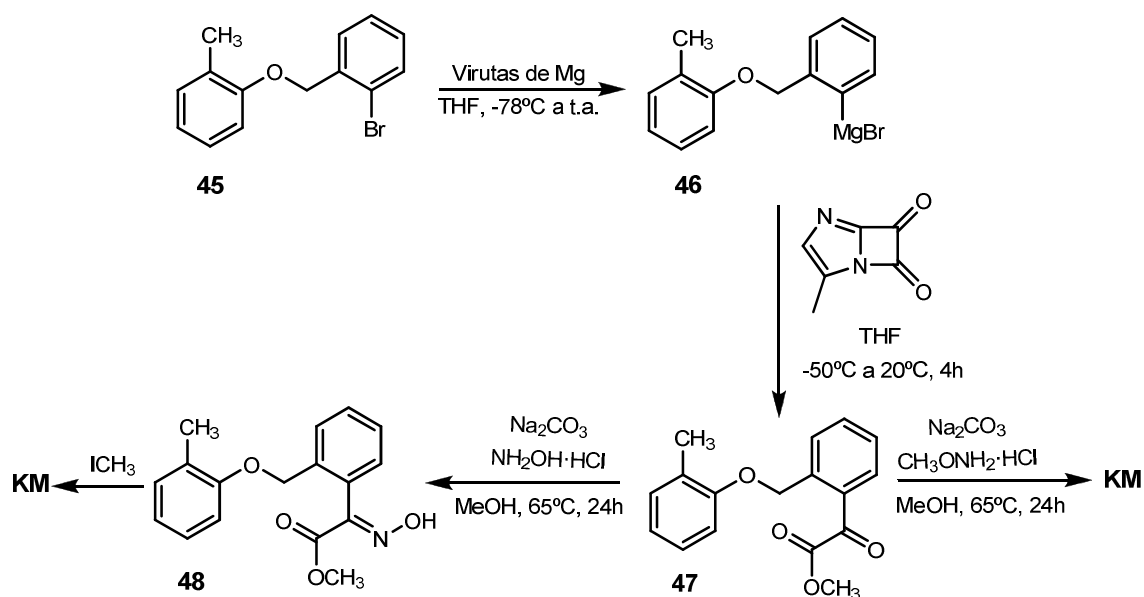
1.2.1.2. Síntesis de kresoxim-methyl

Desde que KM salió al mercado y fue patentada su síntesis, se han publicado diferentes aproximaciones sintéticas, algunas de ellas también patentadas.

La primera ruta para la síntesis de compuestos que contienen la agrupación metoxi-imino en el grupo toxóforo, entre las que se encuentra KM, fue descrita por Wenderoth y colaboradores en 1988 y patentada en 1989 (US04829085) (**Esquema 1.1**). En particular, la incorporación de la agrupación (*E*)-metoxi-(1-metoxiimino)-2-oxoetilo (grupo toxóforo) se lleva a cabo en varias etapas. En primer lugar se genera el reactivo Grignard **46** por reacción del bromuro arílico **45** con magnesio. La reacción del magnesiano con

metiloxalilimidazol proporciona el α -cetoéster **47**, a partir del que se completa el grupo toxóforo, ya sea directamente por condensación con clorhidrato de *o*-metilhidroxilamina o en dos etapas, primero condensación con hidroxilamina, seguido de *O*-metilación de la oxima obtenida con un agente alquilante adecuado, como por ejemplo ioduro de metilo.

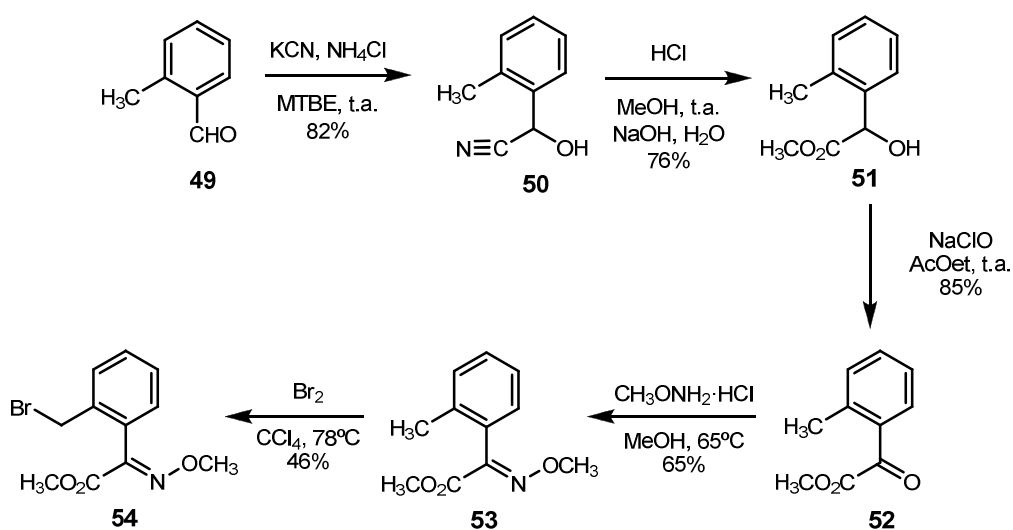
Tanto en la formación de la agrupación metoxi-(1-metoxiimino)-2-oxoetilo como en la metoxi-(1-hidroxiimino)-2-oxoetilo se obtienen mezclas de isómeros *E/Z*, que pueden separarse usando procedimientos convencionales, como cristalización o cromatografía en columna. Esta estrategia sintética ha sido utilizada por otros autores para la preparación de compuestos análogos a las estrobilurinas con agrupaciones metoxi-imínicas en el grupo toxóforo (Wingert y Keil, 1998).



Esquema 1.1

Unos años más tarde, en 1992, de nuevo Wenderoth y otros describieron y patentaron la primera ruta para la síntesis del anillo del toxóforo a partir del 2-metilbenzaldehído (Wenderoth *et al.*, 1992; Takuma *et al.*, 1999) (**Esquema 1.2**). Primero, el 2-metilbenzaldehído (**49**) se transforma en la cianohidrina del 2-metilbenzaldehído (**50**) usando cianuro potásico. La siguiente etapa implica la transformación de **50** en el 2-metilmandelato de

metilo **51**, el cual es oxidado al correspondiente α -cetoéster **52** con hipoclorito de sodio.

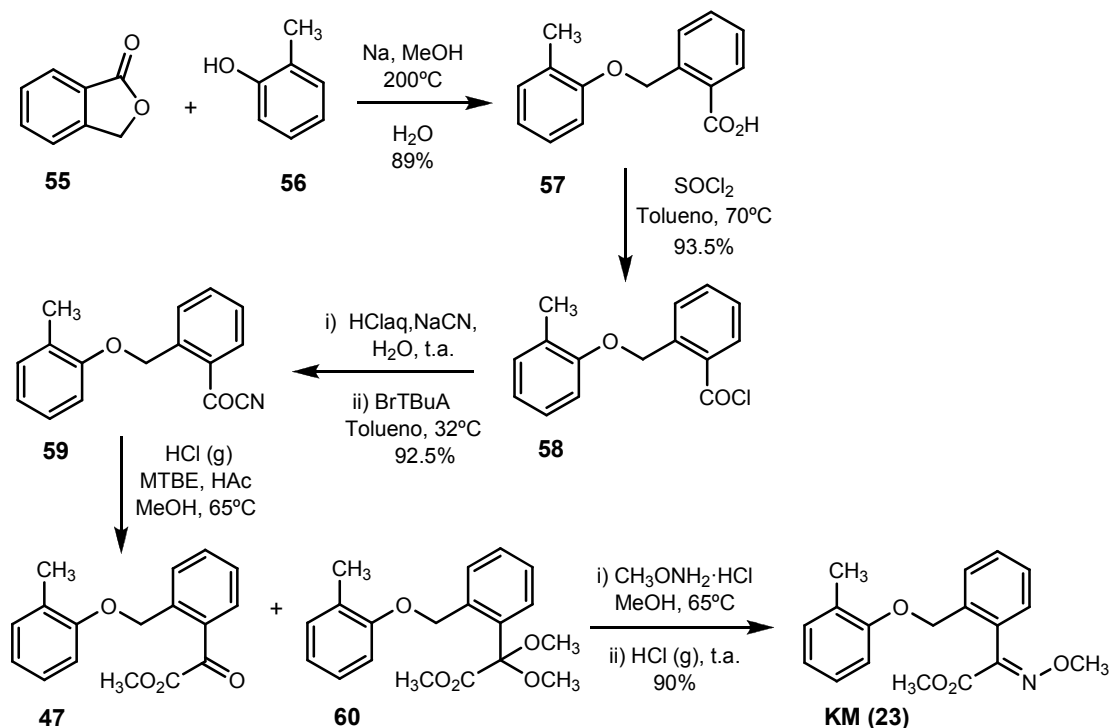


Esquema 1.2

Tras la condensación de **52** con clorhidrato de *o*-metilhidroxilamina se llega al intermedio **53**, obtenido también como una mezcla de isómeros *E/Z*, en la que predomina el isómero *E* que se separa del *Z* por cristalización. Finalmente el intermedio **54** (anillo del toxóforo), se obtiene mediante bromación radicalaria promovida fotoquímicamente. A partir de este intermedio, se completa la estructura de KM mediante una alquilación de Williamson con *o*-cresol (**56**).

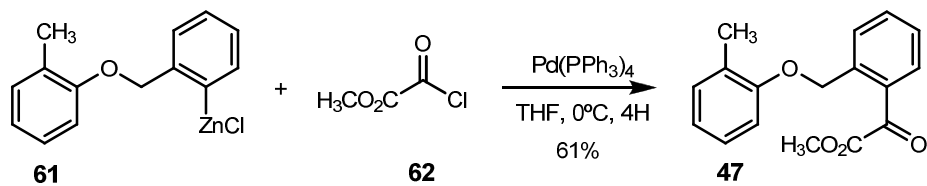
Con el objetivo de incrementar el porcentaje de isómero *E* obtenido en la síntesis, Wingert y otros autores, idearon y patentaron una nueva ruta sintética en la que se evita la etapa de separación de isómeros (**Esquema 1.3**). Inicialmente el *o*-cresol **56** es convertido en presencia de metóxido sódico en el correspondiente cresolato sódico, el cual, tras reaccionar con la lactona **55** a elevada temperatura, proporciona el derivado ácido benzoico **57**. La posterior transformación de **57** en el nitrilo de benzoílo **59**, vía el correspondiente cloruro, y subsiguiente reacción de Pinner, proporciona el α -cetoéster **47** y el acetal **60** como producto secundario. La condensación del α -cetoéster con clorhidrato de *o*-metilhidroxilamina proporciona una mezcla de isómeros *E/Z* que, tras tratamiento con cloruro de hidrógeno, transforma el isómero *Z* en *E*, proporcionando KM (**23**) de una forma más eficaz, al evitarse la etapa de

separación de isómeros (Wingert *et al.*, 1990 y 1993; Isak *et al.*, 1994; Grammenos *et al.*, 1995; Takase *et al.*, 1996).



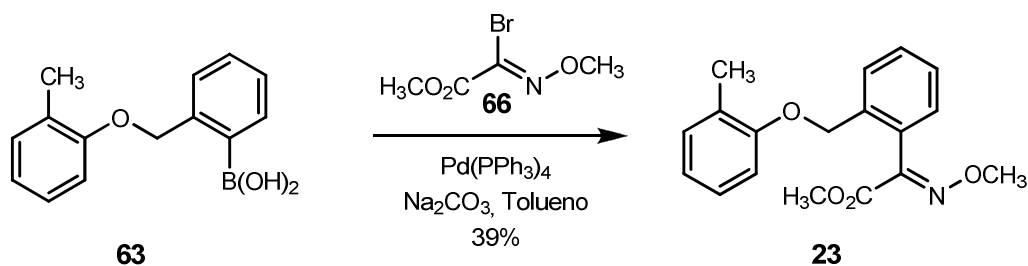
Esquema 1.3

La preparación del α -cetoéster **47** también puede llevarse a cabo por reacciones de acoplamiento cruzado catalizadas por paladio, tipo Negishi, entre arilorganozincatos con cloruro de metiloxalilo (**62**) (Rossi *et al.*, 1999) (**Esquema 1.4**).



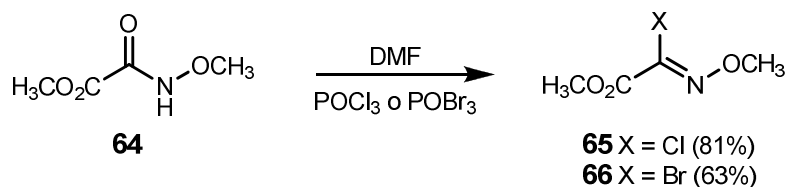
Esquema 1.4

Finalmente, la agrupación (*E*)-metoxi-(1-metoxiimino)-2-oxoetilo puede introducirse como una unidad completa y en un solo paso mediante acoplamiento cruzado catalizado por paladio (**Esquema 1.5**).



Esquema 1.5

Así, con el fragmento organometálico sobre el anillo aromático (**63**) se han descrito acoplamiento tipo Suzuki–Miyaura (Ziegler *et al.*, 1995 y 1998) entre ácidos borónicos, tanto con el (*Z*)-2-bromo-2-(metoxiimino)acetato de metilo (**66**) (mayor rendimiento) como con el (*Z*)-2-cloro-2-(metoxiimino)acetato de metilo (**65**), ambos preparados previamente a partir del 2-(metoxiamino)-2-oxoacetato de metilo (**64**) por reacción con agentes de halogenación, tales como POBr₃ o POCl₃ (**Esquema 1.6**). También han sido descritos acoplamiento del mismo tipo entre ácidos o ésteres borónicos, [ArB(OH)₂ y ArB(OR)₂, respectivamente], con cloruros o bromuros de cetoésteres (MeO₂CCOX, X = Cl o Br) para preparar diferentes compuestos similares a **47** (Gooßen, 2001).



Esquema 1.6

1.2.2. El descubrimiento de trifloxystrobin

Desde que Syngenta (azoxystrobin) y BASF (kresoxim–methyl) patentaron sus fungicidas estrobilurínicos, otras empresas de productos agroquímicos comenzaron sus propios programas de investigación, que más tarde les permitió la comercialización de nuevos fungicidas de este tipo. De entre todas ellas, Novartis Crop Protection (actualmente Syngenta) descubrió y desarrolló trifloxystrobin (EP00460575), que fue presentado en la conferencia británica en

1998, aunque posteriormente fue comercializado por Bayer (Margot *et al.*, 1998).

El grupo de científicos de Novartis dirigidos por el Dr. R. Maag tomaron de nuevo como punto de partida la estructura de la estrobilurina A (Ziegler *et al.*, 2003) con el objetivo de realizar modificaciones en ella que hasta la fecha no hubiesen sido realizadas por otras empresas agroquímicas. Así, en 1988 desarrollaron una serie de compuestos que presentaban una nueva cadena lateral de naturaleza oximínica (**Figura 1.13**). La combinación de dos sustituyentes, $R^1 =$ metilo y $R^2 =$ fenilo sustituido, presentó la mayor eficacia fungicida. Además, los compuestos que contenían como sustituyente aromático el grupo trifluorometilo mostraron una fuerte actividad sistémica en los ensayos realizados en invernadero.

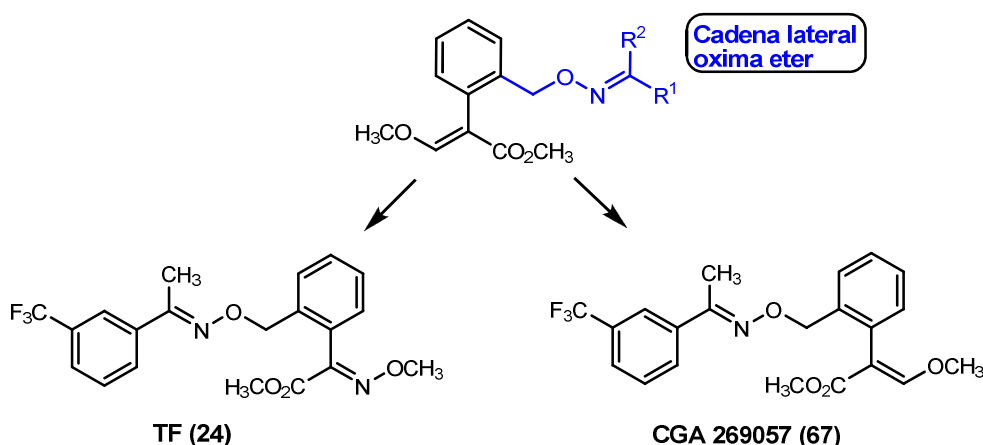


Figura 1.13. Análogos clave en el descubrimiento de trifloxystrobin

El primer fungicida de esta nueva clase de estrobilurinas sintéticas denominado con el código CGA 269057, presentaba, además de la novedosa cadena lateral, el grupo (*E*)-3-metoxiacrilato de metilo como toxóforo. Su patente fue presentada en diciembre de 1988. Las pruebas realizadas con **67**, tanto en invernadero como en ensayos de campo, mostraron las excelentes propiedades de este nuevo fungicida para contrarrestar enfermedades fúngicas en cereales, frutas y vides. Sin embargo, por problemas de derechos de patentes, CGA 269057 no se desarrolló comercialmente (Sauter *et al.*, 1999; Ziegler *et al.*, 2003). Al igual que había ocurrido anteriormente con BASF, la única alternativa que le quedó a Novartis fue modificar el grupo toxóforo. En

ese momento ya se conocía que cambiar el grupo enol éter del toxóforo por una agrupación alcoxi-imínica no producía cambios de actividad fungicida. El equipo de Novartis optó por introducir dicha modificación preservando la configuración *E* del doble enlace, y logró presentar en Junio de 1990 una nueva solicitud de patente para CGA 279202, al que más tarde se le dio el nombre común de trifloxystrobin (TF).

1.2.2.1. Propiedades de trifloxystrobin

TF, al igual que KM, pertenece al grupo de estrobilurinas oximinoacetatos. Además de ser un agente preventivo, posee cierta actividad curativa contra los patógenos que se encuentran en la superficie de las hojas, siendo un potente inhibidor de la germinación de las esporas y del crecimiento del micelio (Balba, 2007).

Desde el punto de vista fisicoquímico, TF a temperatura ambiente es un sólido blanco inodoro con un punto de fusión de 72.9 °C y un punto de ebullición aproximadamente de 312 °C que se descompone a partir de 285 °C. No es volátil (2.55×10^{-8} mmHg a 25 °C) y presenta la menor solubilidad en agua de todas las estrobilurinas sintéticas (0.61 mg/L a 25 °C), siendo soluble en la mayoría de disolventes orgánicos, especialmente en acetona, diclorometano y acetato de etilo (> 500 g/L a 25 °C). Comparado con KM, TF es más lipofílico ($\log P_{ow} = 4.5$ a 25 °C), por lo que está considerado un plaguicida con cierta capacidad de bioacumulación. Presenta un máximo de absorción UV/Vis a 250.7 nm con un coeficiente de extinción molar de $17500 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (metanol). TF es relativamente estable a la hidrólisis bajo condiciones neutras y ácidas, si bien a pH alcalino se hidroliza rápidamente ($DT_{50} = 27.1$ horas). Además, es fotolíticamente inestable (DT_{50} de 1.1 a 1.7 días a pH 5 y 7) (Sauter *et al.*, 1999; EC, 2003; Ziegler *et al.*, 2003; JMPR, 2004).

En cuanto a sus propiedades de distribución, TF es un fungicida mesosistémico que presenta un amplio espectro de actividad, empleándose para combatir plagas causadas por hongos en gran variedad de cultivos, como por ejemplo en plátanos, cereales, cítricos, café, maíz, algodón, uvas, nueces, arroz, patatas, frutas de pepita, té, frutas tropicales, césped, hortalizas, etc. Al igual que el resto de fungicidas estrobilurínicos, se usa para el tratamiento de

los cuatro grandes grupos de hongos patógenos en plantas: ascomicetos, basidiomicetos, deuteromicetos y oomicetos (Bartlett *et al.*, 2002.; Balba, 2007).

TF ha sido registrado en más de 80 países, ya sea en mezclas con otros fungicidas o como único ingrediente activo, distribuyéndose bajo los nombres comerciales Flint, Delaro, Madison, Nativo, Sphere, Tega, Gem, Twist y Zato, todos ellos de Bayer.

En cuanto a su toxicidad, cabe decir que TF no es tóxico para mamíferos ($LD_{50} > 5000$ mg/kg), aves ($LD_{50} > 2000$ mg/kg), abejas ($LD_{50} > 200$ µg/abeja), organismos terrestres (lombrices $LC_{50} > 1000$ mg/kg suelo) y algunas plantas. No irrita la piel y los ojos, aunque sí que puede causar sensibilización. Estudios de toxicidad crónica demuestran que tampoco es cancerígeno, genotóxico, neurotóxico, ni produce efectos sobre el sistema endocrino. Sin embargo, incluso a bajas concentraciones sí resulta tóxico para organismos acuáticos, tales como peces (LC_{50} de 0.520 a 0.015 mg/L dependiendo de la especie), invertebrados acuáticos (EC_{50} de 0.31 a 0.07 mg/L dependiendo de la especie) y algas ($EC_{50} = 0.0053$ mg/L). No obstante, el riesgo para estos organismos puede ser clasificado como reducido, ya que se considera que tiene una baja capacidad de filtración en suelos (< 7.5 cm), por lo que es poco probable que llegue a estar presente en sistemas acuáticos. De hecho, TF ha sido reconocido como plaguicida de reducido riesgo por la EPA. El 15 de abril de 2003 la Unión Europea decidió incluir TF en la lista de ingredientes activos cuya aplicación está clasificada como de bajo riesgo (EPA, 1999; APVMA, 2000b; Ebeling *et al.*, 2003).

Estudios de disipación/acumulación de TF demuestran que presenta una vida media muy baja (de horas a días) ya que se disipa rápidamente en suelos, plantas y agua. La degradación en suelos se produce al menos a través de tres rutas diferentes: hidrólisis, metabolismo y fotólisis, siendo la presencia o ausencia de luz solar el principal factor que distingue los tres procesos. TF es una molécula con dos estereocentros. El isómero-*EE* (TF) es biológicamente activo, mientras que el resto de isómeros (*ZE*, *EZ* y *ZZ*) no muestran actividad fungicida destacable. Bajo la influencia de la luz solar se produce la isomerización fotolítica, dando lugar a los tres isómeros mencionados. Sin

embargo, en ausencia de luz, la degradación comienza con la hidrólisis del éster metílico del grupo toxóforo de TF dando lugar al ácido carboxílico **71** (metabolito microbiano). Bajo condiciones de campo, los principales metabolitos en suelos son el ácido carboxílico **71** y su isómero-*ZE* (**72**), ya que el 49% y el 29%, respectivamente, de TF aplicado sobre los cultivos se degrada en forma de estos dos compuestos, mientras que el resto de isómeros están presentes en menor cantidad (**Figura 1.14**).

En general, en sistemas acuáticos y en plantas los principales compuestos de degradación coinciden con los metabolitos microbianos (**71** y **72**). Todos los metabolitos que posiblemente podrían presentarse en cantidades relevantes en el medio ambiente fueron evaluados ampliamente con respecto a sus propiedades toxicológicas, ecotoxicológicas y biológicas. Los resultados demostraron que todos los productos de degradación son menos tóxicos que TF para los organismos acuáticos y, a pesar de presentar una mayor solubilidad en agua y mayor movilidad en suelos, no suponen un riesgo relevante (Ebeling *et al.*, 2003; Banerjee *et al.*, 2006).

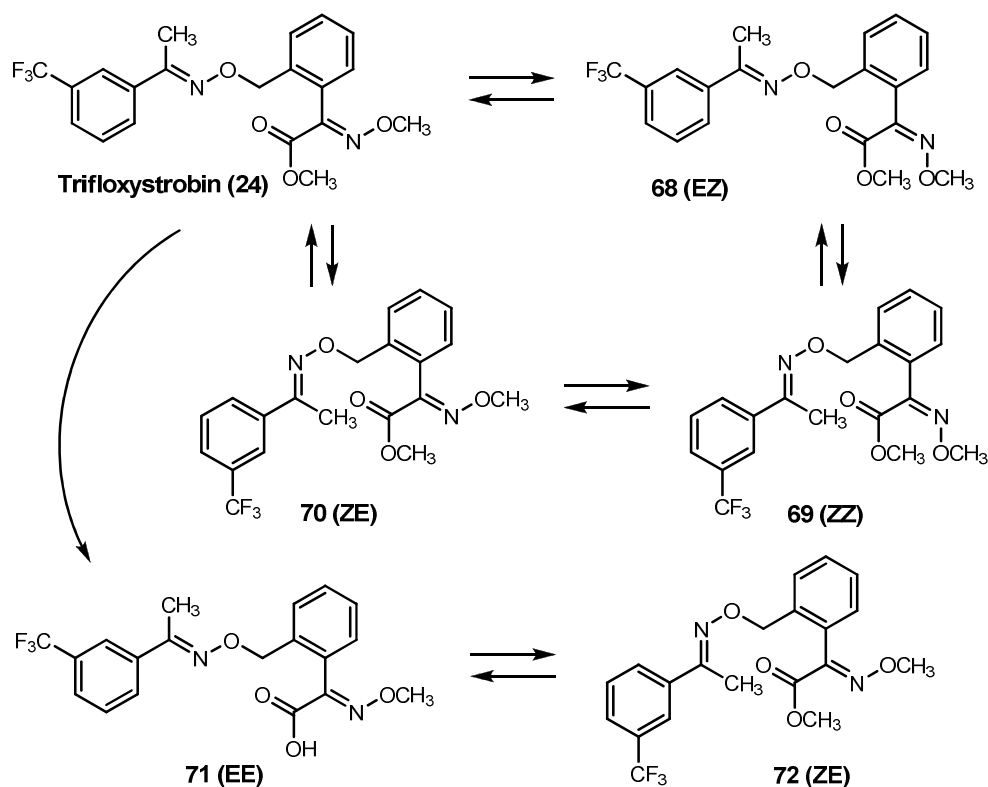


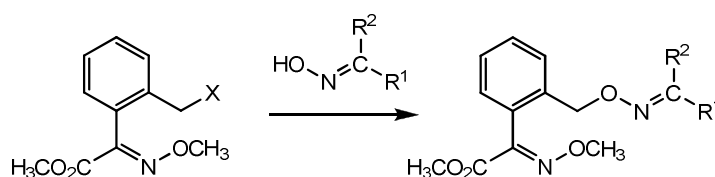
Figura 1.14. Principales metabolitos de TF en suelo, agua y plantas.

El metabolismo de TF en plantas es complejo, ya que se han identificado hasta 35 metabolitos en trigo, aunque los más relevantes son los tres isómeros geométricos y el derivado desmetilado **71**. Aun así, estos subproductos se encuentran en cantidades inferiores al 5%, siendo el residuo principal el propio fungicida (JMPR, 2004).

En cuanto al metabolismo en animales, cabe decir que también es complejo, habiéndose detectado hasta 27 metabolitos en la orina y heces de ratas, cabras y aves de corral. No obstante, el ácido carboxílico **71** es el principal componente excretado por animales (JMPR, 2004). Por ello, la UE (**Reglamento No 396/2005**) decidió incluir en la definición de residuo de TF solamente para alimentos de origen animal, además del ingrediente activo, el metabolito ácido **71**.

1.2.2.2. Síntesis de trifloxystrobin

La primera ruta sintética para TF fue diseñada por Isenring y Drechsel-Weiss en 1990. El procedimiento general para la obtención de esta nueva clase de sustancias activas se expone en el **Esquema 1.7**. Se caracteriza porque se hace reaccionar una oxima con un derivado del alcohol bencílico, en el que el grupo dissociable X, puede ser un halógeno o un grupo sulfonato. La reacción de sustitución nucleofílica se lleva a cabo en disolventes orgánicos inertes (THF, DMF, DMSO, etc.) y en presencia de bases adecuadas (NaH, Na₂CO₃, K₂CO₃, AgO, etc.).

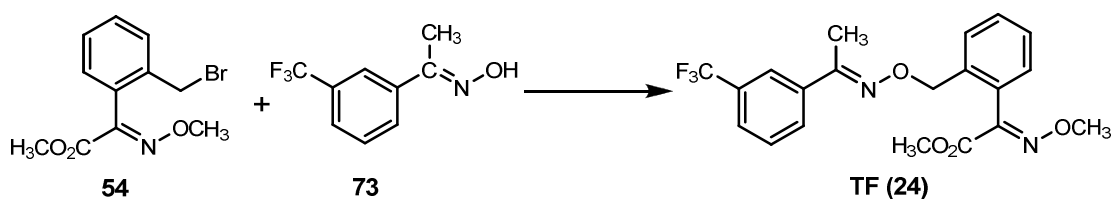


Esquema 1.7

Alternativamente, esta reacción puede llevarse a cabo bajo catálisis mediante transferencia de fase en un disolvente orgánico (CH₂Cl₂) y en presencia de una solución básica acuosa (NaOH) (Keller *et al.*, 1986 y 1987).

La reacción puede conducir a una mezcla de isómeros *E/Z*, los cuales se pueden separar por métodos cromatográficos o cristalización fraccionada.

En el caso concreto de TF, éste se obtiene por reacción del bromuro bencílico **54** con la oxima **73** (**Esquema 1.8**). Tanto la oxima **73** como el bromuro bencílico **54** pueden prepararse mediante métodos previamente descritos (De Fraine y Martín, 1989; Wenderoth *et al.*, 1989, 1990 y 1992; Wingert *et al.*, 1990 y 1993; Isak *et al.*, 1994; Grammenos *et al.*, 1995; Takase *et al.*, 1996).



Esquema 1.8

Desde entonces, se han descrito diferentes rutas sintéticas para la preparación de TF y de análogos, tanto en patentes (Pfifner y Trah, 1996; De Fraine *et al.*, 1997; Assercq *et al.*, 1998) como artículos (Pascual *et al.*, 2000; Uttley, 2009). De todas las estrategias propuestas, quizás la más relevante es la que se basa en reacciones de acoplamiento cruzado tipo Suzuki–Miyaura (Ziegler *et al.*, 1995 y 1998) o tipo Negishi (Rossi *et al.*, 1999; Gooßen, 2001), catalizadas por paladio. Como sucede en las síntesis análogas de KM, la importancia de este tipo de síntesis es que el grupo toxóforo se introduce como una unidad completa en un solo paso (ver **Esquemas 1.5**).

1.3. Residuos de plaguicidas en alimentos. Seguridad alimentaria

Hoy en día es un hecho que para obtener el mayor rendimiento en las cosechas y disponer de productos óptimos para el consumo en cortos periodos de tiempo, se requiere del uso constante e intensivo de productos agroquímicos. Dentro de estos tratamientos, el uso de plaguicidas es necesario para preservar los cultivos de plagas devastadoras y, de esta forma, conservar los productos en buen estado antes y/o después de la cosecha. Buena prueba

de ello es el consumo sostenido del uso de productos fitosanitarios registrados a nivel nacional durante las dos últimas décadas (**Figura 1.15**).

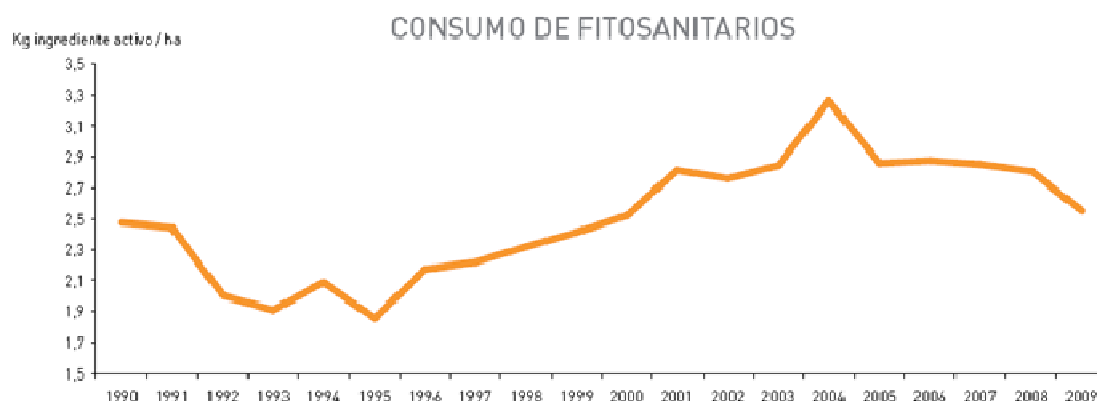


Figura 1.15. Evolución de la aplicación de plaguicidas en España en el periodo 1990–2009 (fuente: Perfil ambiental de España 2009, Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino).

Según AEPLA (Asociación Empresarial para la Protección de las Plantas), en el año 2010 se vendieron en España 93.000 toneladas de plaguicidas, lo que representó un volumen de negocio de 629 millones de euros y un incremento del 4.7% con respecto a 2009 (<http://www.aepla.es>). A nivel global, se estima que el mercado mundial de agroquímicos mueve anualmente alrededor de 40.000 millones de dólares, lo que se traduce en un consumo de más de 5 millones de toneladas de productos (CropLife International, <http://www.croplife.org>).

De acuerdo con estimaciones actuales, la población mundial pasará de 6 a 8 mil millones de personas en el año 2020. Si se asume que no es recomendable ni medioambientalmente sostenible incrementar la superficie cultivable, se espera que el uso de plaguicidas, lejos de descender, experimente un incremento en el futuro.

La normativa de los países miembros de la Unión Europea relativa a la comercialización de productos fitosanitarios se recoge en el **Reglamento (CE) Nº 1107/2009**. Según dicha normativa, actualmente existen 686 sustancias activas fitosanitarias, de las cuales 377 se han incluido en el anexo I como sustancias permitidas y 309 se han excluido por diversos motivos (MARM, 2012).

Los plaguicidas son por definición productos tóxicos en mayor o menor medida, y en consecuencia potencialmente peligrosos para el hombre y el medioambiente. Con el objetivo de conseguir mejores resultados, frecuentemente se abusa de los plaguicidas y no se respetan las dosis o el intervalo entre el tratamiento y la cosecha, con lo que la presencia de residuos en alimentos puede llegar a constituir un riesgo. Para los fines del Codex Alimentarius, se entiende por residuo de plaguicida *“cualquier sustancia especificada presente en alimentos, productos agrícolas o alimentos para animales como consecuencia del uso de un plaguicida”* (Codex Alimentarius, 2011). No obstante, a pesar de las implicaciones que suponen para la seguridad alimentaria, hoy en día no se puede prescindir de este tipo de compuestos dentro del modelo agrícola existente. Por ello, la solución es emplearlos de manera controlada, disponiendo de una legislación que regule las cantidades máximas de residuos que pueden estar presentes en un determinado alimento.

En este sentido, la Unión Europea se sitúa a la cabeza en la regulación del uso de plaguicidas mediante la puesta en marcha de una exigente legislación, cuyo fin fundamental es el de preservar el medioambiente y garantizar la salud animal y humana, a la par que permitir un desarrollo económico y social sostenible.

La andadura de la UE en materia de seguridad alimentaria se inició en 1978, año en el que entró en vigor la **Directiva de la Comisión Europea 79/117/CEE**, relativa a la prohibición de utilización y comercialización de productos fitosanitarios que presentaran determinadas sustancias activas. En 1991, con el objetivo de armonizar las diferentes normativas y autorizaciones de productos fitosanitarios en los Estados miembros en la Unión Europea, se estableció la **Directiva 91/414/CEE**, a través de la cual se regulaba la autorización de sustancias activas mediante su inclusión en una “lista positiva”, así como la comercialización de productos empleados para la protección vegetal cuya formulación incluía tales agroquímicos. Posteriormente, la Comisión Europea publicó en el año 2002 el «**Libro Blanco sobre Seguridad Alimentaria**». A partir de ese momento, se identificó la Seguridad Alimentaria como una de sus máximas prioridades y se estableció un programa de acción

legislativa basado en el concepto «de la granja a la mesa» («from farm to fork»). En él se recogen una serie de principios y medidas a llevar a cabo con el fin de coordinar e integrar un sistema de seguridad dirigido a lograr el máximo nivel posible de protección de la salud. En enero de 2002, el Parlamento Europeo y el Consejo publicó el **Reglamento (CE) 178/2002**, en el que se establecen los principios y los requisitos generales de la legislación alimentaria y se creó la **EFSA** (Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria), entre cuyas funciones destacan la recogida de datos sobre residuos de agroquímicos en alimentos en la UE, y la evaluación de la seguridad de los mismos, con el objetivo de emitir informes anuales donde se recojan los resultados de los programas de control de plaguicidas presentes en alimentos. Ese mismo año a nivel nacional también se creó la **AESA** (Agencia Española de Seguridad Alimentaria), que posteriormente pasó a llamarse **AESAN** (Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición). Por su parte, la **DG SANCO** (Dirección General de Sanidad y Consumidores) es el organismo ejecutivo encargado de garantizar el cumplimiento de la normativa europea por los diferentes gobiernos nacionales.

Actualmente, la **Directiva 79/117/CEE** y **91/414/CEE** han sido sustituidas por el **Reglamento (CE) N° 1107/2009**, en el cual se establecen las normas aplicables a la autorización de productos fitosanitarios en su presentación comercial, y a su comercialización, utilización y control en la Comunidad. Este Reglamento aumenta el nivel de protección sanitaria y medioambiental, contribuye a una mayor protección de la producción agrícola, y amplía y consolida el mercado único de productos fitosanitarios.

Atendiendo a la legislación vigente (**Reglamento (CE) N° 1107/2009**) el registro de un producto agroquímico en la UE está sujeto a una amplia evaluación a través de la cual se determina su toxicidad, sus propiedades fisicoquímicas, su impacto ambiental, su persistencia en el medio ambiente y su bioacumulación. Una vez aprobado su uso, se establece el límite máximo de residuos (LMR) de acuerdo con el **Reglamento (CE) N° 396/2005**, que representa la concentración máxima permitida legalmente en un producto particular (expresado en mg/kg), y cuyo objetivo fundamental es minimizar la exposición de los consumidores a los residuos del plaguicida, garantizando así

la protección de su salud, al tratarse de un valor toxicológicamente aceptable (Nasreddine y Parent–Massin, 2002).

En un principio, las autoridades competentes de cada país fijaban para cada producto el LMR. Sin embargo, el objetivo fundamental del **Reglamento 396/2005** fue el de promover la armonización de los LMR para todos los agroquímicos autorizados en la UE, lo que además de garantizar en mayor medida la seguridad de los consumidores, ha facilitado considerablemente el comercio entre los estados miembros. Los anexos a la regulación indican los LMR para cada compuesto en concreto y los productos sobre los cuales está permitida su aplicación, habiéndose establecido un límite por defecto de 0.01 mg/kg para aquellas sustancias no incluidas en tales anexos.

Los LMR se determinan de acuerdo con las denominadas **buenas prácticas agrícolas** (BPA). Según la definición de la FAO, las BPA son *“el conjunto de principios, normas y recomendaciones técnicas aplicables a la producción, procesado y transporte de alimentos de origen vegetal, con el objetivo de orientar los sistemas de producción hacia una agricultura sostenible y ecológicamente segura, la obtención de productos inocuos y de mayor calidad, y por lo tanto contribuir a la seguridad alimentaria”* (FAO, 2007). En lo que respecta al uso de agroquímicos, las BPA fomentan la selección de los plaguicidas adecuados en función de la plaga y el cultivo, el uso de productos fitosanitarios registrados, y la aplicación de las dosis recomendadas en los plazos establecidos. Una vez determinado el nivel de residuo que permanece en un producto vegetal tras la aplicación del plaguicida en función de las BPA a la concentración mínima efectiva, se establece el LMR definitivo. Por lo tanto, si se mantienen las BPA no deberían superarse los niveles máximos admitidos en los productos alimentarios, considerándose así adecuados para su consumo. Por el contrario, la determinación de residuos de plaguicidas por encima de los límites legales se considera un claro indicador del incumplimiento de estas prácticas.

A nivel europeo, según el último informe de la EFSA sobre seguridad alimentaria relativa al uso de plaguicidas, en el año 2009 fueron analizadas por los diferentes Estados Miembros de la UE (27) más Islandia y Noruega, un total de 67978 muestras en el marco de los programas europeos y nacionales de

control oficial. Este informe reveló que la tendencia hacia un mayor cumplimiento de la legislación sobre residuos de productos fitosanitarios en los alimentos sigue aumentando, de tal forma que de los 834 plaguicidas analizados en 300 tipos de alimentos diferentes, el 2.6% de las muestras no cumplían con dichos estándares de seguridad alimentaria (frente, por ejemplo, al 3.1% de 2008) y en el 40% de las mismas se detectaron uno o más plaguicidas por debajo o en el LMR (EFSA, 2011).

En cuanto a la situación de los residuos de plaguicidas en alimentos en nuestro país, el último informe nacional de AESAN en 2009 indica que de las 1568 muestras analizadas (entre el programa coordinado europeo y el nacional), un 33% de ellas contenían plaguicidas y solo un 1.5% estuvieron por encima de los LMRs (AESAN, 2009).

Los resultados obtenidos, tanto en Europa como en España, son bastante tranquilizadores ya que, si bien el número de muestras con residuos es considerable, las muestras que superan los LMRs y por tanto están fuera de la legalidad son pocas. Lo que sí aumenta año tras año es el número de residuos por alimento; a causa de ello, aunque cada plaguicida en la muestra se encuentre por debajo de los LMR, el contenido global en plaguicidas puede llegar a ser bastante elevado.

En conclusión, se puede afirmar que la presencia de residuos de plaguicidas en alimentos es evidente, sobre todo en los de origen vegetal, lo que confirma la necesidad de llevar a cabo este tipo de controles e incluso la conveniencia de reforzarlos para una mayor tranquilidad de los consumidores.

1.3.1. Kresoxim–methyl y trifloxystrobin: residuos en alimentos

Se estima que las ventas mundiales de KM y TF en el año 2010 alcanzaron los 400 y 450 millones de euros, respectivamente (Rallis India Ltd., 2011; Bayer, 2010), lo que da idea de la relevancia de estos fungicidas, por lo que no debería resultar sorprendente encontrar residuos de estos fitosanitarios en productos hortofrutícolas, máxime si no se han respetado las dosis o el intervalo de tiempo entre el tratamiento y la cosecha. De hecho, la presencia de KM y TF como residuos en alimentos, aunque moderada, ha ido aumentando

progresivamente con los años. Así, en el año 2006, de las 65810 muestras analizadas en los programas comunitarios de control de plaguicidas, solamente se detectaron residuos de KM en fresas y de TF en manzanas, en ambos casos siempre por debajo de los límites legales (EC, 2008). En 2007, de un total de 74305 muestras alimentarias, KM fue detectado a concentraciones iguales o inferiores al LMR en el 1.57% de las mismas (EFSA, 2009), mientras que no se encontraron residuos de TF en ninguna de las muestras. Por lo que respecta a 2008, de las 70143 muestras testadas, se detectaron residuos de KM y TF en zanahorias (0.08%; 0.10%), pepinos (0.5%; 0.23%) y peras (1.68%; 4.12%). Además, también se encontraron restos de TF en 14 (1.40%) de las 1003 muestras de naranjas analizadas (EFSA, 2010b). Finalmente, el último informe de EFSA, presentado en 2011, basado en los resultados obtenidos de los programas de vigilancia llevados a cabo en 2009 (EFSA, 2011), de las 67978 muestras analizadas, además de detectarse residuos de KM en plátanos (0.20%) y trigo (0.80%), y de TF en berenjenas (0.23%), se encontraron residuos de ambos en uvas de mesa (1.13%; 12.46%), coliflor (0.12%; 0.12%), guisantes (0.14%; 0.15%) y pimienta (0.55%; 1.25%). De hecho, TF ocupó el lugar 20 entre los plaguicidas más frecuentemente detectados. Estos datos reflejan la variedad de alimentos en los que se encuentran residuos de KM y/o TF en Europa, aunque, hasta la fecha, en unas cantidades que están por debajo de los límites máximos permitidos, límites que se han ido modificando y ajustando a cada producto a lo largo de los últimos años. Actualmente, los LMR permitidos por la normativa europea vigente (**Reg. EU No 813/2011**) para KM oscilan entre 0.02 y 1 ppm, y para TF entre 0.02 y 30 ppm, dependiendo del tipo de alimento (Pesticide EU–MLRs, 2011).

En consecuencia, disponer de métodos analíticos capaces de detectar y cuantificar, a niveles compatibles con los LMR más restrictivos, los dos fungicidas estrobilurínicos de estudio en muestras hortofrutícolas resulta absolutamente necesario para asegurar la inocuidad de los alimentos.

1.4. Métodos de análisis de plaguicidas

La gran variedad de plaguicidas, su amplio uso y la preocupación que genera la presencia de residuos en muestras alimentarias, conlleva la necesidad de disponer de metodologías analíticas fiables que permitan la determinación eficaz de estos residuos en diferentes matrices. En este sentido, los métodos más frecuentemente utilizados para la determinación de residuos de plaguicidas en alimentos son la cromatografía de gases (GC) y la cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC). La principal virtud de estos métodos es que permiten la determinación simultánea de gran número de plaguicidas en una misma muestra (método multiresiduo), y por ello son de gran utilidad en los programas oficiales de control de residuos (Mol *et al.*, 2008).

La GC es, sin duda, la técnica más habitual, y se emplea en combinación con diversos sistemas de detección tales como los detectores de nitrógeno y fósforo (NPD), los detectores fotométricos de llama (FPD), los de emisión atómica (AED), o de captura de electrones (ECD). En los últimos años, la utilización combinada de GC con detectores basados en espectrometría de masas (GC-MS) utilizada o bien con trampa de iones, en tándem (MS-MS) o acoplada a espectrometría de masas de triple cuadrupolo (QqQ) se ha convertido en la técnica de referencia para la determinación de residuos de plaguicidas (Santos y Galceran, 2002; Sandra *et al.*, 2003; Arrebola *et al.*, 2003; Zambonin *et al.*, 2004; Garrido Frenich *et al.*, 2007). Por otra parte, la HPLC, especialmente cuando se acopla a un espectrómetro de masas, ha ido ganando terreno en el análisis de plaguicidas, ya que permite la determinación selectiva y sensible de compuestos termolábiles, de alto peso molecular, poco volátiles y/o polares (Jansson *et al.*, 2004; Ferrer y Thurman, 2007).

A pesar de ser técnicas bien establecidas, altamente fiables, reproducibles y sensibles, los métodos cromatográficos no están exentos de inconvenientes y limitaciones. Este tipo de metodología analítica emplea instrumentación compleja de mantenimiento constante y de elevado coste, con frecuencia sólo disponible en determinados laboratorios dotados de personal altamente cualificado (Lee y Kennedy, 2001), todo lo cual finalmente redundaría en el precio

del análisis (Anklam *et al.*, 2002). Además, estos métodos requieren a menudo de una preparación laboriosa de la muestra, basada en una combinación de técnicas de extracción, purificación y preconcentración, con el objetivo de eliminar compuestos que puedan interferir en el análisis, disminuir la vida de la columna cromatográfica o afectar al detector, lo que en ocasiones alarga considerablemente el tiempo de análisis (Beyer y Biziuk, 2008). También es problemático el uso de grandes cantidades de disolventes orgánicos por su toxicidad, potencial contaminante y elevado precio.

En resumen, se puede afirmar que las distintas técnicas cromatográficas se caracterizan por ser métodos multiresiduo de gran fiabilidad que resultan imprescindibles en programas de vigilancia y control oficiales no dirigidos, pero cuyo coste es elevado y su capacidad analítica moderada.

1.4.1. Métodos de análisis de kresoxim–methyl y trifloxystrobin

El primer método para la detección de KM fue descrito por Cabras *et al.* en 1998, dos años después de su aparición en el mercado. En dicho estudio, además de KM, se determinaron también los fungicidas azoxystrobin, mepanipyrim y tetraconazole en muestras de uva, mosto y vino. Este método consistía en una primera etapa de extracción con acetona/hexano seguida de detección por GC–NPD y GC–MS, consiguiéndose un límite de cuantificación (LOQ) de 100 µg/kg.

En cuanto a TF, el primer método de determinación fue descrito en 2002 por Taylor y colaboradores. En el mismo, además de determinar TF, se determinaron otros 37 fungicidas más, entre ellos KM, en uvas, kiwis, limones, melocotones, nectarinas, espinacas y fresas. Consistía en una primera etapa de extracción con acetato de etilo, seguida de evaporación y redisolución en metanol, utilizando para el análisis cromatografía líquida combinada con espectrometría de masas en tándem con ionización por electrospray (HPLC–ESI–MS–MS).

Desde entonces hasta hoy se han desarrollado otros métodos en los que se determina KM y TF en muestras alimentarias, algunos de los cuales se muestran en la **Tabla 1.4.1**. La inmensa mayoría de trabajos tratan sobre métodos multiresiduo basados en técnicas cromatográficas en los que se determina KM y/o TF junto con un gran número de otros plaguicidas de todo tipo, a menudo cerca del centenar.

Tabla 1.4.1. Algunos de los métodos desarrollados para la determinación de kresoxim-methyl y trifloxystrobin en muestras alimentarias

Fungicida*	Matriz	Determinación	Referencia
KM*, TF* y AZ*	Cereales y fruta	GC-MS	Christensen y Granbi, 2001
KM y PM*	Uva, fresa y tomate	GC-MS	Navalón <i>et al.</i> , 2002
KM y otros	Manzana y naranja	GC-MS	Štajnbaher <i>et al.</i> , 2003
TF y AZ	Manzana	GC-ECD	Giza y Sztwiertnia, 2003
KM y otros	Naranja, frijol y fresa	LC-ESI-MS-MS	Soler <i>et al.</i> , 2004
KM, TF y otros	Alimentos bebés	LC-ESI-MS-MS	Sanino <i>et al.</i> , 2004
KM, TF y AZ	Uva y vino	HPLC-DAD	Abreu <i>et al.</i> , 2005
KM y otros	Manzana	GC-MS	Hercegová <i>et al.</i> 2006
KM y otros	Fresa	HPLC-MS	Rabolle <i>et al.</i> , 2006
KM	Pepino y suelos	GC-NPD	Wang <i>et al.</i> , 2007a
TF y otros	Tomate, uva y vino	GC-NPD-ECD	Likas <i>et al.</i> , 2007
KM, TF y otros	Vino	UPLC-MS-MS	Zhang <i>et al.</i> , 2009
KM y otros	Frutas y vegetales	GC-TOF-MS	Koesukwiwat <i>et al.</i> , 2010
TF y otros	Cereales	HPLC-MS-MS	Mastovska <i>et al.</i> , 2010

* PM (pyrimethanil); AZ (azoxystrobin)

Por otra parte, debido al interés que han suscitado durante estos años los fungicidas estrobilurínicos, se han desarrollado también técnicas cromatográficas multiresiduo específicas para esta familia, en las que se determina KM y TF conjunta y únicamente con otras estrobilurinas. En uno de los últimos trabajos publicados se llegan a analizar hasta siete estrobilurinas diferentes (azoxystrobin, kresoxim-methyl, trifloxystrobin, dimoxystrobin, pyraclostrobin, metominostrobin y picoxystrobin) en frutas mediante cromatografía líquida de alta resolución con detector de red de diodos (HPLC-DAD) (Campillo *et al.*, 2010) y en alimentos infantiles por GC-MS

(Viñas *et al.*, 2009). Mención aparte merece el trabajo de Schurek y colaboradores en el que se emplea la técnica de desorción e ionización por electrospray acoplada a un sistema de detección de masas en tándem con trampa de iones lineal (DESI–LIT MS) para la determinación de seis estrobilurinas (azoxystrobin, kresoxim–methyl, trifloxystrobin, dimoxystrobin y pyraclostrobin) en trigo de forma directa (Schurek *et al.*, 2008).

1.5. Métodos inmunoquímicos para la detección de plaguicidas

Los inmunoensayos son métodos de análisis basados en la detección de una molécula mediante su interacción con anticuerpos capaces de reconocerla selectivamente, lo que se conoce como reacción antígeno–anticuerpo (Ag–Ab). Esta tecnología surgió a finales de 1950, cuando R.S. Yallow y S.A. Berson publicaron el desarrollo del primer inmunoensayo cuantitativo, en concreto un radioinmunoensayo (RIA) para la insulina humana (Yallow y Berson, 1959), desarrollo por el que se les concedió el premio Nobel. A partir de ese momento, la aplicación de los inmunoensayos se extendió ampliamente en el campo de la bioquímica, la endocrinología y la química clínica. El potencial de esta tecnología para la determinación de productos fitosanitarios y contaminantes fue puesto de manifiesto por Ercegovich, Hammock y Mumma, cuyos trabajos pioneros impulsaron su aceptación como metodología analítica en alimentos, suelos y aguas (Ercegovich, 1971; Hammock y Mumma, 1980).

Los primeros inmunoensayos para plaguicidas estuvieron basados en el uso de radioisótopos. En 1975 Langone y Van Vunakis desarrollaron el primer radioinmunoensayo para la detección de plaguicidas, en concreto para los insecticidas aldrin y dieldrin (Langone y Van Vunakis, 1975). A este radioinmunoensayo le siguieron otros para el piretroide S–bioallethrin (Wing *et al.*, 1978), el paraquat (Fatori y Hunter, 1980), los ácidos 2,4–diclorofenoxiacético (2,4–D) y 2,4,5–triclorofenoxiacético (2,4,5–T) (Rinder y Fleeker, 1981), el benomyl (Newsome y Shields, 1981) y el parathion (Ercegovich *et al.*, 1981). A pesar de la peligrosidad del uso de materiales radiactivos, que exigía un equipamiento adecuado, el desarrollo de los radioinmunoensayos abrió la posibilidad de que la reacción Ag–Ab pudiera ser utilizada como base para el desarrollo de nuevos métodos analíticos;

únicamente era necesario encontrar otro tipo de marcaje. La intensa búsqueda culminó cuando se demostró que tanto los anticuerpos como los antígenos podían ser acoplados a enzimas (Avrameas y Uriel, 1966; Nakane y Pierce, 1966) e inmovilizados sobre soportes sólidos (Engvall y Perlmann, 1971; Van Weemen y Schuurs, 1971) dando lugar al desarrollo de la técnica conocida como ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay). No obstante, fueron las investigaciones llevadas a cabo por el grupo del Dr. Hammock en los años 80 las que sentaron las bases del desarrollo de inmunoensayos para plaguicidas, en los que el marcador es una enzima. Una vez establecida la interacción Ag-Ab, la señal generada mediante una reacción enzimática da lugar a un producto detectable, habitualmente mediante absorbancia o fluorescencia.

Los primeros ELISAs aplicados a la determinación de un plaguicida fueron desarrollados para el diflubenzuron (un regulador del crecimiento de insectos) y el paraoxon (insecticida organofosforado) (Wie y Hammock, 1982; Hunter y Lenz, 1982). A partir de entonces el empleo de inmunoensayos enzimáticos descritos para plaguicidas, tanto de herbicidas e insecticidas como de fungicidas, ha ido aumentando de manera espectacular. De hecho, desde 1991 hasta 2011 el número de publicaciones en las que el tema principal es el desarrollo de inmunoensayos para plaguicidas asciende a más de 2000.

Hoy en día, aparte de los inmunoensayos enzimáticos y de los radioinmunoensayos, existen inmunoensayos con marcadores fluorescentes (Schobel *et al.*, 2000; Eremin y Smith, 2003; Smith y Eremin, 2008; Herranz *et al.*, 2008), quimioluminiscentes (Qi y Zhang, 2004; Mickova *et al.*, 2005; Fan *et al.*, 2009), electroquímicos (Warsinke *et al.*, 2000; Díaz-González *et al.*, 2005), magnéticos (Kuramitz, 2009) o empleando *quantum dots* (Algar *et al.*, 2010). Si bien es cierto que estos nuevos formatos pueden presentar algunas ventajas adicionales en circunstancias concretas, la técnica más habitual sigue siendo el ELISA con detección colorimétrica.

La aparición de nuevos plaguicidas y agentes contaminantes, así como de normativas de control y regulación de los mismos, tiene como consecuencia que, en la actualidad, se publiquen continuos avances en el desarrollo de técnicas inmunoanalíticas. Por un lado, recientemente se han publicado trabajos sobre modificaciones en los formatos de los inmunoensayos que

tienen como finalidad mejorar la sensibilidad de los mismos (Kaur *et al.*, 2008; Lee *et al.*, 2009). Además, en la última década, también se está trabajando en la mejora de otros aspectos de los inmunoensayos como son la reducción del tiempo de ensayo, la posibilidad de realizar el análisis *in situ*, la miniaturización y automatización del sistema y la determinación simultánea de varios analitos (multianalito) (Morozova *et al.*, 2005; Ahn *et al.*, 2007; Adrian *et al.*, 2008; Cháfer–Pericás *et al.*, 2010; Xu *et al.*, 2012; Verch y Bakhtiar, 2012). Por otro lado, nuevas y prometedoras técnicas inmunoanalíticas como los biosensores (Alvarez *et al.*, 2003; Garcés–García *et al.*, 2004; Mauriz *et al.*, 2007; Jornet *et al.*, 2010; Valera *et al.*, 2010; Walter *et al.*, 2011) o los microarrays (Seidel y Neissner, 2008; Morais *et al.*, 2009; Pastor–Navarro *et al.*, 2009a) se están abriendo paso en la detección de pequeñas moléculas de interés agroalimentario.

Es por ello que, hasta la fecha, se han desarrollado una extensa variedad de inmunoensayos para detectar, además de plaguicidas, residuos industriales y productos de degradación (Watanabe *et al.*, 2005; Ramon–Azcon *et al.*, 2006), contaminantes ambientales (Shelver *et al.*, 2007; Moreno *et al.*, 2011), antibióticos (Adrian *et al.*, 2008; Pastor–Navarro *et al.*, 2009b; Zhang y Wang, 2009; Meng y Xi, 2011), microorganismos patógenos o alterantes (Sanvicens *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2011), toxinas naturales (Skerritt *et al.*, 2000; Goryancheva *et al.*, 2009; Rubio *et al.*, 2009; Garet *et al.*, 2010; Anfossi *et al.*, 2011), aditivos alimentarios (Sanvicens *et al.*, 2003b; Sreenath y Venkatesh, 2010), drogas (Salvador *et al.*, 2007a; Wang *et al.*, 2009; Coulter *et al.*, 2010; Schwoppe *et al.*, 2010), hormonas (Pratt, 1978; Zhao *et al.*, 2007; Watanabe *et al.*, 2010) y feromonas (Neokosmidi *et al.*, 2004 y 2008).

El potencial atribuido a los inmunoensayos en el campo del análisis de plaguicidas y moléculas de bajo peso molecular radica principalmente en una serie de características que les permiten superar las limitaciones que las técnicas cromatográficas presentan para ciertas aplicaciones:

- **Facilidad de uso.** Una de las características más interesantes de los inmunoensayos es la rapidez y sencillez de la determinación analítica. Además, no se requiere de instrumental sofisticado, ni de personal altamente cualificado.

• **Elevada capacidad de análisis o muestreo.** Utilizando varias placas ELISA se pueden analizar cientos de muestras simultáneamente en un mismo ensayo.

• **Alta sensibilidad y especificidad.** La elevada sensibilidad se ve reflejada en los bajos límites de detección que se pueden llegar a conseguir con estos métodos (en muchos casos por debajo de 0.1 µg/L). En cuanto a la selectividad, la íntima interacción generada entre el antígeno y el anticuerpo permite conseguir especificidades excelentes, de forma que en mezclas complejas el anticuerpo es capaz de reconocer solamente a su antígeno, incluso en presencia de moléculas estrechamente relacionadas.

• **Simplificación de los procedimientos de preparación de la muestra antes del análisis.** La capacidad de reconocer exclusivamente al analito diana permite simplificar o incluso eliminar los tediosos procesos de extracción y purificación de la muestra que tan habituales son en las técnicas cromatográficas. Esto reduce considerablemente el tiempo total del análisis.

• **Coste.** Los análisis mediante métodos inmunoquímicos resultan significativamente más económicos que los realizados mediante las técnicas clásicas. En concreto, el coste de los reactivos empleados en un ELISA es entre 20 y 100 veces menor que en el caso de GC o HPLC, y el del instrumental necesario es aproximadamente 5 veces menor (Morozova *et al.*, 2005).

• **Aplicación *in situ*.** Los inmunoensayos pueden adaptarse a formatos portátiles, lo que los independiza del laboratorio de análisis y los hace ideales para ser empleados allí donde sean necesarios, incluidos análisis en campo o en los puntos de producción.

• **Versatilidad en la aplicación;** análisis cuantitativos o cualitativos, sistemas de detección, diferentes marcajes, ensayos homogéneos o heterogéneos, automatización, biosensores,....

• **Posibilidad de adaptación al análisis multianalito,** ya sea mediante el uso de anticuerpos específicos de clase (Pastor–Navarro *et al.*, 2007; Adrian *et al.*, 2009; Hu *et al.*, 2010), o la utilización simultánea en un mismo análisis de

anticuerpos dirigidos hacia analitos diferentes (Adrian *et al.*, 2008; Tamarit-López *et al.*, 2011).

A pesar de estas características, al igual que todo método analítico, los inmunoensayos presentan ciertas limitaciones que hay que tener en cuenta:

- **Tiempo de desarrollo.** Aunque el análisis en sí es rápido y sencillo, el desarrollo y puesta a punto de cada inmunoensayo es un proceso que habitualmente requiere más de un año.

- **Gran especificidad.** Esta característica, una de los más distintivos atributos de los inmunoensayos, se convierte en una limitación en ámbitos analíticos en los que es necesario analizar simultáneamente un elevado número de compuestos, como es el caso de los programas oficiales de control de residuos.

- **Efecto matriz.** En los inmunoensayos la interacción Ag–Ab está gobernada por interacciones moleculares débiles que pueden verse afectadas por interferencias inespecíficas producidas por la matriz. Estos efectos dependen de cada producto a analizar, por lo que resulta necesario validar los inmunoensayos para cada tipo de muestra.

El conocimiento de las ventajas e inconvenientes de cada uno de los métodos analíticos (métodos cromatográficos e inmunoquímicos) permite establecer las aplicaciones más adecuadas para cada uno de ellos. De ellas, principalmente se deduce que los programas oficiales de control de residuos, por su propia naturaleza y objetivos, no constituyen el entorno más adecuado en el que las virtudes analíticas de los métodos inmunoquímicos pueden ser plenamente apreciadas, fundamentalmente debido a su elevada selectividad. Existen no obstante otros ámbitos en el que los métodos inmunoquímicos pueden realizar importantes contribuciones analíticas para garantizar la seguridad química de los alimentos, como son:

- **Crisis y alarmas alimentarias.** La presencia de residuos no permitidos en un producto o por encima de los niveles establecidos en la legislación suele desencadenar un fortalecimiento temporal de los controles dirigidos hacia aquella combinación alimento–residuo responsable de la notificación. Un ejemplo reciente de una situación de este tipo ha sido la alarma generada en

EEUU por niveles de carbendazima en zumos procedentes de Brasil y Canadá (www.foodproductiondaily.com), o hace ya algún tiempo la crisis desencadenada por la presencia de melamina en leches procedentes de China (EFSA, 2008), situación en la que precisamente los kits ELISA rápidos adquirieron un gran protagonismo.

- **Departamentos de control de calidad.** Las empresas agroalimentarias, tanto de productos frescos como procesados, tienen frecuentemente la necesidad de realizar analíticas en materias primas focalizadas a ciertos contaminantes para evitar las cuantiosas pérdidas económicas y de imagen que su presencia podría acarrear, una situación en la que los métodos rápidos de cribado pueden resultar ventajosos en términos económicos y logísticos.

- **Estudios de disipación.** Cuando un nuevo producto fitosanitario llega al mercado resulta conveniente conocer, bajo las condiciones climáticas y de uso particulares de una cierta zona geográfica y cultivo, cuál es la manera más adecuada de realizar los tratamientos para no incumplir la legislación (Alister *et al.*, 2005)

- **Estudios de transferencia durante el procesado.** Mientras que algunos compuestos químicos, debido a su estructura y propiedades, apenas son transferidos desde la materia prima al producto final, otros por el contrario no sufren merma alguna o incluso su concentración es superior en el producto procesado (Schirra *et al.*, 2011; Fontana *et al.*, 2011; González-Álvarez *et al.*, 2012). Los métodos inmunoquímicos pueden contribuir a conocer mejor estos procesos y cómo afectan a la calidad sanitaria del producto final.

1.6. Etapas en el desarrollo de un inmunoensayo

En el desarrollo de un inmunoensayo se necesita disponer de anticuerpos con gran afinidad y selectividad por el/los analito/s de interés. Para obtenerlos y finalmente desarrollar un inmunoensayo, se siguen unas directrices bien establecidas, debido al hecho de que esta tecnología tiene una trayectoria avalada por su aplicación durante más de tres décadas. En líneas generales, las etapas de las que se compone el desarrollo de un inmunoensayo podrían ser resumidas como sigue (Harlow y Lane, 1988):

- ◆ Síntesis de haptenos
- ◆ Preparación de conjugados proteicos
- ◆ Producción de anticuerpos
- ◆ Caracterización de anticuerpos y diseño del inmunoensayo
- ◆ Optimización de la sensibilidad
- ◆ Determinación de la selectividad
- ◆ Validación analítica

1.6.1. Síntesis de haptenos. La etapa determinante

El principal problema al que se enfrenta el desarrollo de inmunoensayos para compuestos de bajo peso molecular (< 1000 Da) es que, desde el punto de vista inmunológico, este tipo de moléculas son haptenos. Karl Landsteiner, padre de la inmunología, definió como hapteno a aquellas moléculas que por su pequeño tamaño sólo poseen un determinante antigénico, por lo que pueden interaccionar con un anticuerpo preexistente, pero son incapaces de desencadenar por sí mismas una respuesta inmunológica a menos que se acoplen a una molécula de mayor entidad, como una proteína (Landsteiner y Simms, 1923). Tal es el caso de KM y TF, y de todos los plaguicidas orgánicos. Debido a esta característica, la obtención de anticuerpos contra un hapteno pasa necesariamente por su acoplamiento covalente a una proteína, de manera que al ser utilizado este complejo proteína–hapteno como inmunógeno sí se desencadena la respuesta inmunitaria deseada.

En el contexto de los inmunoensayos para moléculas orgánicas de este tipo, y dada la habitual ausencia de grupos reactivos en la molécula diana, el término hapteno se emplea para designar a un compuesto sintético que mimetiza la estructura química del analito a detectar y que al mismo tiempo permite el acoplamiento a una proteína. Por lo tanto, el hapteno es el que permite la obtención de anticuerpos capaces de reconocer al analito, gracias a la similitud estructural entre ambos.

Para el acoplamiento (conjugación), es necesario que el hapteno posea grupos funcionales, tales como $-\text{COOH}$, $-\text{NH}_2$, $-\text{OH}$ o $-\text{SH}$, capaces de reaccionar con alguno de los grupos disponibles en las cadenas laterales de los

aminoácidos de las proteínas transportadoras. Además, este grupo funcional debe estar separado de la estructura del analito por un brazo espaciador, cuya función principal es la de distanciar espacialmente el hapteno de la proteína, evitando así el enmascaramiento de ciertas partes del hapteno por proximidad al sitio de unión con la proteína (**Figura 1.16**). Debido a que generalmente los fungicidas carecen de este grupo funcional o si lo tienen, por lo general, no conviene modificarlo, el primer paso para el desarrollo de inmunoensayos es la síntesis de compuestos funcionalizados (haptenos) del analito problema, que contengan alguno de los grupos funcionales mencionados.

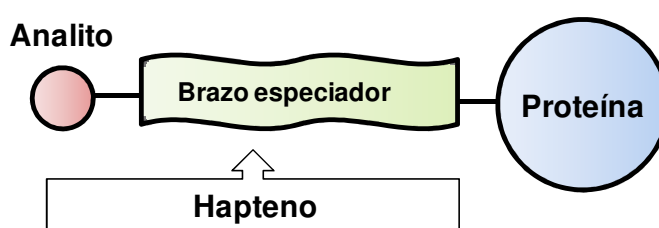


Figura 1.16. Conjugado hapteno–proteína: inmunógeno necesario para la producción de anticuerpos específicos hacia plaguicidas.

Una de las aproximaciones más extendidas es la introducción de un brazo espaciador consistente en una cadena hidrocarbonada totalmente saturada con un grupo carboxilo terminal, dada la facilidad de conjugación que éste presenta con los grupos amino libres de los aminoácidos básicos de las proteínas portadoras, fundamentalmente lisinas, a través de la formación de un enlace amida. Es importante que el brazo espaciador no contenga elementos fuertemente inmunogénicos por sí mismos, como son anillos aromáticos, dobles enlaces conjugados o heteroátomos, ni sea excesivamente polar, lo que podría cambiar la distribución electrónica de la molécula y desviar la respuesta inmunitaria hacia el brazo espaciador en lugar de hacia la estructura del analito (Vallejo *et al.*, 1982; Dankwardt, 2001).

En cuanto a la longitud del brazo espaciador, y aunque existe cierta controversia al respecto (Kim *et al.*, 2003a; Brun *et al.*, 2005; Suárez–Pantaleón *et al.*, 2008), se suele admitir que un brazo largo favorece la exposición del hapteno al sistema inmune, lo que desemboca en la producción de anticuerpos con mayor afinidad y especificidad por el analito de estudio, aunque si el brazo espaciador es demasiado largo pueden darse plegamientos del propio hapteno

sobre su brazo que dificultan la exposición al sistema inmunitario (Dewen *et al.*, 2007). Generalmente, se considera que un brazo espaciador con una longitud de 3–6 átomos de carbono y sin elementos inmunogénicos resulta perfectamente adecuado (Mercader *et al.*, 2008a; Suárez–Pantaleón *et al.*, 2010). Existen casos descritos que prueban que conjugados inmunogénicos con longitudes de brazos espaciadores mayores o menores dan lugar a peores anticuerpos (Tuomola *et al.*, 2000; Lee *et al.*, 2002; Mercader *et al.*, 2008c), aunque no a la imposibilidad de obtenerlos.

Es un hecho perfectamente establecido que de la estructura química de los haptenos sintetizados dependerán en gran medida las propiedades de los anticuerpos producidos por parte del organismo inmunizado, razón por la que esta primera etapa de síntesis de haptenos es especialmente crítica y se convierte, en la mayoría de los casos, en la etapa determinante para desarrollar inmunoensayos. El hapteno debe poseer una estructura lo más parecida posible al analito, preservando los principales grupos de la molécula, la distribución electrónica y las propiedades hidrofóbicas de la molécula original (Harrison–Robert *et al.*, 1990; Marco *et al.*, 1995; Goodrow y Hammock, 1998; Herranz *et al.*, 2008; Mercader *et al.*, 2008b; Suárez–Pantaleón *et al.*, 2011; Mercader *et al.*, 2011; Parra *et al.*, 2011a). De esta forma, resulta lógico pensar que si el hapteno es muy similar al analito, los anticuerpos generados hacia dicho hapteno deberán reconocer también al analito con elevada afinidad y especificidad. No obstante, existen ejemplos en los que se han generado anticuerpos a partir de haptenos fragmentarios, es decir, aquéllos que solamente representan parte de la molécula original (Schlaeppli *et al.*, 1992; Mercader y Montoya, 1999; Lee *et al.*, 2002; Brun *et al.*, 2004; Zhao *et al.*, 2006; Ahn *et al.*, 2009).

Hay que decir que la síntesis de haptenos, aun siendo la etapa más crítica en el desarrollo de inmunoensayos, es la que más incertidumbre genera. En principio, se trata de sintetizar análogos del analito que conserven íntegramente su estructura, manteniendo todas sus características pero incorporando el brazo espaciador. No obstante, llevar a cabo esta estrategia no siempre es fácil, ya que muchas moléculas no se pueden funcionalizar de forma directa, y con frecuencia es necesario recurrir a la síntesis total del

hapteno. Esto conlleva en ciertos casos un esfuerzo sintético considerable, por lo que es necesario valorar el tiempo del que se dispone y la relación esfuerzo–beneficio que en cada caso va a aportar esta etapa sobre el desarrollo global del inmunoensayo (Sanvicens *et al.*, 2003c).

La estrategia más extendida para evitar la síntesis total ha sido introducir la cadena en la posición de la estructura del analito que resultaba más simple desde el punto de vista sintético, mediante conexiones viables (Szurdoki *et al.*, 2002) y en las posiciones más accesibles (Ramón–Azcon *et al.*, 2006); llegando a aprovechar la presencia de grupos funcionales presentes en el analito para introducir directamente la cadena hidrocarbonada sin la necesidad de sintetizar el compuesto, tales como grupos hidroxilo (Skerritt *et al.*, 2000; Xu *et al.*, 2007; Mercader y Abad–Fuentes, 2009; Salvador *et al.*, 2010), amino (Hungerford *et al.*, 2006; Martínez–Cabot *et al.*, 2008; Yin *et al.*, 2010) o carboxilato (Kononenko y Burkin, 2007; Kato *et al.*, 2007; Mercader *et al.*, 2008a y b; Yuan *et al.*, 2009). Sin embargo, este tipo de aproximación puede dar lugar a estructuras poco apropiadas o subóptimas para obtener anticuerpos muy afines y específicos, al modificar electrónicamente y estéricamente la molécula original o enmascarar algún grupo funcional importante para el reconocimiento.

No obstante, cada vez son más los trabajos en los que se le da una mayor importancia a la síntesis elaborada de haptenos por la repercusión positiva que tiene en el éxito final de los inmunoensayos. Hasta hace relativamente poco, el desarrollo de inmunoensayos se ha centrado en compuestos orgánicos relativamente sencillos, debido a la fácil accesibilidad sintética de sus correspondientes haptenos. La incorporación de procedimientos de síntesis orgánica avanzada para la preparación de haptenos abre la posibilidad de acometer la producción de anticuerpos frente a moléculas orgánicas mucho más complejas mediante síntesis total, aprovechando así las ventajas de esta técnica analítica en compuestos hasta ahora excluidos. De hecho, ya se han descrito síntesis muy elaboradas de haptenos con el fin de desarrollar inmunoensayos efectivos para fitoestrógenos (Bennetau–Pelissero *et al.*, 2000), feromonas (Neokosmidi *et al.*, 2008), esteroides (Salvador *et al.*, 2007a), fungicidas estrobilurínicos (Parra *et al.*, 2011a y b), e incluso estructuras tan complejas como la de las ciguatoxinas (Oguri *et al.*, 2003; Tsumuraya *et al.*,

2006) y la de los azaspirácidos (Forysth *et al.*, 2006).

Otro aspecto clave para la obtención de haptenos adecuados es conocer en qué posición se debe introducir el brazo espaciador y qué tipo de conexión química resulta más apropiada para unirlo a la estructura del analito a fin de obtener los anticuerpos más afines y específicos posibles. Hoy en día, las dos estrategias más utilizadas para diseñar el hapteno más adecuado son la modelización molecular y la aplicación del principio de Landsteiner.

1.6.1.1. Modelización molecular en el diseño de haptenos

La modelización molecular consiste en obtener modelos de las posibles estructuras de los diferentes haptenos y del analito mediante la utilización de herramientas computacionales conocidas como CAMM (*computer-assisted molecular modeling*) (Xu *et al.*, 2009).

En primer lugar, tanto para los haptenos propuestos como para el analito se realiza una búsqueda conformacional extensiva por mecánica molecular para encontrar los conformeros de menor energía, que posteriormente serán refinados mediante métodos semi-empíricos (simulando o no el medio acuoso). Una vez que se dispone de los conformeros de menor energía tanto de los haptenos como del analito, se comparan y se superponen de tal forma que el programa informático da idea de qué haptenos son más parecidos en términos de conformación al analito en cuestión (Estévez *et al.*, 2006; Moon *et al.*, 2007). Teniendo en cuenta esto, teóricamente se podría escoger como hapteno óptimo aquel en el que su conformero de menor energía mejor se superponga con el conformero de menor energía del analito.

Dentro de este contexto, software como CAChe (Computer-Aided Chemistry), CHARMM (Chemistry at HARvard Molecular Mechanics), HyperChem y Sybyl han sido ampliamente utilizados para explicar resultados en cuanto a afinidad por el analito o selectividad hacia otras moléculas en función del hapteno inmunizante (Karu *et al.*, 1994; Julicher *et al.*, 1995; Holtzapple *et al.*, 1996 y 1997; Ballesteros *et al.*, 1998; Beier y Staker, 1998; Spinks *et al.*, 1999; Muldoon *et al.*, 2000; Beier *et al.*, 2001; Wang *et al.*, 2007b; Cao *et al.*, 2009; Adrian *et al.*, 2009; Mercader *et al.*, 2011). Sin embargo, estas

metodologías han sido muy poco utilizadas con carácter predictivo, ya que son escasos los trabajos que comprometen el desarrollo de un inmunoensayo a un solo hapteno, escogido como óptimo mediante modelización molecular, para llevar a cabo la inmunización (Beier y Stanker, 2001; Kim *et al.*, 2003b). Esto es debido, principalmente, a que en muchas ocasiones los resultados obtenidos que explican el comportamiento de los anticuerpos usando técnicas computacionales han resultado ser contradictorios. A modo de ejemplo, en algunos casos los haptenos menos indicados por modelización dan lugar a los mejores anticuerpos (Estévez *et al.*, 2006), mientras que en otros, las conclusiones extraídas de los mapas electrónicos no coinciden con las derivadas de la superposición de confórmeros (Sanvicens *et al.*, 2003a), por lo que hay que escoger qué factor va a ser más importante para seleccionar uno de los haptenos sin tener evidencias suficientes para hacerlo.

Otra limitación que presenta la modelización molecular como herramienta predictiva es el hecho de que el análisis se limita a los confórmeros de menor energía del analito y de los haptenos. El principal problema radica en que la conformación más estable de una molécula libre en disolución no tiene por qué coincidir con la conformación más estable de la misma cuando ésta se encuentra unida al anticuerpo, ya que la unión al anticuerpo puede generar interacciones estabilizadoras que en disolución no existen (además del propio microambiente). De este modo, una conformación que no es la más estable en disolución puede acabar siéndolo al unirse al anticuerpo. Se han publicado numerosas evidencias al respecto utilizando diversas técnicas de RMN, como TRNOE (*Transferred Nuclear Overhauser Effect*) que permiten conocer la conformación en la que una molécula se une a una proteína (Gasel y Borer, 1986; Weimar *et al.*, 1995; Haselhorst *et al.*, 1999; Johnson *et al.*, 2004).

Como puede deducirse de lo comentado en los párrafos previos, la modelización molecular es una herramienta predictiva poco fiable a la hora de tomar decisiones sobre la elección del hapteno más óptimo, aunque ciertamente resulta útil en muchos casos para explicar los resultados obtenidos. Sin embargo, para llevar a cabo el diseño de haptenos sería deseable disponer del conocimiento necesario para optimizar la etapa de síntesis, ya que de este modo sólo se desarrollarían los haptenos más

recomendables y sólo con ellos se llevarían a cabo el resto de etapas que implica el desarrollo del inmunoensayo.

1.6.1.2. El principio de Landsteiner

Desde el punto de vista de la selectividad, otro recurso ampliamente empleado para poder racionalizar la etapa de síntesis de haptenos es el llamado “Principio de Landsteiner” (Landsteiner, 1962). En términos prácticos se describe la selectividad como la capacidad que presenta un anticuerpo para unirse a uno y no a otro miembro de una familia de compuestos relacionados (Langman, 2000). En este sentido, hace más de 50 años, Karl Landsteiner, con su trabajo pionero “*The Specificity of Serological Reactions*”, sentó las bases de la inmunología moderna (Landsteiner, 1936).

Karl Landsteiner fue un célebre científico austriaco y uno de los precursores en el estudio de la especificidad inmunitaria. Investigó sistemáticamente las características de inmunogenicidad y especificidad de las interacciones entre antígenos y anticuerpos y estableció el concepto de hapteno. Fruto de sus estudios, Landsteiner aportó un gran conocimiento en lo que respecta a la especificidad de los anticuerpos generados hacia haptenos, hecho que posteriormente dio lugar al “Principio de Landsteiner”. Además, por ser el primero en estudiar este tipo de interacciones, es considerado el padre de esta disciplina.

Landsteiner propuso que: “*La especificidad de un anticuerpo se dirige fundamentalmente a la porción del hapteno más alejada del brazo espaciador que une el hapteno a la proteína transportadora*”, sugiriendo que la región de la molécula más alejada a la proteína estaría más accesible durante la respuesta inmunitaria, permitiendo al anticuerpo interactuar fuertemente y desarrollar un paratopo (hueco) más restrictivo. En contraposición, el impedimento estérico que la proteína transportadora genera en la región del hapteno más próxima a ella dificulta la exposición de esta zona al sistema inmune, impidiendo al anticuerpo acceder cómodamente a ella y dificultando así su reconocimiento.

La consecuencia de dicho principio es que modificaciones sobre la estructura del analito en la zona más alejada a la que se introduce el brazo

espaciador en el hapteno afectarán drásticamente al reconocimiento del compuesto, es decir, en esta zona el anticuerpo será más restrictivo en cuanto a las variantes toleradas. Sin embargo, en la zona del analito más próxima a la proteína, el anticuerpo resultará más permisivo y podrá reconocer a análogos del analito con modificaciones en esa parte de la estructura.

Desde que Landsteiner propusiera su teoría de la especificidad, este concepto ha sido citado y empleado hasta la saciedad en prácticamente todos los trabajos donde se desarrollan inmunoensayos y se trata de racionalizar la síntesis de haptenos para obtener anticuerpos de una selectividad determinada, demostrándose el cumplimiento de dicho principio en numerosas ocasiones (Marco *et al.*, 1993; Wang *et al.*, 1998; Peterson *et al.*, 2007; Suárez–Pantaleón *et al.*, 2008, 2010 y 2011; Parra *et al.*, 2011a).

No obstante, en muchos de los trabajos en los que se han sintetizado diferentes haptenos introduciendo el brazo espaciador en distintas posiciones de la molécula, no se ha prestado la debida atención al tipo de espaciador introducido o al grado de modificación de la estructura que dicha introducción suponía (Wang *et al.*, 1998; Szurdoki *et al.*, 2002). De esta forma, las características de reconocimiento que presentan los anticuerpos no pueden achacarse únicamente a la posición del espaciador, ya que existen otros factores que están influyendo.

En otros trabajos únicamente se sintetiza un solo hapteno en el que el brazo espaciador es introducido en una parte de la molécula y luego se determina la selectividad de los anticuerpos frente a análogos (Casino *et al.*, 2001; Kim *et al.*, 2003b; Ramesh *et al.*, 2007). Obviamente, este tipo de estudios resultan incompletos, ya que no se dispone de otras aproximaciones para comprobar qué pasaría si el espaciador se hubiese introducido en otra parte de la molécula. En otros casos se han sintetizado haptenos en los que el brazo espaciador se introdujo por varias aproximaciones que conservan en cierta medida la estructura del analito, pero luego no se dispone de una batería apropiada de análogos que permitan determinar la influencia del brazo espaciador.

Por lo tanto, para la obtención de anticuerpos de una selectividad determinada, la mejor aproximación sintética consistiría, teóricamente, en la funcionalización de los haptenos por la parte opuesta a la región característica de dicho compuesto en la que se pretende conseguir mayor reconocimiento o mayor especificidad (Tessier y Clark, 1999; Kim *et al.*, 2002; Brun *et al.*, 2004; Salvador *et al.*, 2007a y 2010).

Finalmente, cuando lo que se pretende es desarrollar inmunoensayos selectivos de clase (familia de compuestos químicamente relacionados) o genéricos, será posible obtener una mayor probabilidad de éxito si el hapteno inmunizante expone la parte común a los analitos que integran ese grupo concreto (Maclús *et al.*, 2008; Hao *et al.*, 2009; Salvador *et al.*, 2010). En el caso de que la estrategia sintética para la preparación de un hapteno genérico resulte especialmente compleja, se ha sugerido que la inmunización heteróloga (uso de varios inmunógenos, bien sean alternados en diferentes inmunizaciones o combinados simultáneamente en cada inmunización) puede ser una alternativa para la obtención de anticuerpos genéricos o específicos de clase (Ramón–Azcón *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2007c; Estévez *et al.*, 2008).

1.6.2. Preparación de conjugados proteicos

Como se ha comentado anteriormente, la obtención de anticuerpos contra un hapteno pasa necesariamente por su acoplamiento covalente a una proteína. Las más utilizadas son las albúminas [BSA (seroalbúmina bovina), OVA (ovoalbúmina), CONA (conalbúmina) y HSA (seroalbúmina humana)] y las hemocianinas [KLH (hemocianina de la lapa²), HCH (hemocianina del cangrejo herradura³) y CCH (hemocianina del chanque o loco⁴)]. Los criterios de selección de una proteína u otra se basan en su inmunogenicidad, solubilidad y facilidad de conjugación.

En este sentido, la BSA es ampliamente utilizada debido principalmente a su elevada inmunogenicidad, tolerancia de cargas hapténicas elevadas sin pérdida de solubilidad, elevada estabilidad física y química, disponibilidad y

² *Megathura crenulata*.

³ *Limulus polyphemus*.

⁴ *Concholepas concholepas*.

coste. Además, permite la determinación del número de moléculas acopladas y presenta una mayor tolerancia a diferentes disolventes orgánicos, en los cuales normalmente son solubles los haptenos, tales como piridina, DMSO y DMF (Dewen *et al.*, 2007).

Por otra parte, para la preparación de los conjugados que se emplean como reactivos en los inmunoensayos, suelen emplearse proteínas diferentes a las utilizadas en la inmunización, con el objetivo de garantizar que los anticuerpos seleccionados no muestren reconocimiento hacia la proteína (Abad *et al.*, 1997b; Mercader y Montoya, 1999; Gueguen *et al.*, 2000; Li *et al.*, 2007; Liu *et al.*, 2010; Suárez–Pantaleón *et al.*, 2011; Mercader *et al.*, 2012).

La química aplicada para realizar el acoplamiento covalente dependerá del grupo funcional que contenga el brazo espaciador (Hermanson, 1996). Probablemente lo más habitual es partir de haptenos que poseen un grupo carboxilo terminal y generar un enlace amida con los grupos amino libres de las aminoácidos básicos de la proteína transportadora. Para poder realizar esta reacción en condiciones suaves, que no afecten a la integridad estructural de la proteína, previamente es necesario activar el hapteno.

Existen varios métodos de funcionalización y/o conjugación dependiendo del grupo funcional terminal del hapteno (**Tabla 1.6.1**). Para los haptenos cuyo grupo funcional es un ácido carboxílico, los procedimientos más empleados son el método del éster activo y el del anhídrido mixto. En este trabajo hemos empleado para la activación de todos los haptenos el método del éster activo, y la preparación de los correspondientes derivados reactivos se discutirá con detalle más adelante. Una vez activado el grupo carboxilato, se hace reaccionar el hapteno con la proteína en medio ligeramente básico, de forma que los grupos amino estén desprotonados y puedan reaccionar fácilmente con el grupo carbonilo de los haptenos activados.

Tabla 1.6.1. Métodos de conjugación dependiendo de la naturaleza del hapteno

Hapteno	Reactivo	Hapteno funcionalizado
	 DSC	 (Método del éster activo)
Hapteno-CO ₂ H	 DCC	
	 CFI	 (Método del anhídrido mixto)
Hapteno-NH ₂	 Glutaraldehído	 (Método del glutaraldehído)
Hapteno-OH	 Anhídrido succínico	 (Método del anhídrido succínico)
Hapteno=O	 Ácido 2-aminoxiacético	 (Método del ácido aminoxiacético)

La verificación y cuantificación de la conjugación del hapteno a la proteína, es decir, el número de moléculas de hapteno unidas por molécula de proteína, o relación molar (RM), se puede realizar mediante espectroscopía ultravioleta si el hapteno absorbe suficientemente en esta zona del espectro. Previa determinación de los coeficientes de extinción molar, tanto del hapteno como de la proteína a varias longitudes de onda, es posible realizar una estimación de la RM del conjugado proteína-hapteno. Los avances en técnicas de espectrometría de masas, como MALDI-TOF, ofrecen una nueva posibilidad para determinar la densidad de hapteno en los conjugados de proteína (Font *et al.*, 2008; Ramón-Azcón *et al.*, 2009; Mercader *et al.*, 2011). Esta técnica es especialmente útil cuando el hapteno no presenta espectro UV relevante. En cuanto a la RM óptima para inducir una adecuada respuesta inmune, cabe decir que no existe consenso, habiéndose obtenido buenos resultados tanto

con relaciones molares bajas como con altas. Podría depender de la proteína utilizada, de la naturaleza del hapteno y/o del protocolo de inmunización, si bien para el caso de la BSA relaciones molares entre 1:10 y 1:20 (proteína:hapteno) se consideran óptimas.

1.6.3. Anticuerpos

Los anticuerpos, también llamados inmunoglobulinas (Ig), son glicoproteínas bifuncionales pertenecientes al grupo de las γ -globulinas producidas por los linfocitos B, normalmente con ayuda de las células T, como parte de la respuesta del sistema inmunológico ante la presencia de moléculas o agentes extraños (antígenos) en el organismo, siendo su principal función la de unirse a ellos con elevada afinidad y especificidad. Debido a su carácter adaptativo, el sistema inmune de los vertebrados es capaz de poner en marcha mecanismos para la neutralización específica de tales sustancias, así como de generar células de memoria productoras de anticuerpos dirigidos selectivamente hacia cada antígeno, que se activarán posteriormente ante un nuevo contacto, dando lugar a una respuesta de defensa más eficaz.

Estructuralmente las inmunoglobulinas presentan una forma característica que recuerda a la letra Y. Como ejemplo de la estructura típica de un anticuerpo se muestra la estructura tridimensional de una inmunoglobulina de tipo G, así como su representación esquemática en la que se detallan sus principales partes (**Figura 1.17**). La estructura básica de un anticuerpo está formada por dos cadenas polipeptídicas pesadas idénticas (de 50 kDa cada una) y dos cadenas polipeptídicas ligeras (de 25 kDa cada una) también idénticas. Las cadenas pesadas están unidas entre sí por puentes disulfuro, y cada una de ellas está unida a su vez a una cadena ligera, también por puentes disulfuro. Además, ambas cadenas pesadas están asociadas a polisacáridos.

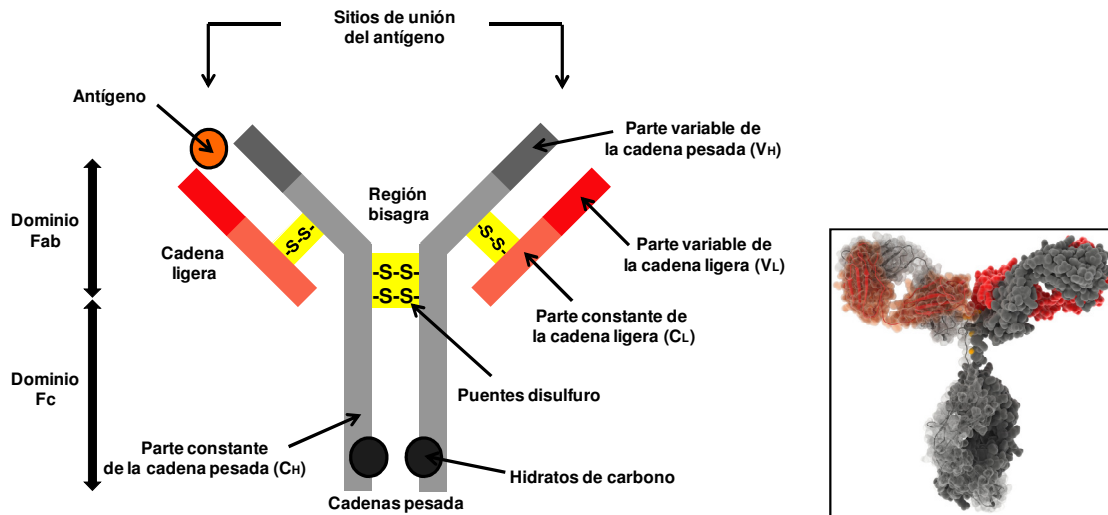






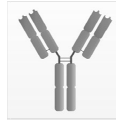
Figura 1.17. Representación esquemática de la estructura básica de una inmunoglobulina tipo IgG (izquierda). Estructura tridimensional de una inmunoglobulina IgG (www.visualscience.ru); se muestran en gris las cadenas pesadas, en rojo las cadenas ligeras, en gris oscuro los carbohidratos y en amarillo los puentes disulfuro (derecha).

En los anticuerpos se pueden distinguir tres dominios bien diferenciados. Dos dominios o fragmentos Fab (fragment, *antigen binding*) que son idénticos y forman los brazos de la Y. Los Fab están formados por la región N-terminal de las cadenas pesadas y las cadenas ligeras. Cada uno de los Fab contiene a su vez una zona variable que constituye el paratopo o sitio de unión del antígeno, por lo que los anticuerpos son moléculas bifuncionales. El tercer dominio se denomina Fc (fragment, *crystallizable*), constituye la base de la Y y se corresponde con la región C-terminal de las cadenas pesadas. Esta fracción posee una secuencia de aminoácidos constante, contiene sitios de glicosilación, y desempeña un papel importante durante la activación de la respuesta inmune. La mayor parte de la estructura del anticuerpo es constante y sólo los extremos de los fragmentos Fab presentan regiones variables (V_L y V_H). Es en esta zona donde se produce la interacción con el antígeno, por lo que constituye la porción más pequeña del anticuerpo necesaria para su actividad, y proporciona un grado excepcional de versatilidad.

Las inmunoglobulinas se dividen en cinco clases o isotipos, en función de su estructura (diferente tipos de cadena pesada: α , μ , γ , δ , ϵ , distinta composición de aminoácidos, carga y tamaño), actividad funcional, momento de la respuesta en la que aparecen y lugar donde se encuentran (suero, leche, saliva, etc.):

IgG, IgA, IgM, IgD e IgE. Las cadenas ligeras pueden a su vez ser de tipo κ o λ , aunque es únicamente el tipo de cadena pesada la que determina la subclase a la que pertenece cada anticuerpo. Las subclases de anticuerpos difieren en el número de puentes disulfuro y en la longitud de la región “bisagra”. Además, el número de regiones Fab determina el número de paratopos con el que el anticuerpo puede unirse al antígeno (**Tabla 1.6.2**).

Tabla 1.6.2. Clases de anticuerpos y número de paratopos

	Clases de anticuerpos				
	IgG	IgA	IgM	IgD	IgE
Cadena pesada	γ	α	μ	δ	ϵ
Cadena ligera	κ o λ	κ o λ	κ o λ	κ o λ	κ o λ
Estructura					

No obstante, las inmunoglobulinas de tipo IgG son las más abundantes en el suero sanguíneo (75–80% de las inmunoglobulinas totales) y las únicas presentes en respuestas inmunes secundarias, con afinidad y especificidad madurada hacia el antígeno. Es por ello que son las más adecuadas para desarrollar inmunoensayos.

1.6.3.1. Producción de anticuerpos

El siguiente paso en el desarrollo de un inmunoensayo consiste en la obtención de anticuerpos a partir de la inmunización de animales de experimentación con el conjugado proteína–hapteno. La inmunización es en su mayor parte empírica y la respuesta inducida en el animal depende del inmunógeno, de la especie y del sistema inmune del animal, así como de la vía y pauta de la inmunización.

Un inmunoensayo puede estar basado en el uso de anticuerpos policlonales, monoclonales o recombinantes. Los anticuerpos policlonales (pAb) se obtienen directamente del suero sanguíneo de los animales inmunizados, razón por la que también se denominan antisueros (As), y representan la respuesta inmune global procedente de múltiples líneas celulares, por lo que están compuestos

por una mezcla heterogénea de anticuerpos con muy diferentes propiedades de unión al antígeno, es decir, diferentes afinidades y especificidades hacia el mismo. Los animales más utilizados para la obtención de antisueros son conejos, ovejas, cabras y pollos. No obstante, los conejos son la especie mayoritariamente empleada para la producción de pAbs, principalmente porque presentan un tamaño adecuado para su estabulación, son fácilmente manejables, generan volúmenes considerables de suero (entre 50–100 mL) y presentan un periodo de vida relativamente largo (entre 3–6 años).

Por su parte, los anticuerpos monoclonales (mAb) provienen de una única línea celular productora de anticuerpos o clon, seleccionados y estabilizados *in vitro*, por lo que se trata de un reactivo homogéneo potencialmente ilimitado compuesto por Igs que presentan las mismas propiedades de afinidad y especificidad hacia el antígeno. Estas células se obtienen generalmente a partir de ratones inmunizados mediante la tecnología de generación de hibridomas (Köhler y Milstein, 1975), procedimiento que será explicado en detalle en el **apartado 1.6.3.2**.

Por último, los anticuerpos recombinantes (rAb) se obtienen mediante la aplicación de técnicas de biología molecular, gracias a las cuales es posible aislar los genes codificantes de las inmunoglobulinas para ser clonados y expresados en diferentes sistemas biológicos (células de insecto, bacterias, levaduras, plantas...) y por ello denominados anticuerpos de tercera generación. En este contexto, la técnica de presentación de anticuerpos en la superficie de fagos (*phage display*) ha tenido gran repercusión en los últimos años para la creación de genotecas de anticuerpos recombinantes (scFv, fragmento variable de cadena única; y Fab), ya que al permitir la asociación genotipo–fenotipo, resulta una plataforma muy útil para la selección y producción de anticuerpos con propiedades concretas (Krämer y Hock, 2003; Sheedy *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2008; Jurado *et al.*, 2012).

Cualquiera de los inmunorreactivos mencionados permite el desarrollo de ensayos con una gran sensibilidad y especificidad, presentando cada uno sus particulares ventajas e inconvenientes. En el caso de los pAbs, su obtención resulta relativamente sencilla, rápida (3–4 meses) y económica. Sin embargo, se trata de un reactivo limitado, con una elevada variabilidad entre individuos,

por lo que cada suero posee características concretas difíciles de reproducir con facilidad. La producción de mAbs es más compleja y laboriosa (6–8 meses), y supone un mayor coste. No obstante, la tecnología de generación de hibridomas ofrece la posibilidad de seleccionar células productoras de anticuerpos con propiedades establecidas de antemano. Además, una vez estabilizado el clon productor, se dispone de una fuente ilimitada y homogénea de reactivo. Los rAbs por su parte permiten reducir el uso de animales, y posibilitan la modulación de características del anticuerpo tales como la afinidad, selectividad y/o solubilidad en diversos medios empleando estrategias basadas en la mutagénesis de las secuencias codificantes (Kobayashi *et al.*, 2010).

Por último, una alternativa al uso de anticuerpos para el desarrollo de métodos de detección basados en la interacción receptor–ligando es la utilización de receptores no inmunológicos (Fodey *et al.*, 2011). De hecho, la utilización de este tipo de receptores se ha incrementado en los últimos años. Entre los diferentes tipos de receptores sintéticos de origen biológico más habitualmente empleados destacan los aptámeros, secuencias de nucleótidos capaces de interactuar específicamente con un ligando (Famulok *et al.*, 2007; Madru *et al.*, 2009; Ruta *et al.*, 2009; Stead *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2011b), los peptídicos (González–Techera *et al.*, 2007; Jaworski *et al.*, 2008) y los proteicos como las anticalinas (Mercader y Skerra, 2002). Estos tipos de receptores permiten la creación de librerías combinatorias sobre las que realizar el cribado de moléculas con unas propiedades determinadas. Por otra parte, los polímeros de impresión molecular (MIPs, molecularly imprinted polymers) han sido ampliamente utilizados para la purificación y separación de compuestos quirales o para el desarrollo de sensores (Salvador *et al.*, 2007b; Bravo *et al.*, 2009; Romero *et al.*, 2009; Yang *et al.*, 2010), habiéndose propuesto también su utilización para el desarrollo de inmunoensayos (Hoshino *et al.*, 2008; Xu *et al.*, 2011).

1.6.3.2. Producción de mAbs: tecnología de generación de hibridomas

La tecnología de producción de mAbs fue descrita por Georges Köhler y César Milstein en 1975, quienes mediante la fusión de células de una línea tumoral de mieloma con linfocitos B extraídos del bazo de un ratón inmunizado, consiguieron la formación de una población híbrida o hibridoma capaz de crecer *in vitro* indefinidamente y producir anticuerpos específicos (Köhler y Milstein, 1975). La posterior selección de un único hibridoma con unas características determinadas a partir de esta mezcla heterogénea y su consiguiente expansión, permite disponer de un clon de células idénticas productoras del mismo anticuerpo. Tal fue la repercusión científica de este trabajo que Köhler y Milstein recibieron el Premio Nobel de Medicina o Fisiología en 1986. El procedimiento para la generación de hibridomas se esquematiza en la **Figura 1.18**.

El primer paso consiste en inmunizar ratones inyectándoles el conjugado proteína–hapteno (inmunógeno). Después de que el animal ha sido inmunizado, se produce la diferenciación de algunos de los linfocitos B del sistema inmune del ratón produciendo anticuerpos con diferentes afinidades y especificidades hacia el antígeno. Posteriormente, la estrategia para conseguir immortalizar los linfocitos B consiste en extraerlos del bazo del animal y fusionarlos con células de origen tumoral denominadas células de mieloma o mielomas (que tienen la capacidad de crecer indefinidamente en cultivo), en presencia de un agente químico como el polietilenglicol (PEG), que disuelve las membranas de las células adyacentes permitiendo la fusión en una única célula. La reorganización del material genético de las dos células parentales dará lugar finalmente al hibridoma. Una vez concluido el proceso de fusión, las células se resuspenden en medio de cultivo y se distribuyen en placas de cultivo.

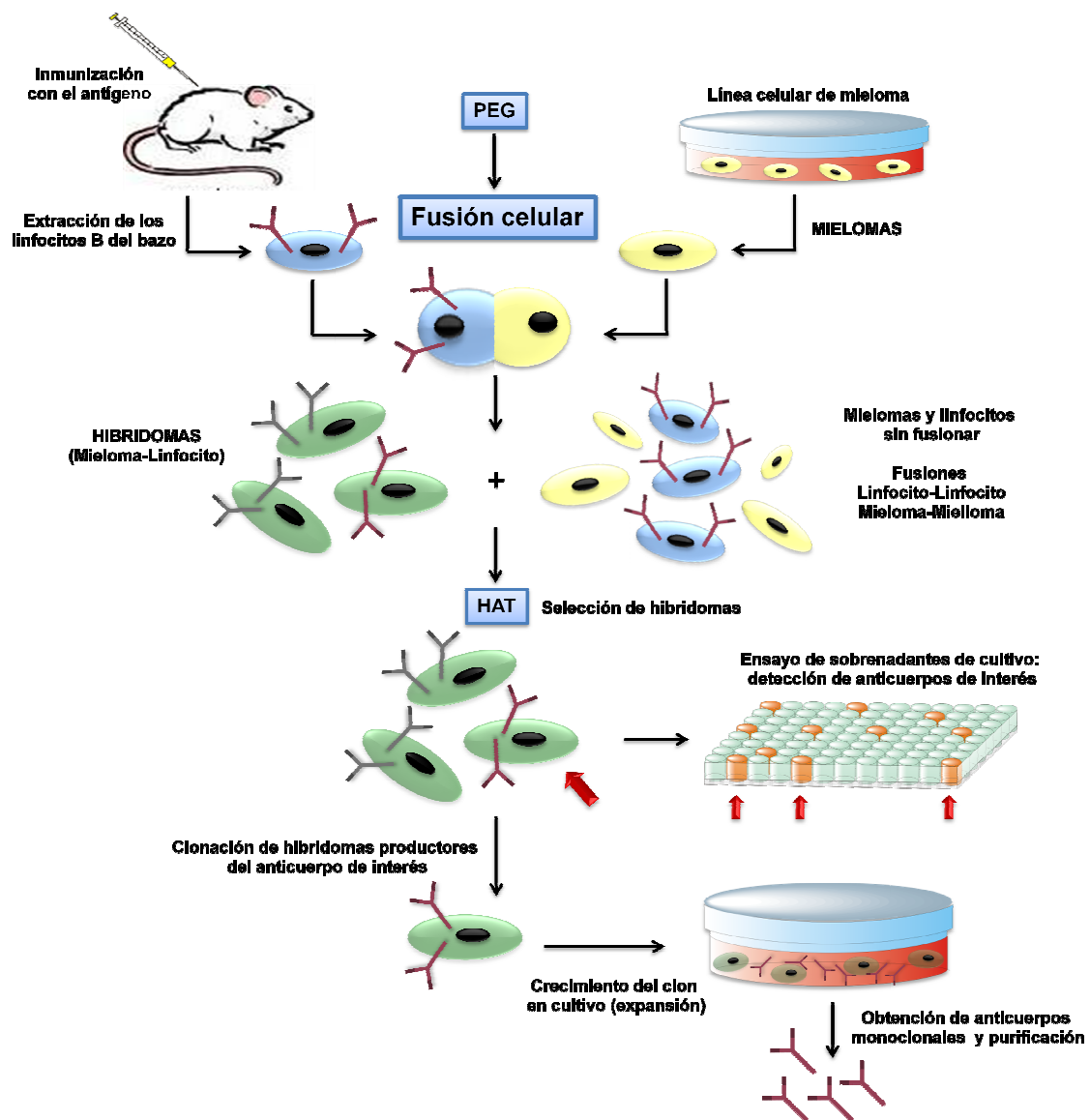


Figura 1.18. Representación esquemática del proceso empleado para la obtención de anticuerpos monoclonales mediante la tecnología de generación de hibridomas.

La principal limitación de la producción de hibridomas radica en que la fusión de los linfocitos con los mielomas se realiza al azar. La consecuencia de este hecho es que la población celular obtenida es muy heterogénea, ya que se compone de linfocitos y mielomas sin fusionar, híbridos linfocito–linfocito, híbridos mieloma–mieloma y, por supuesto, de hibridomas propiamente dichos. Dado que solamente interesan estos últimos, es necesario un procedimiento que permita eliminar selectivamente a los demás. Los linfocitos sin fusionar y los híbridos linfocito–linfocito no son problema, ya que mueren por sí solos a los pocos días. El verdadero problema lo constituyen los mielomas sin fusionar y los híbridos mieloma–mieloma, ya que, no sólo son capaces de crecer en

cultivo, sino que lo hacen de forma muy eficaz, por lo que de no eliminarse acabarían desplazando a la población de hibridomas. La superación de este problema fue posible gracias a la dotación genética de la línea tumoral empleada para la fusión y el uso de la droga aminopterina.

En las células animales existen dos posibles rutas para la síntesis de nucleótidos de purina, la “ruta natural” y la “ruta alternativa”. La aminopterina bloquea selectivamente la “ruta natural” al inhibir a la dihidrofolato reductasa (DHFR), una de las enzimas que participan en la síntesis de purinas y pirimidinas, lo que da lugar a la activación de la “ruta alternativa”. La línea tumoral empleada, además de estar modificada genéticamente para no producir anticuerpos, presenta una mutación en uno de los genes que participan en la vía alternativa de la síntesis de purinas (adenina y guanina), concretamente el gen que codifica la HGPRT (hipoxantina guanina fosforribosil transferasa), siendo incapaz de utilizar esta ruta ya que las células son HGPRT⁻.

Por el contrario, los linfocitos B sí que presentan esta enzima (son HGPRT⁺). Precisamente, utilizando como medio post-fusión el denominado HAT, que contiene aminopterina e hipoxantina y timidina como precursores de la síntesis de purinas, sólo los hibridomas, al provenir de un linfocito HGPRT⁺, pueden emplear la vía alternativa para sintetizar las purinas y por ello sobreviven (**Figura 1.19**). No obstante, como consecuencia del uso de aminopterina, también se bloquea la ruta natural para la síntesis de nucleótidos de timina, por lo que al medio post-fusión (HAT) se le añade también timidina para que de esta forma las células puedan usar la ruta alternativa. Sin embargo, los mielomas y los híbridos mieloma-mieloma mueren al no poder emplear ninguna de las dos rutas, ya que no disponen de nucleótidos con bases púricas para la replicación del DNA.

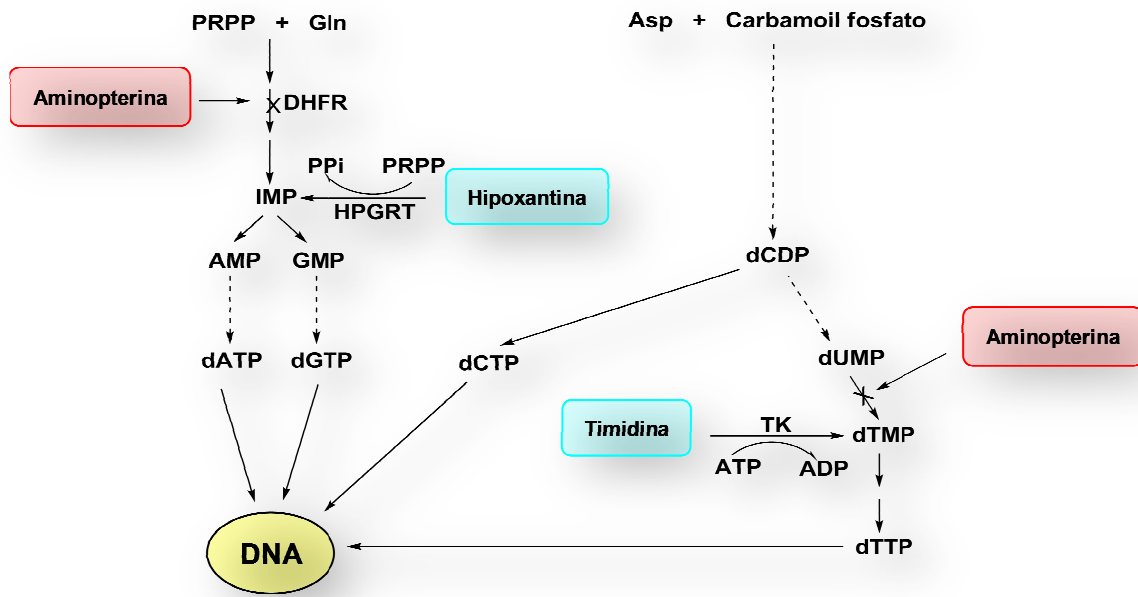


Figura 1.19. Rutas para la síntesis de nucleótidos y mecanismos de acción del medio de cultivo HAT (hipoxantina–aminopterina–timidina).

Al cabo de 10–12 días, tiempo suficiente para que se haya producido la selección química, los hibridomas pasan a cultivarse en medio HT, sin aminopterina, pudiendo a partir de ese momento utilizar la ruta habitual. Una vez seleccionados los hibridomas, los sobrenadantes de cultivo de las células en crecimiento son analizados para determinar su capacidad para producir anticuerpos específicos hacia el analito problema. Mediante procedimientos como el **ELISA diferencial** (Abad y Montoya, 1994), es posible identificar y clonar aquellos hibridomas que producen anticuerpos que reconocen tanto al conjugado de ensayo competidor como a la molécula diana en su forma libre.

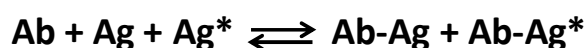
Una vez asegurado el carácter monoclonal del hibridoma mediante sucesivos procesos de clonación celular, se procede a su expansión cultivándolos cada vez en recipientes de mayor tamaño. Una vez producida suficiente cantidad de anticuerpo, la línea celular de hibridoma seleccionada se congela en nitrógeno líquido (criopreservación), garantizándose así un suministro ilimitado del inmunorreactivo, pudiendo ser descongelada posteriormente si fuera necesario. Los hibridomas suelen producir anticuerpos a una concentración comprendida entre 30 y 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, por lo que es posible obtener sin dificultad entre 5 y 10 mg de mAb a partir de un volumen de sobrenadante comprendido entre 100 y 200 mL. Por último, se procede a la

purificación por cromatografía de afinidad de los mAbs obtenidos a partir del sobrenadante de cultivo.

1.6.4. Caracterización de anticuerpos y diseño de inmunoensayos

Tras su purificación, los anticuerpos se caracterizan en términos de afinidad y especificidad para determinar cuál o cuáles son los más adecuados para el desarrollo definitivo de un método inmunoquímico aplicable a la detección del analito de interés. Dentro de este contexto, la afinidad de un anticuerpo se define como la suma de todas las fuerzas repulsivas y atractivas (enlaces de hidrógeno, fuerzas electrostáticas, de van der Waals y/o hidrofóbicas) que se producen entre el sitio de unión del anticuerpo (paratopo) y el correspondiente determinante antigénico (epítopo). Normalmente se expresa como constante de afinidad (K_a). La especificidad, por su parte, como ya se ha comentado anteriormente, es la capacidad de un anticuerpo de distinguir entre varios antígenos (o analitos) de estructuras similares. Se determina mediante estudios de reactividad cruzada (RC) con otros antígenos de estructura química parecida o de similar reactividad inmunoquímica al analito de interés.

El análisis de proteínas y microorganismos a través de un inmunoensayo puede realizarse mediante ensayos tipo sándwich, ya que debido a su gran tamaño poseen varios epítomos que le permiten la unión a varios anticuerpos simultáneamente. Sin embargo, en el caso de compuestos de bajo peso molecular, no es posible sin aproximaciones moleculares desarrollar inmunoensayos de este tipo, dado que los haptenos constituyen un único epítopo y no pueden unirse simultáneamente a dos anticuerpos, por lo que la detección debe realizarse mediante un ensayo competitivo (González–Techera *et al.*, 2007). Un ensayo competitivo puede ser descrito por la siguiente reacción inmunoquímica:



En el mismo, tal y como su propio nombre indica, el analito compite con un hapteno marcado (conjugado de ensayo) por los sitios de unión del anticuerpo, el cual debe encontrarse en concentración limitante para que la competición sea eficaz, de forma que el hapteno marcado será finalmente el responsable de

la señal. Esta naturaleza competitiva del ensayo hace que la señal obtenida sea inversamente proporcional a la concentración de analito. Por lo tanto, cuanto más analito libre haya en la muestra, más anticuerpo se unirá al mismo y menos al hapteno marcado, por lo que se generará menor señal; cuando haya poco analito, el anticuerpo se unirá preferentemente al hapteno marcado, produciéndose más señal y, finalmente, en ausencia de analito se generará la máxima señal posible del ensayo.

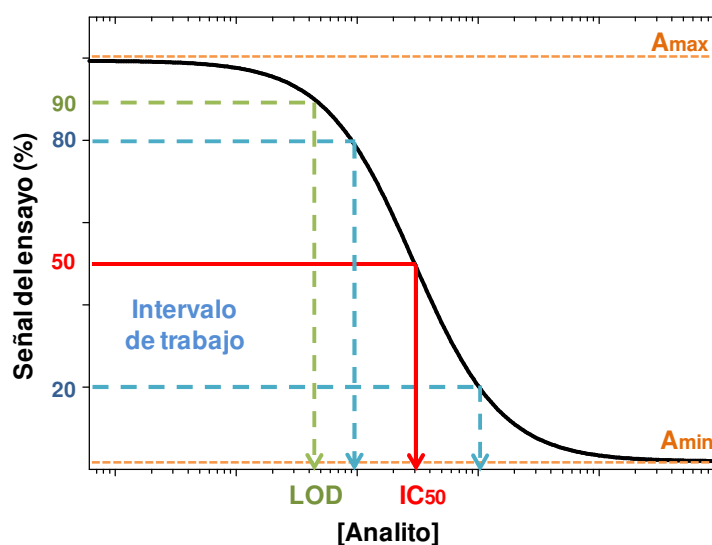


Figura 1.20. Curva de inhibición característica de un inmunoensayo de tipo competitivo. Se representa en escala semilogarítmica la señal frente a la concentración de analito. Se muestra en rojo, verde y azul los parámetros de IC_{50} , LOD e intervalo de trabajo, respectivamente. Las asíntotas, correspondientes a la señal máxima y mínima, se representan en naranja.

La representación en escala semilogarítmica de la señal frente a la concentración de analito da lugar a una curva decreciente de tipo sigmoide (**Figura 1.20**). Generalmente, se toma el valor de concentración de analito en el punto de inflexión de la curva como una estimación de la sensibilidad del ensayo, siendo ésta tanto mayor cuanto menor sea el valor de dicha concentración. Tradicionalmente este valor se denomina IC_{50} ya que coincide con la concentración que proporciona una inhibición de la A_{max} del 50%, si el valor de la señal mínima se acerca a cero; también suele emplearse, en condiciones limitantes, como estimación de la K_a del anticuerpo hacia el analito. Otros parámetros analíticos de interés son el límite de detección del inmunoensayo (LOD) y el rango de cuantificación. El LOD se define como la concentración mínima de analito que puede ser detectada con fiabilidad, y

normalmente corresponde con el 90% de la señal máxima (10% de inhibición). Por otra parte, el rango de cuantificación o de trabajo comprende aquellas concentraciones de analito cuyas medidas son de una precisión suficiente como para satisfacer las necesidades particulares del analista. La concentración más baja del mismo se denomina límite de cuantificación (LOQ). En general suele asumirse que el intervalo de trabajo está comprendido entre las concentraciones de analito que reducen la señal máxima el 20% y el 80%.

Los inmunoensayos competitivos pueden clasificarse en función de si es necesario separar el anticuerpo libre del anticuerpo unido para la obtención de la señal, de modo que se habla de **ensayo homogéneo** cuando la detección de la señal se realiza directamente a partir de la mezcla de inmunorreacción, sin llevar a cabo la separación de inmunorreactivos, mientras que se denomina **ensayo heterogéneo** a aquél en el que es necesaria dicha separación para cuantificar el analito. La forma más habitual de llevar a cabo dicha separación es mediante la inmovilización de uno de los reactivos sobre un soporte sólido.

Las principales ventajas del **ensayo homogéneo** son su simplicidad, al no requerirse etapas adicionales de lavado o separación, y su rapidez, ya que el equilibrio se alcanza en un tiempo menor al encontrarse todos los inmunorreactivos en disolución (Liu *et al.*, 2008). En cuanto a los **ensayos en fase heterogénea**, son los más utilizados ya que por lo general proporcionan una mayor sensibilidad y son menos susceptibles a sufrir interferencias de la muestra (Anfossi *et al.*, 2009). No obstante, algunos autores han optado por el desarrollo de inmunoensayos en los que ambas aproximaciones han sido empleadas (Jornet *et al.*, 2007 y 2010).

Entre los ensayos en formato heterogéneo, sin duda la **técnica ELISA** ha sido la que mayor éxito ha alcanzado y actualmente es la más utilizada para la determinación de plaguicidas. En dicha técnica, uno de los reactivos debe estar inmovilizado sobre un soporte y otro de los reactivos debe estar marcado con una enzima capaz de generar una señal al añadirse el sustrato de la misma, ya sea de tipo colorimétrico, quimioluminiscente o fluorescente. En cuanto a los soportes de inmovilización, se pueden utilizar membranas de diferentes tipos, partículas magnéticas, nylon, agarosa, vidrio, etc, e incluso superficies de CDs y DVDs. Estos últimos tipos de soportes se utilizan sobre todo en el ámbito de

los microarrays ya que presentan una fácil automatización y la posibilidad de analizar varios compuestos simultáneamente mediante la inmovilización de diferentes anticuerpos en zonas discretas (Morais *et al.*, 2008; Tamarit-López *et al.*, 2010). No obstante, de todos ellos, las placas de poliestireno de 96 pocillos siguen siendo las más utilizadas (Estévez-Alberola y Marco, 2004; Díaz-González *et al.*, 2005). Aunque existen placas de poliestireno comerciales que poseen en su superficie grupos activados que permiten la inmovilización covalente de la molécula, la inmovilización por adsorción pasiva sigue siendo el método más difundido debido a su sencillez, economía y buenos resultados.

Por otra parte, aunque se han utilizado un gran número de enzimas, las más comunes son la peroxidasa del rábano picante (HRP) y la fosfatasa alcalina (AP). El tipo de señal producida depende del sustrato empleado. En el caso de la HRP, una glicoproteína de peso molecular 44 kDa con cuatro lisinas disponibles para su conjugación sin pérdida significativa de la actividad enzimática, la detección colorimétrica de la actividad se realiza mediante la oxidación de una serie de sustratos tales como OPD (*o*-fenilendiamina), ABTS (ácido 2,2'-azinodi-(3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) o TMB (3, 3', 5, 5'-tetrametilbenzidina). La OPD es un sustrato incoloro que al ser oxidado por la peroxidasa utilizando el H₂O₂ como aceptor de electrones da lugar a un compuesto de color anaranjado (diimina) que muestra un máximo de absorción a 492 nm en medio ácido. Otros sustratos de la enzima que proporcionan diferentes tipos de detección son el luminol como sustrato quimioluminiscente (Girotti *et al.*, 2010), y el ácido homovalínico (HVA), el 3-*p*-hidroxifenilacético, o la proclorperacina (PCP) como sustrato fluorogénico (Li y Gong, 2004). En lo que respecta a la AP, esta enzima cataliza, en medio básico, la hidrólisis de ésteres fosfato en sustratos como el PNPP (*p*-nitrofenil fosfato) o el BCIP (bromocloroindolil fosfato), produciéndose productos de hidrólisis coloreados (Wright *et al.*, 2001).

Dentro de la técnica ELISA, existen diferentes formatos competitivos, siendo los más habituales el de conjugado inmovilizado y el de anticuerpo inmovilizado, que se diferencian entre sí por la especie inmunorreactiva anclada sobre el soporte sólido y la especie responsable de la generación de la señal (Stanker y Beier, 1996; Shan *et al.*, 2002).

Así, en el formato de conjugado inmovilizado o formato indirecto (**Figura 1.21**), el hapteno se acopla covalentemente a una proteína portadora (normalmente diferente a la utilizada para la preparación del inmunógeno) y el conjugado obtenido (conjugado de tapizado) se inmoviliza sobre la superficie del pocillo de la placa ELISA por adsorción pasiva, gracias a interacciones de diferente tipo (hidrofóbicas, hidrofílicas y/o de van der Waals) que tienen lugar entre la proteína y la superficie del plástico. En la etapa competitiva se adicionan al pocillo una cantidad limitante de anticuerpo primario y el analito, de manera que se establece una competencia en el que el conjugado inmovilizado y el analito en disolución rivalizan por unirse al anticuerpo. Cuanto más analito libre haya en disolución, menos anticuerpo se unirá al conjugado inmovilizado, y viceversa. Tras una etapa de lavado se adiciona un anticuerpo secundario marcado enzimáticamente capaz de unirse al anticuerpo primario (específico) que haya permanecido unido al conjugado de tapizado. Finalmente, este anticuerpo marcado permite obtener la señal al añadir el sustrato enzimático correspondiente. También existe la opción de marcar directamente el anticuerpo primario, aunque este tipo de formato suele proporcionar una menor sensibilidad, puesto que se pierde la potencial amplificación de la señal proporcionada por el anticuerpo secundario, o puede incluso producirse una modificación de las propiedades del anticuerpo tras la conjugación enzimática (Abad *et al.*, 1997a). Otra alternativa útil si se desea disminuir la duración del ensayo es adicionar el anticuerpo primario y el secundario simultáneamente, obteniéndose en ocasiones ensayos con una sensibilidad similar al ensayo de dos etapas consecutivas (Moreno *et al.*, 2001a; Mercader *et al.*, 2008a y b).

En el formato de anticuerpo inmovilizado o formato directo (**Figura 1.22**), el hapteno se acopla covalentemente con una enzima (trazador enzimático), y es el anticuerpo específico el que se inmoviliza sobre la placa. El anticuerpo puede ser adsorbido bien de manera directa (adsorción pasiva) o bien de manera indirecta, por ejemplo mediante el empleo de un anticuerpo de captura o proteínas G o A. Esta última estrategia puede resultar interesante para conseguir revertir posibles modificaciones en el funcionamiento del anticuerpo como consecuencia de su inmovilización directa sobre el soporte de poliestireno (Abad *et al.*, 1997a; Moreno *et al.*, 2007). En este formato, en la

etapa competitiva se añade al pocillo el analito y el trazador enzimático. Analito y trazador compiten por los sitios de unión del anticuerpo inmovilizado y, en función de la concentración de analito libre presente en la muestra, quedará finalmente una determinada cantidad de conjugado enzimático unida al anticuerpo. En este caso ya no es necesario el uso de un segundo reactivo para generar la señal, puesto que el propio trazador enzimático permitirá obtenerla tras la adición del sustrato adecuado.

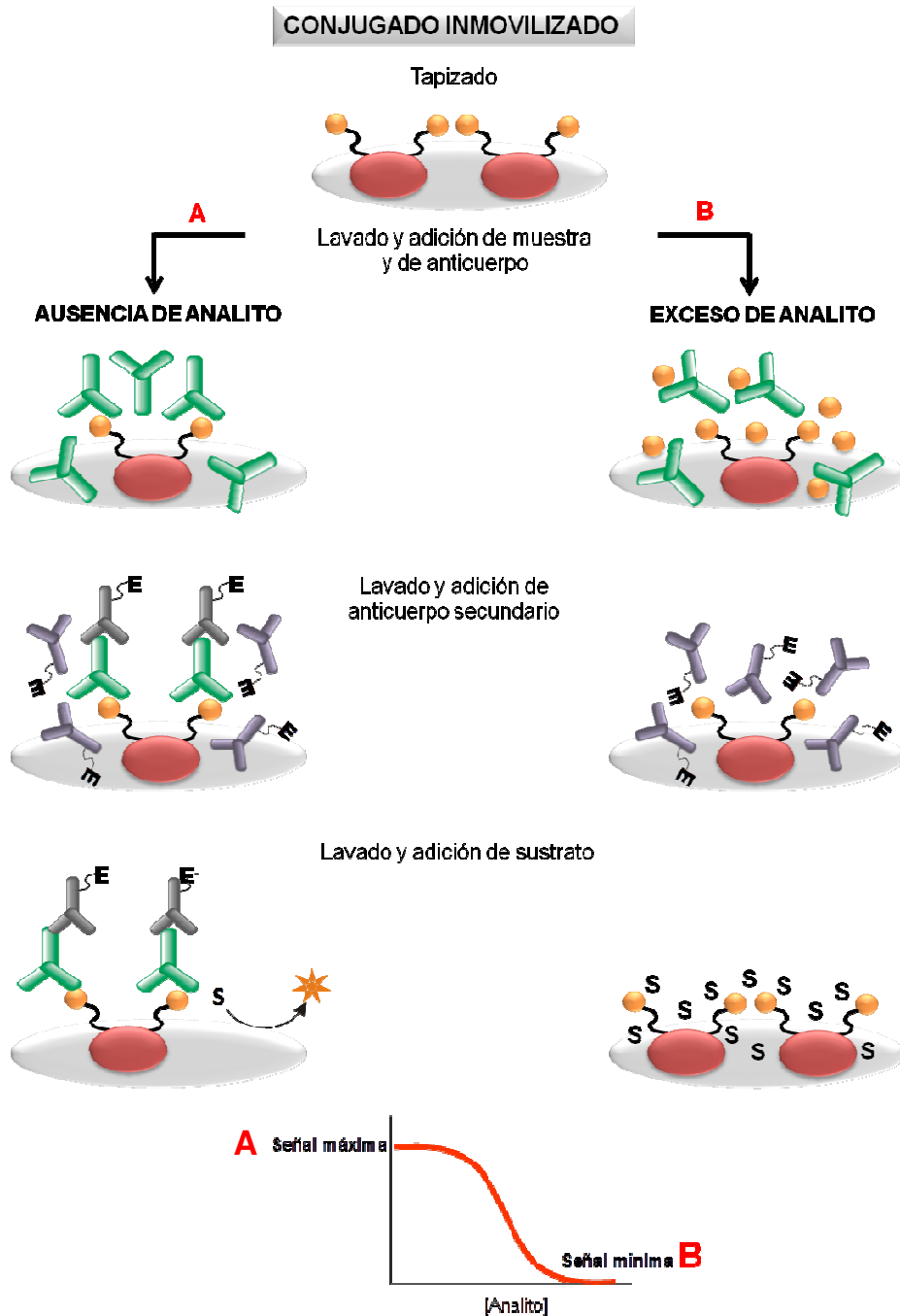


Figura 1.21. Representación esquemática del formato de ELISA con conjugado inmovilizado

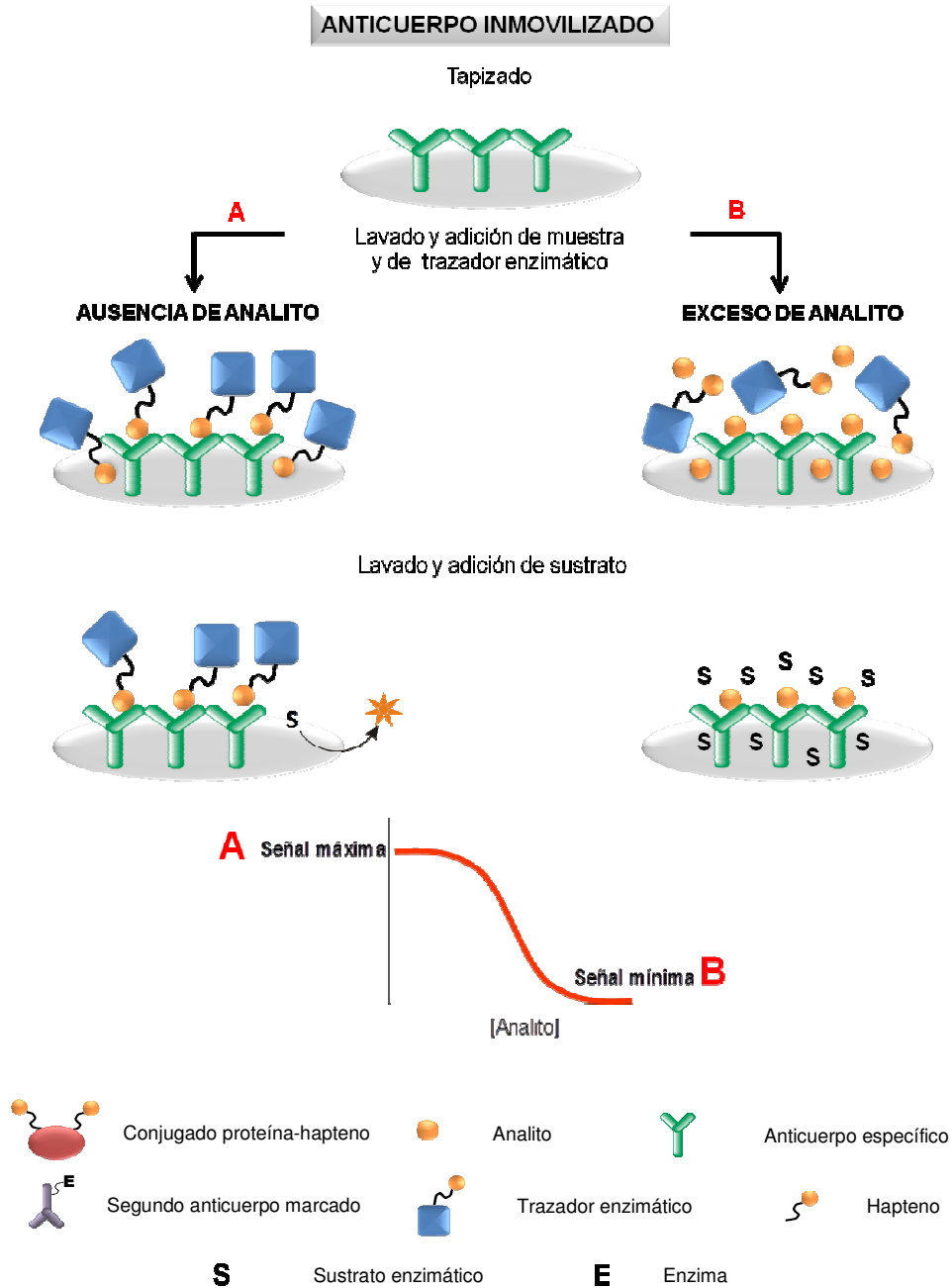


Figura 1.22. Representación esquemática del formato de ELISA con anticuerpo inmovilizado

Los dos formatos de ELISA competitivo presentan ventajas e inconvenientes. Estas características se refieren a parámetros tales como el número de etapas necesarias y por lo tanto la duración de los mismos (mayor en el competitivo indirecto), la concentración de anticuerpo empleada (mayor en el competitivo directo), la robustez, la influencia de factores externos, como por ejemplo la matriz analizada o la tolerancia a disolventes orgánicos, lo que junto con la sensibilidad obtenida determina la elección final del formato empleado para el desarrollo de un inmunoensayo.

Por último, no es posible anticipar para un anticuerpo en concreto qué formato de ensayo proporcionará mayor sensibilidad. Esta elección depende de cada caso en particular, existiendo ejemplos en los que uno de los formatos resulta más adecuado, tal como el de conjugado inmovilizado (Skerritt *et al.*, 1992; Muldoon *et al.*, 1993; Karu *et al.*, 1994; Mercader y Montoya, 1999; Kim *et al.*, 2002; Brun *et al.*, 2005), o el de anticuerpo inmovilizado (Salvador *et al.*, 2010; Chen *et al.*, 2010), y otros en los que ambos formatos dan lugar a ensayos comparables (Cliquet *et al.*, 2003; Manclús *et al.*, 2008).

1.6.5. Optimización de la sensibilidad del ensayo

La sensibilidad de un inmunoensayo está determinada por la afinidad que presentan los anticuerpos obtenidos hacia el analito de interés. En base al equilibrio dinámico establecido entre el anticuerpo, el analito libre y la especie competidora en un inmunoensayo heterogéneo de tipo competitivo, la sensibilidad del ensayo (estimada a partir del valor de IC_{50} de la curva de inhibición) dependerá de la constante de afinidad del anticuerpo hacia ambos reactivos. Por lo tanto, sería en principio posible alterar el equilibrio de la reacción para aumentar la afinidad aparente del anticuerpo hacia el analito libre, es decir, aumentar la sensibilidad al forzar el desplazamiento del equilibrio hacia la formación del complejo anticuerpo–analito, a través de la modificación de algunos de los parámetros característicos de un inmunoensayo (Marco *et al.*, 1995). Entre estos parámetros se encuentran la concentración de los diferentes inmunorreactivos que participan en el ensayo y ciertos parámetros fisicoquímicos como los tiempos de reacción, la fuerza iónica, el pH, adición de surfactantes, la presencia de disolventes orgánicos, etc.

La aproximación más sencilla consiste en la disminución de la concentración del conjugado competidor, estrategia que frecuentemente suele traducirse en una mejora considerable de la sensibilidad del inmunoensayo (Mercader *et al.*, 2008a; Esteve–Turrillas *et al.*, 2010), siempre y cuando no sea necesario aumentar significativamente la cantidad de anticuerpo. Sin embargo, el recurso que más posibilidades ofrece para mejorar el ensayo es sin duda la heterología.

El concepto de heterología viene determinado por la naturaleza del hapteno competidor que interviene en el inmunoensayo. Así, se define como **ensayo homólogo** a aquel que utiliza un conjugado (formato indirecto) o trazador enzimático (formato directo) homólogo, es decir, conjugados constituidos por el mismo hapteno que el que se utilizó en la inmunización. Por el contrario, un **ensayo heterólogo** es aquel en el que el hapteno utilizado en la preparación de los conjugados competidores es estructuralmente distinto (conjugado heterólogo) al hapteno inmunizante. De tal forma que, a través del uso de un competidor heterólogo para el cual el anticuerpo presenta una afinidad ligeramente menor de la que tiene por el conjugado homólogo, se consigue desplazar el equilibrio hacia la formación del complejo anticuerpo–analito, es decir, aumentar la afinidad aparente del anticuerpo hacia el analito libre, lo que se traduce en una mejora de la sensibilidad del ensayo (Schlaeppli *et al.*, 1994; Kim *et al.*, 2003c; Holthues *et al.*, 2005; Abuknesha y Luk, 2005; Wang *et al.*, 2011c) (**Figura 1.23**).

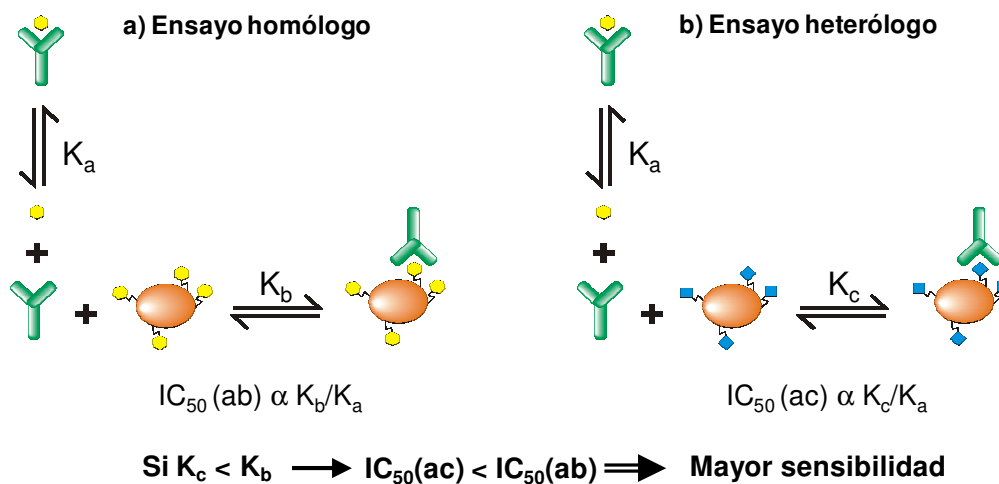


Figura 1.23. Representación esquemática de la situación de equilibrio dinámico establecida en un ensayo de tipo competitivo entre el anticuerpo, el analito en disolución y el conjugado competidor homólogo (a) y heterólogo (b).

Existen diferentes tipos de heterología según afecten a la estructura química base de los haptenos, a la conformación espacial y/o a la distribución electrónica (por ejemplo, mediante el cambio o la eliminación de sustituyentes o partes de la molécula, haptenos fragmentarios, etc.) (Abad *et al.*, 1998; Wang *et al.*, 1999; Ahn *et al.*, 2004; Liu *et al.*, 2007b; Piao *et al.*, 2009), a la posición

de funcionalización (heterólogos de posición) (Ballesteros *et al.*, 1998; Saviences *et al.*, 2003c; Shelver *et al.*, 2005; Suárez–Panataleón *et al.*, 2011; Parra *et al.*, 2011a y b; Mercader *et al.*, 2011 y 2012) y/o a la longitud y composición del brazo espaciador (Abad *et al.*, 1999; Abad *et al.*, 2001; Kim *et al.*, 2003a; Suárez–Pantaleón *et al.*, 2008; Lei *et al.*, 2010). En principio, cuanto más diferente sea el hapteno competidor, menor será la afinidad del anticuerpo hacia él y más sensible puede ser el ensayo. Sin embargo, si dicha afinidad fuese excesivamente baja como para que el conjugado no fuera reconocido, no se generaría señal y, por lo tanto, no existiría ensayo. Dado que en principio, al igual que ocurre con el hapteno inmunizante, no es sencillo predecir la estructura ideal del hapteno competidor, es recomendable explorar diversas estrategias sintéticas que permitan abordar la preparación de haptenos heterólogos.

1.6.6. Determinación de la selectividad del ensayo

Junto con la afinidad, la especificidad es una característica de enorme importancia a la hora de seleccionar uno u otro anticuerpo como inmunorreactivo clave con el que desarrollar el ensayo finalmente propuesto.

Generalmente, una de las problemáticas a las que se enfrenta un inmunoensayo es la posibilidad de la presencia en la muestra de compuestos estructuralmente similares al analito diana, que pueden interferir en la determinación del mismo.

Las características de selectividad de los anticuerpos se evalúan mediante el empleo de distintos compuestos como competidores, lo que permite conocer cuáles son más adecuados en función del objetivo perseguido, sea un ensayo específico o genérico. Este último tipo de inmunoensayo resulta especialmente útil para realizar una criba inicial de un elevado número de muestras en las que se sospecha de la presencia de compuestos pertenecientes a una misma familia. Ejemplos de este tipo de inmunoensayo han sido desarrollados para determinar insecticidas organofosforados (Liang *et al.*, 2008; Xu *et al.*, 2012) y piretroides (Zhang *et al.*, 2010), fungicidas triazoles (Maclús *et al.*, 2008), arilureas (Schneider *et al.*, 1994) fenilureas (Yuan *et al.*, 2011),

benzoilfenilureas (Wang *et al.*, 1998), sulfonilureas (Degelmann *et al.*, 2004) y sulfonamidas y fluoroquinolonas (Adrian *et al.*, 2008; Jiménez *et al.*, 2010).

Otra aportación relevante del estudio de la especificidad de un anticuerpo es la posibilidad que ofrece de estudiar qué partes de la molécula son las que tienen un mayor peso en la unión Ag–Ab. La evaluación del efecto producido por la introducción de pequeñas modificaciones en diferentes posiciones o grupos funcionales de la molécula puede permitir esbozar un mapa de reconocimiento (Schlaeppli *et al.*, 1992; Suárez–Pantaleón *et al.*, 2011).

Por último, con el uso de conjugados competidores heterólogos es posible alterar la especificidad de los inmunoensayos basados en anticuerpos policlonales, al posibilitar la participación en la reacción de subpoblaciones de anticuerpos con un perfil de reconocimiento diferente al de los anticuerpos seleccionados frente al conjugado homólogo (Oubiña *et al.*, 1999; Salvador *et al.*, 2008).

1.6.7. Validación analítica de inmunoensayos

La validación de los inmunoensayos constituye la última etapa en el desarrollo de un método inmunoquímico. Cuestiones como la aplicación final, el alimento que se quiere analizar, los procedimientos de extracción previos al análisis y el tipo de respuesta deseada deben ser adecuadamente consideradas para llegar a desarrollar un inmunoensayo realmente robusto y fiable. Asimismo, existe una legislación particular para la validación de métodos y procedimientos de control de calidad para el análisis de residuos de plaguicidas en alimentos (SANCO, 2010).

En la **Tabla 1.6.3** se muestra una selección de los inmunoensayos enzimáticos más actuales, desarrollados, aplicados y validados para diferentes plaguicidas en distintos tipos de muestras alimentarias.

Tabla 1.6.3. Selección de inmunoensayos enzimáticos validados para la determinación de plaguicidas en alimentos

PLAGUICIDA	MATRIZ	LOD* (ppb)	REFERENCIA
Herbicidas			
Chlorimuron–ethyl**	Aguas, suelos	1.6	(Zhao <i>et al.</i> , 2006)
Simazina	Aguas	0.11	(Herranz <i>et al.</i> , 2008)
Penoxsulam	Aguas	0.17	(Rubio <i>et al.</i> , 2008)
Clomazone	Aguas	1.1	(Carlomagno <i>et al.</i> , 2010)
Haloxypop-P-methyl**	Aguas, suelos, vegetales	1.9	(Bao <i>et al.</i> , 2010)
H–9201**	Aguas	17	(Zhang <i>et al.</i> , 2011)
Atrazina	Suelos, leche	0.1	(El–Gendy <i>et al.</i> , 2011)
Pretilachlor	Aguas, suelos	0.007	(Liu <i>et al.</i> , 2011)
Fenoxaprop–ethyl**	Suelos	3.1	(Cui <i>et al.</i> , 2011)
Terbutryn**	Aguas	0.005	(Sanvicens <i>et al.</i> , 2012)
Insecticidas			
Isofenphos	Lechuga, arroz	5.8	(Lee <i>et al.</i> , 2006)
Thiamethoxam	Aguas, tomate	1	(Ramesh <i>et al.</i> , 2007)
Fenitrothion**	Arroz, lechuga	1.6	(Kim <i>et al.</i> , 2007)
Endosulfan	Verduras, te, carne	0.8	(Zhang <i>et al.</i> , 2008)
Carbofuran	Vegetales	3.4	(Zhu <i>et al.</i> , 2008)
Cypermethrin	Aceite de naranja	1.3	(Nichkova <i>et al.</i> , 2009)
Emamectin	Vegetales	0.3	(Kondo <i>et al.</i> , 2009)
Carbaryl	Zumo manzana, pepino,	0.15	(Sun <i>et al.</i> , 2010)
Metolcarb	repollo	1.2	
EPN	Lechuga, repollo	0.3	(Shim <i>et al.</i> , 2010)
Imidaclothiz**	Aguas, suelos, col	17.8	(Fang <i>et al.</i> , 2011)
Triazophos	Vegetales	0.02	(Liang <i>et al.</i> , 2011)
Imidacloprid	Aguas, suelos, vegetales	0.03	(Wang <i>et al.</i> , 2012)
Fungicidas			
Iprovalicarp**	Verduras	0.07	(Lee <i>et al.</i> , 2004)
Chlorothalonil	Verduras, frutas	0.05	(Watanabe <i>et al.</i> , 2006)
Imazalil**	Zumos de frutas	0.06	(Moreno <i>et al.</i> , 2007)
Iprodione	Manzana, pepino, berenjena	0.3	(Watanabe y Miyake, 2007)
PCNB	Aguas, suelos	7	(Xu <i>et al.</i> , 2007)
Hexaconazol**	Zumos de frutas	0.3	(Maclús <i>et al.</i> , 2008)
Thiram	Miel	9	(Girotti <i>et al.</i> , 2008)
Fenhexamid	Mosto, kiwi y fresa	0.04	(Esteve–Turrillas <i>et al.</i> , 2011a)
Azoxystrobin**	Zumos de frutas, mostos	0.017	(Parra <i>et al.</i> , 2012)
Picoxystrobin**	Harinas de cereales	0.1	(Mercader <i>et al.</i> , 2012)

* Calculado en la curva de inhibición realizada en tampón de ensayo ** Resultados no comparados con ningún método cromatográfico.

Una vez propuesto el inmunoensayo y habiendo optimizado todos los parámetros que influyen en el mismo, la determinación de su sensibilidad, precisión, exactitud y aplicabilidad puede realizarse mediante diferentes aproximaciones, bien utilizando muestras dopadas y realizando estudios de recuperación, bien mediante el análisis de muestras de concentración desconocida (de mercado o procedentes de cultivos tratados) y comparación de los resultados con los obtenidos mediante técnicas instrumentales de referencia, generalmente de tipo cromatográfico, siguiendo protocolos oficiales.

En esta fase de validación es necesario aplicar estos procedimientos a un número estadísticamente significativo de muestras y realizar repeticiones. Estos estudios permiten determinar las características analíticas de cada ensayo, como son los límites de detección y de cuantificación, rango de trabajo, exactitud y precisión.

Un problema con el que es habitual encontrarse una vez llegado a este punto es la posibilidad de interferencias provocadas por la matriz a analizar, las cuales pueden ser debidas tanto a diferentes componentes presentes en la muestra como a parámetros fisicoquímicos como el pH. Este denominado “efecto matriz” afecta a la unión del anticuerpo con el analito y con el conjugado, provocando una incorrecta cuantificación de la concentración. Son variadas las soluciones que permiten eliminar el efecto matriz, algunas muy sencillas como la filtración o la dilución de la muestra (Fernández–Alba *et al.*, 1995; Knopp *et al.*, 1999; Esteve–Turrillas *et al.*, 2010), y otras más complejas, como la extracción en fase sólida (SPE) (Brady *et al.*, 1995; Sanvicens *et al.*, 2006) o la cromatografía de inmunoafinidad (Sheedy y Hall, 2001; Şenyuva y Gilbert, 2010; Esteve–Turrillas *et al.*, 2011b).

Hasta la fecha, y aunque Mercader y colaboradores en 2008 describieron la obtención de mAbs para KM y TF empleando haptenos funcionalizados a través del grupo carboxilato del toxóforo, no existen datos bibliográficos de determinación de kresoxim–methyl y trifloxystrobin en muestras agroalimentarias mediante la técnica ELISA.

2. Objetivos de la tesis

La presente Tesis Doctoral se enmarca dentro de la línea de investigación denominada “*desarrollo de inmunoensayos para la determinación de residuos de plaguicidas en alimentos*” adscrita al Departamento de Química Orgánica de la Universidad de Valencia y al Departamento de Biotecnología del Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos. Dentro de esta línea de investigación, el objetivo principal de este trabajo es el desarrollo y optimización de nuevos métodos rápidos, sencillos, económicos y con elevada capacidad de muestreo, basados en la técnica ELISA, capaces de detectar la presencia de dos fungicidas estrobilurínicos, kresoxim–methyl y trifloxystrobin, en muestras agroalimentarias con suficiente sensibilidad y especificidad para satisfacer los LMRs establecidos por la Unión Europea.

La consecución de este objetivo global pasa necesariamente por el cumplimiento de los siguientes objetivos específicos:

1. Síntesis de haptenos para kresoxim-methyl y trifloxystrobin. Se pretende así:

1.1. Preparar un conjunto de derivados funcionalizados que incorporen un brazo espaciador por diferentes posiciones de la molécula de interés, manteniendo la integridad de la estructura, al objeto de abarcar todo el espacio conformacional de la misma.

1.2. Disponer de varios haptenos inmunizantes para la obtención de anticuerpos.

2. Conjugación de los haptenos a diferentes proteínas portadoras y/o enzimas para obtener los correspondientes conjugados inmunogénicos, conjugados de ensayo necesarios en el formato de ELISA de conjugado inmovilizado y trazadores enzimáticos para el formato de ELISA de anticuerpo inmovilizado.

3. Inmunización de distintas especies de animales de experimentación con los conjugados proteicos preparados para cada analito al objeto de obtener diferentes tipos de inmunorreactivos. Para ello, se pretende:

3.1. Utilizar conejos para la obtención de anticuerpos policlonales.

3.2. Utilizar ratones para la producción de anticuerpos monoclonales mediante la tecnología de generación de hibridomas.

4. Caracterización de los anticuerpos empleando las herramientas analíticas anteriormente mencionadas. Con ello, se pretende:

4.1. Evaluar la respuesta inmune global empleando los anticuerpos policlonales.

4.2. Caracterizar los anticuerpos monoclonales con el objetivo principal de desarrollar sistemas de inmunodetección individuales para cada fungicida.

4.3. Investigar la influencia ejercida por la estructura del hapteno inmunizante, relativa a la posición de funcionalización, sobre la afinidad de los anticuerpos.

4.4. Evaluar la influencia de la heterología de hapteno sobre la sensibilidad de los inmunoensayos.

4.5. Determinar la especificidad de los anticuerpos monoclonales obtenidos mediante estudios de reactividad cruzada con una batería de compuestos químicos relacionados con kresoxim–methyl y trifloxystrobin (análogos estructurales, metabolitos, estrobilurinas y otros fungicidas). Para ello, se pretende:

4.5.1. Sintetizar una batería de análogos estructurales de kresoxim–methyl y trifloxystrobin.

4.5.2. Identificar las partes de la molécula más implicadas en la interacción con cada anticuerpo monoclonal.

4.5.3. Evaluar conceptos básicos relacionados con la influencia del hapteno inmunizante en la especificidad de los anticuerpos (principio de Landsteiner).

4.6. Selección de inmunoensayos específicos para cada analito.

5. Optimización de los inmunoensayos seleccionados mediante la evaluación de diferentes parámetros de ensayo (pH, fuerza iónica, concentración de disolvente y tolerancia de disolventes).

6. Validación de los inmunoensayos optimizados mediante la determinación de kresoxim–methyl y trifloxystrobin en muestras fortificadas y en muestras agroalimentarias, así como la comparación de los mismos con un método de referencia cromatográfico.

3. Resultados y discusión

3.1. Diseño de haptenos: planteamiento general

La etapa inicial, especialmente crítica en el desarrollo de inmunoensayos para compuestos de pequeña masa molecular, implica el diseño y la síntesis de haptenos. La gran importancia que se le atribuye a esta etapa radica en el hecho de que la afinidad y la especificidad de los anticuerpos generados, y por lo tanto la sensibilidad y selectividad de los inmunoensayos, dependen de la estructura del hapteno inmunizante (Goodrow *et al.*, 1995; Goodrow y Hammock, 1998). El diseño de haptenos debe realizarse tomando como criterio que el derivado funcionalizado mantenga en la medida de lo posible la mayoría de las características fisicoquímicas de la molécula original, maximizando la similitud estérica, electrónica e hidrofóbica del analito, así como la geometría espacial de su estructura química (Suárez–Pantaleón *et al.*, 2010; Mercader *et al.*, 2011; Parra *et al.*, 2011a). En este sentido, y tal como se expuso en el **apartado 1.6.1** de la introducción, un hapteno adecuado debería preservar la integridad de la estructura y todos los grupos funcionales del analito diana, incorporando el brazo espaciador en posiciones que provoquen los mínimos cambios electrónicos y conformacionales.

Como se ha comentado anteriormente, las técnicas de modelización molecular pueden resultar útiles en el diseño de los haptenos, pero el diseño del “hapteno perfecto” sigue siendo todavía hoy en día un reto. Tanto en el caso de KM como de TF se trata de moléculas con una estructura muy flexible, que se encuentran a la temperatura fisiológica de los animales de inmunización en un rápido equilibrio conformacional en el que coexisten numerosos confórmeros de energía muy semejante (ver estructura tridimensional del confórmero más estable de cada analito en **Figura 3.1**)

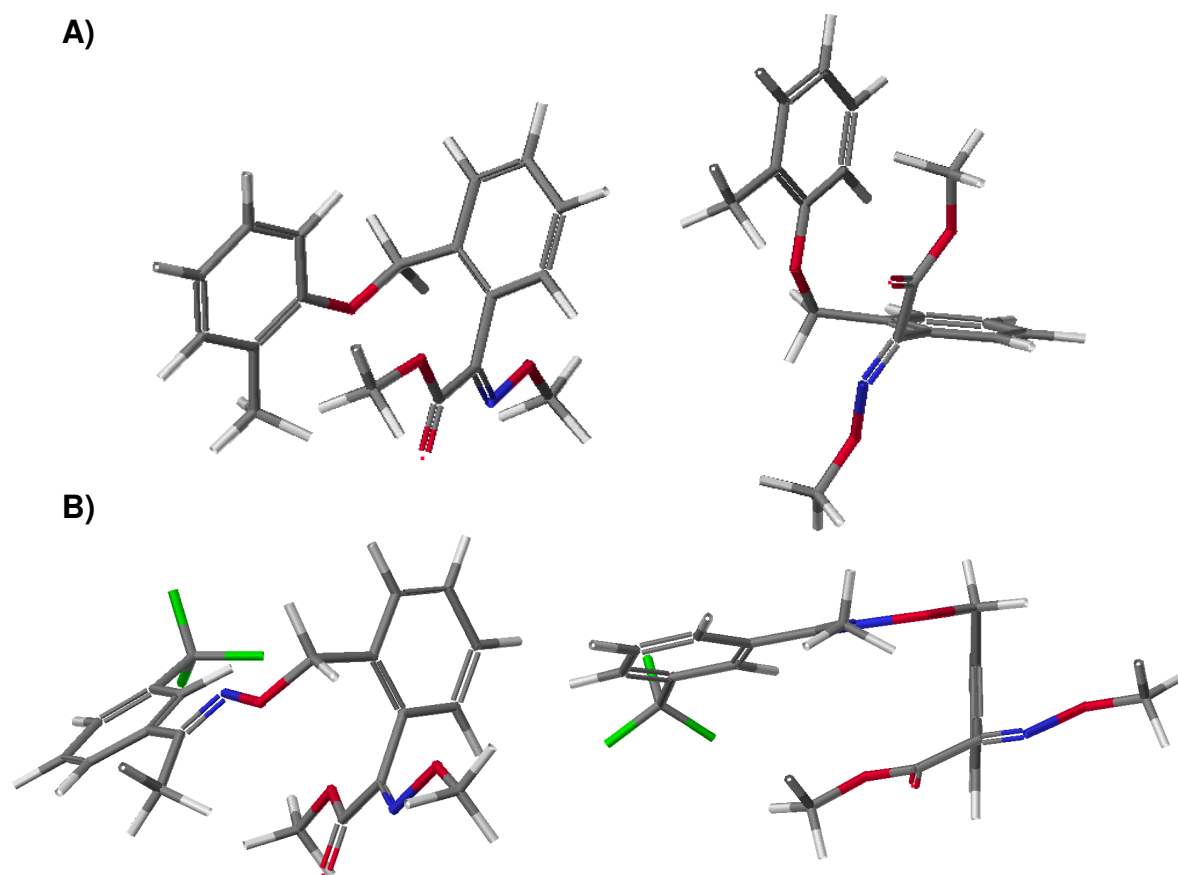


Figura 3.1. Dos vistas de la conformación más estable de KM (**A**) y TF (**B**). La búsqueda de la conformación más estable se realizó usando el método de mecánica molecular MM3 disponible en el programa CAChe (CAChe Work System Pro, Version 7.5.0.85, Fujitsu Ltd: Tokyo, Japan, 2000–2006). Para determinar la conformación más estable todos los enlaces rotables se hicieron girar en pasos de 24° . Los elementos están representados de la siguiente forma: Hidrógeno, blanco; Carbono, gris; Oxígeno, rojo; Nitrógeno, azul y Flúor, verde

En estos casos no es fácilmente previsible qué posición del analito es la más adecuada para anclarlo a la proteína portadora, al objeto de que se produzca la mejor exposición de todo el esqueleto molecular al sistema inmune. En consecuencia, resulta importante disponer de un conjunto de haptenos que mimeticen al analito de interés, incorporando el brazo espaciador en diferentes posiciones del esqueleto de la molécula, lo que redundaría en una mayor versatilidad de exposición del antígeno al sistema inmune. Adicionalmente, disponer de diversos haptenos análogos, regioisoméricos o análogos de posición en este caso, posibilita su utilización en los conjugados de ensayo heterólogos, con las ventajas que ello puede suponer en el desarrollo de inmunoensayos.

En base a estas consideraciones, se diseñaron cinco haptenos regioisoméricos para KM y seis para TF. Los cinco haptenos de KM (**23**); KMa6 (**74**), KMb6 (**75**), KMc6 (**76**), KMe6 (**77**) y KMo6 (**78**) cubren todo el mapa de la molécula, es decir, los dos anillos aromáticos y el grupo toxóforo (**Figura 3.2**).

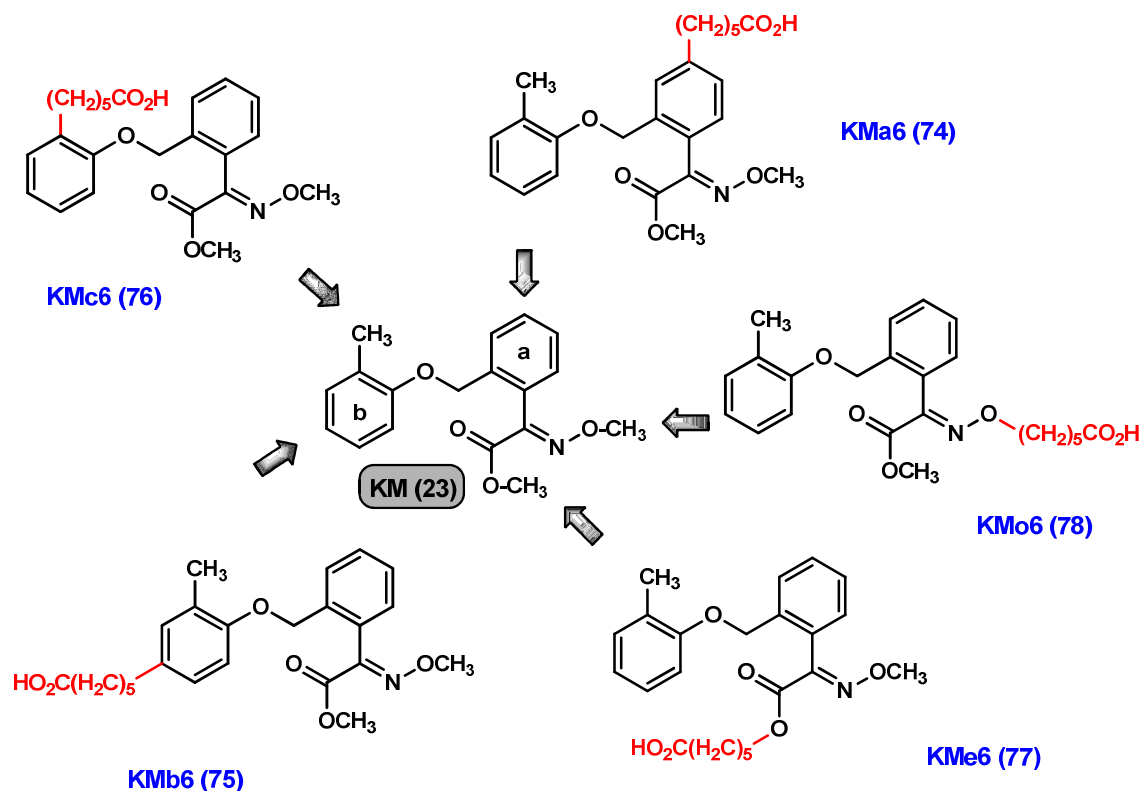


Figura 3.2. Haptenos regioisoméricos para KM. Las letras **a**, **b**, y **c** hacen referencia al anillo fenílico, al anillo de tolilo y al grupo metílico del tolilo, respectivamente, y las letras **e** y **o** al oxígeno del éster y al oxígeno del grupo metoxiimino del grupo toxóforo. El número 6 hace referencia al número de átomos de carbono del brazo espaciador.

En cuanto a los seis haptenos de TF (**24**); TFa6 (**79**), TFb6 (**80**), TFc6 (**81**), TFe6 (**82**), TFo6 (**83**) y TFf6 (**84**), además de abarcar los dos anillos aromáticos y el grupo toxóforo, también se cubre la parte central de la molécula, ya que en el hapteno TFc6 la cadena se introduce por la posición metilénica del grupo etileneaminóxido puente (**Figura 3.3**).

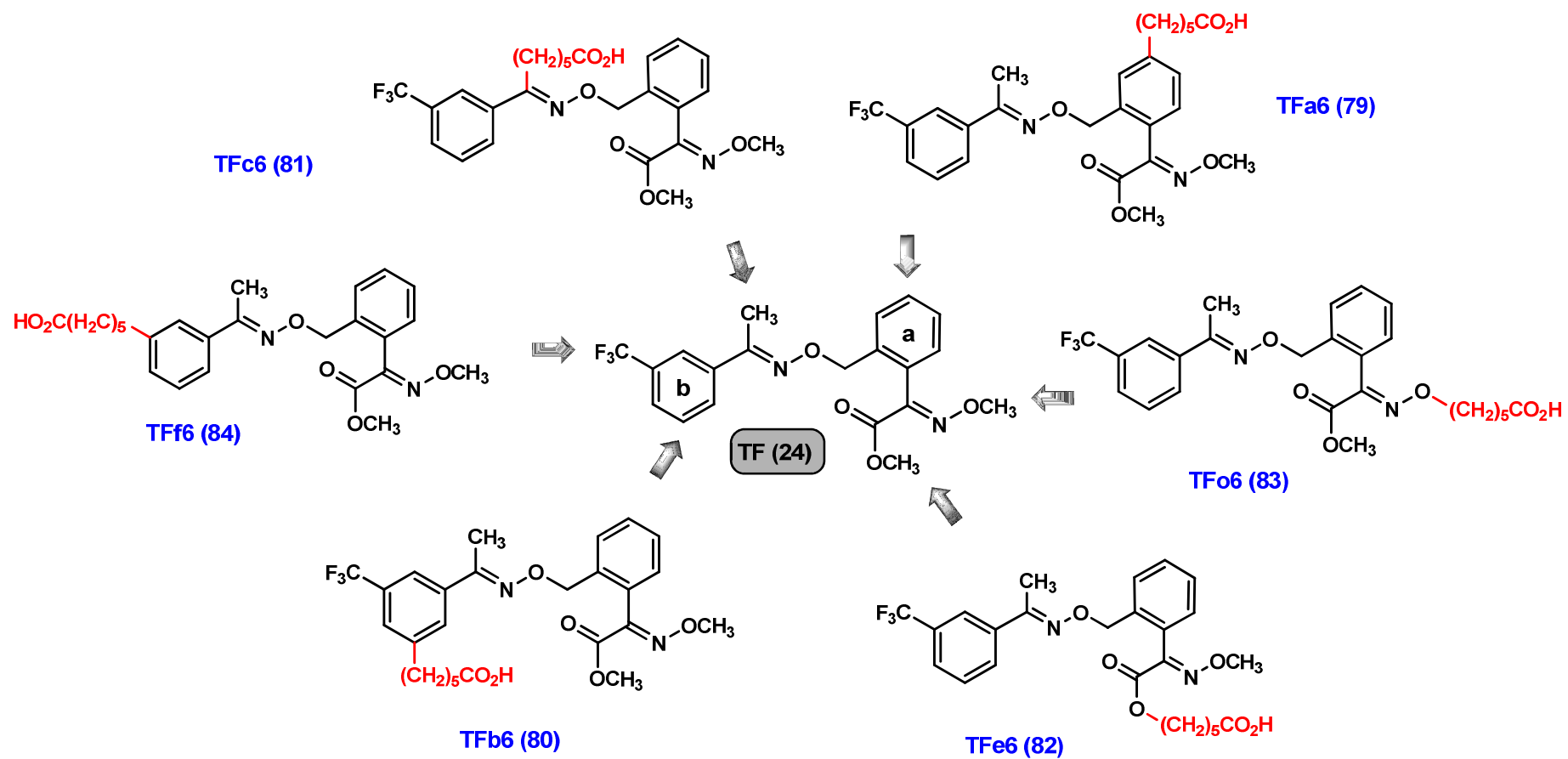


Figura 3.3. Haptenos para TF. Las letras **a**, **b**, **c**, **e**, **o** y **f** hacen referencia al anillo fenílico del toxóforo, al anillo aromático trifluorometilado, al metilo del grupo etilenoaminóxilo, al oxígeno del éster, al oxígeno del grupo metoxiimino y al sustituyente trifluorometilo, respectivamente. El número 6 hace referencia al número de átomos de carbono del brazo espaciador.

En todos los haptenos diseñados se mantiene intacta la estructura completa y los grupos funcionales característicos de KM y TF, diferenciándose exclusivamente en la posición en la que se incorpora el brazo espaciador. En todos los casos se escogió como brazo espaciador una cadena hidrocarbonada saturada de seis átomos de carbono, carente de elementos inmunogénicos y con un grupo carboxilo terminal. De esta forma se asegura, por un lado, que la longitud de la cadena sea suficientemente larga para que ninguna parte del hapteno quede oculta por su proximidad a la proteína portadora (BSA) y, por otro lado, que sea lo bastante corta como para evitar que se pliegue sobre el resto de la estructura, lo que dificultaría la exposición del hapteno al sistema inmune.

Con el objetivo de no introducir modificaciones electrónicas importantes, la incorporación de la cadena hidrocarbonada se realizó siempre mediante enlaces simples C–C, en posiciones originariamente ocupadas por enlaces C–H. El brazo espaciador no contiene elementos inmunogénicos para evitar que se desvíe la respuesta inmunológica hacia la cadena en lugar de hacia la estructura del analito (Vallejo *et al.*, 1982). Para ello, se evitaron las conexiones a través de oxígeno, nitrógeno, enlaces múltiples, enlaces tipo éster o aminas, más comúnmente utilizados en síntesis de haptenos (Tessier y Clark, 1999; Hungerford *et al.*, 2006; Xu *et al.*, 2007; Mercader *et al.*, 2008c; Mercader y Abad–Fuentes, 2009).

Por otro lado, para no modificar las propiedades estéricas, el brazo espaciador se incorporó en la posición más alejada de los grupos funcionales principales de ambos fungicidas. De tal forma que la cadena siempre se situó en posición *meta* o *para*, pero nunca en *orto*, cuando se introduce en un anillo aromático. De este modo, el mínimo impedimento estérico que se genera entre la cadena hidrocarbonada del espaciador y el resto de la estructura del hapteno, posibilita la presentación de las conformaciones del mismo equivalentes a las más estables del analito durante la respuesta inmunológica. Este factor es muy importante, ya que se han descrito casos en los que la introducción de la cadena en posiciones muy cercanas a otros grupos funcionales da lugar a la generación de peores anticuerpos (Karu *et al.*, 1994).

Este tipo de estrategia permite una amplia diversidad de orientaciones en las cuales el antígeno puede presentarse al sistema inmune, aumentando las posibilidades de generación de anticuerpos de elevada afinidad, y según el principio de Landsteiner, muy diferentes especificidades. Es de esperar, por lo tanto, que las diferencias en la afinidad y especificidad de los anticuerpos producidos sean debidas únicamente a la posición de la cadena en el hapteno, permitiendo investigar la influencia de dicha posición sobre las características de los anticuerpos producidos.

Adicionalmente, con el objetivo de indagar aún más sobre la influencia que ejerce el brazo espaciador en las características de los anticuerpos generados, se decidió abordar la síntesis de los dos haptenos que aparecen en la **Figura 3.4**. Como se observa, el hapteno TF0 (**71**) no presenta brazo espaciador mientras que el hapteno TFt6 (**85**) presenta un triple enlace como nexo de unión del brazo espaciador al anillo aromático (**b**) de TF, un elemento estructural que introduce rigidez en la posición de unión del espaciador y que fuerza al mismo a alejarse del resto de la estructura del hapteno, contribuyendo, posiblemente, a una mejor separación del hapteno de la proteína en el correspondiente conjugado.

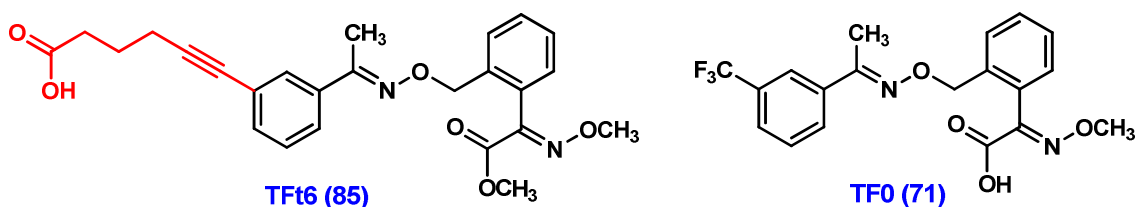


Figura 3.4. Haptenos TF0 y TFt6 de TF

Además, todos los haptenos serán utilizados para la preparación de diferentes conjugados de ensayo, mediante el acoplamiento de los mismos tanto con la proteína OVA como con la enzima HRP. Por lo tanto, es de esperar que el uso de esta amplia batería de competidores heterólogos desemboque en la obtención de ensayos de elevada sensibilidad.

Debe resaltarse que el diseño de los haptenos para ambos analitos ha estado basado exclusivamente en los argumentos mencionados en los párrafos previos, con independencia de las posibles dificultades que desde el punto de

vista sintético pueda representar su preparación, priorizando por lo tanto la potencial idoneidad de sus características estructurales como inmunógenos frente a las posibles dificultades de su síntesis.

De hecho, salvo en el caso del hapteno que no presenta cadena hidrocarbonada (TF0) y los haptenos que incorporan el brazo espaciador por el éster metílico del grupo toxóforo (haptenos KMe6 y TFe6), que se pueden obtener directamente a partir de los fungicidas comerciales, vía hidrólisis previa del éster metílico, la preparación del resto de haptenos de KM y de TF ha requerido un trabajo sintético importante, habiéndose abordado por síntesis total a partir de productos sencillos comerciales.

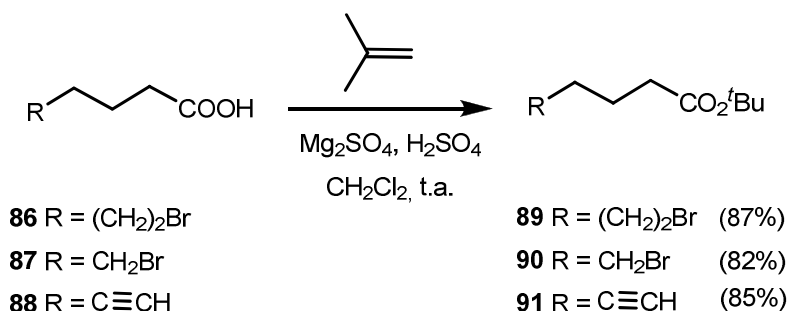
En los siguientes apartados se describe con detalle la síntesis de cada uno de los haptenos diseñados, aunque previamente se hace una breve referencia a la preparación de los diferentes equivalentes sintéticos del brazo espaciador que son utilizados en la incorporación de los mismos a los diferentes haptenos.

3.1.1. Preparación de los brazos espaciadores

Los equivalentes sintéticos de brazo espaciador presentan el grupo carboxílico terminal protegido, ya que muchas etapas de la síntesis de los haptenos implican condiciones en las que el grupo ácido carboxílico puede interferir. El grupo protector elegido fue el éster *terc*-butílico, dada su fácil desprotección en condiciones ácidas suaves que permite liberar el ácido carboxílico al final de la síntesis mediante condiciones compatibles con el resto de agrupaciones funcionales de los haptenos, en especial con la agrupación (*E*)-metoxi-(1-metoxiimino)-2-oxoetilo (grupo toxóforo), tal como se comprobó previamente sometiendo a KM y TF a este tipo de tratamiento ácido.

Para abordar la síntesis de los diferentes haptenos se prepararon previamente los ésteres *terc*-butílicos siguientes: 6-bromohexanoato de *terc*-butilo (**89**), 5-bromopentanoato de *terc*-butilo (**90**) y hex-5-inoato de *terc*-butilo (**91**), que se obtuvieron por esterificación de los ácidos comerciales 6-bromohexanoico (**86**), 5-bromopentanoico (**87**) y hex-5-inoico (**88**), respectivamente. La preparación de los mismos se llevó a cabo a través de la esterificación del grupo carboxílico de los correspondientes ácidos comerciales

utilizando isobuteno gas y como catalizador ácido sulfúrico adsorbido sobre MgSO_4 anhidro (Le Brazidec *et al.*, 2005) (**Esquema 3.1**).



Esquema 3.1

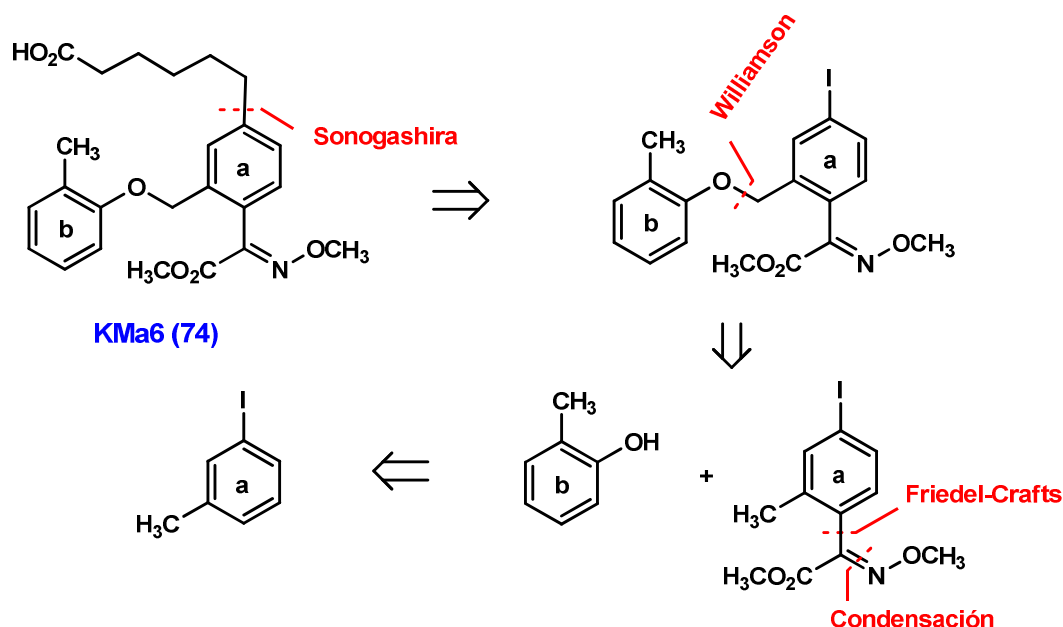
3.1.2. Síntesis de haptenos para kresoxim–methyl

Inicialmente existen diversas aproximaciones sintéticas que podrían seguirse para la preparación de los haptenos diseñados para KM (**Figura 3.1**). En principio, la preparación del hapteno KMe6 (**77**) se puede completar a partir del propio KM, recurriendo previamente a la hidrólisis de la agrupación éster metílico del grupo toxóforo, para posteriormente incorporar la cadena hidrocarbonada a través de una alquilación del carboxilato libre con el haluro de alquilo adecuado. La preparación del hapteno KMb6 (**75**) también parece posible abordarla a partir del fungicida comercial, aprovechando la mayor reactividad del anillo de tolilo frente a electrófilos. Para los otros tres haptenos, KMa6 (**74**), KMc6 (**76**) y KMo6 (**78**), es necesario recurrir a la síntesis total, para lo que nos hemos basado en las síntesis previas de KM y sistemas relacionados que se encuentran descritas en la literatura y que han sido comentadas en la introducción (**apartado 1.2.1.2**).

3.1.2.1. Síntesis del hapteno KMa6

Tal como se recoge en el **Esquema 3.2**, para la preparación del hapteno KMa6 (**74**) utilizamos como materiales de partida el 3–yodo–tolueno, que constituye el anillo arílico **a** de la estructura final, y el *o*–cresol, que se incorpora como anillo **b** del hapteno. La unión de los dos fragmentos arílicos se lleva a cabo a través de la alquilación de la posición bencílica con el fenol. El brazo espaciador se introduce mediante una reacción de acoplamiento cruzado

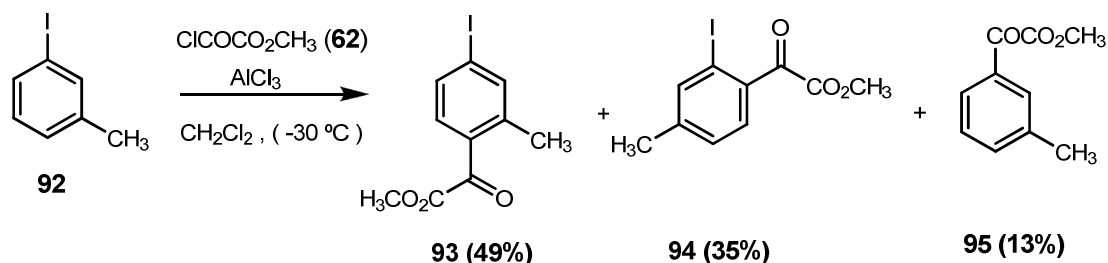
tipo Sonogashira y la incorporación de la agrupación acetato de metoxi-imino (grupo toxóforo) se lleva a cabo en dos etapas, primero una acilación de Friedel-Crafts para obtener un α -cetoéster arílico (Meng *et al.*, 2008), seguido de la condensación del carbonilo cetónico con metoxiamina.



Esquema 3.2. Análisis retrosintético para la preparación del hapteno KMa6

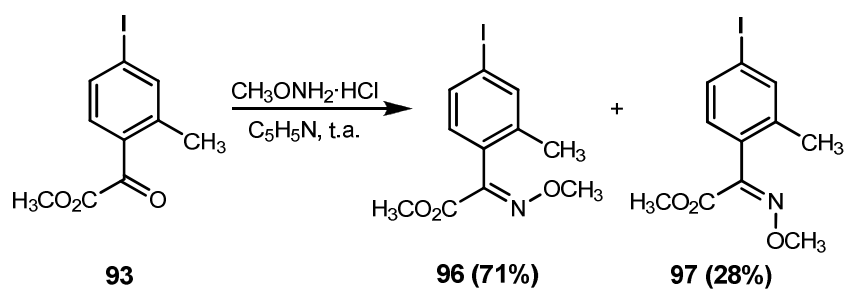
La síntesis del hapteno KMa6 (**74**) se inició con la incorporación del grupo toxóforo en el anillo arílico **a**. En primer lugar, se llevó a cabo una reacción de S_EAr entre el 3-iodotolueno (**92**) y el cloro-oxoacetato de metilo (**62**) para obtener el α -cetoéster arílico (**93**) utilizando $AlCl_3$ como catalizador (**Esquema 3.3**). La reacción tiene lugar a través del catión acilo intermedio que se genera a partir del cloruro de acilo y el ácido de Lewis. Como se muestra en el **Esquema 3.3**, la reacción de acilación no es selectiva, originándose una mezcla de los dos regioisómeros posibles, **93** y **94**, y el producto resultante de sustitución del átomo de yodo por el grupo acilo (**95**). Los tres productos fueron separados cromatográficamente e identificados inequívocamente por métodos espectroscópicos. El regioisómero requerido, *i.e.* **93**, aislado con casi un 50% de rendimiento, presenta un patrón de acoplamiento en el espectro de RMN de 1H y un espectro de RMN de ^{13}C acorde con lo esperado para este tipo de sustitución. Particularmente relevante resulta el valor de desplazamiento

químico de los protones del sustituyente metilo, ya que en **94** aparecen a δ 2.36 ppm, mientras que para **93** aparecen a mayor desplazamiento químico (2.53 ppm), debido principalmente a la presencia en **93** del grupo ceto-éster en *orto*, que provoca un mayor desapantallamiento de dichos protones.



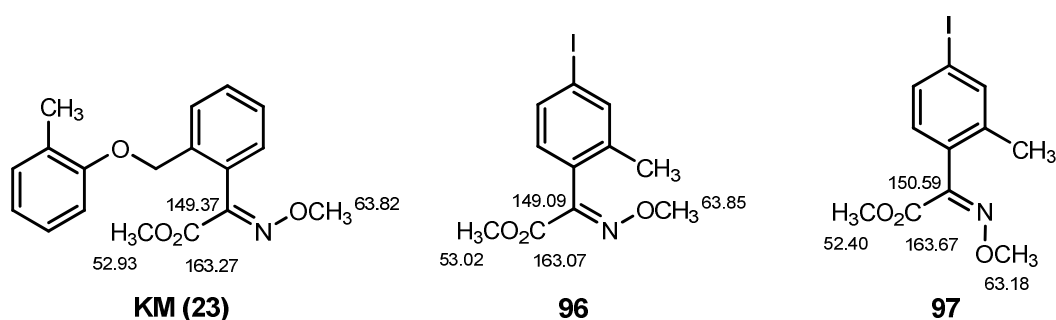
Esquema 3.3

La agrupación (*E*)-metoxi-(1-alcoxiimino)-2-oxoetilo se completó a partir del α -cetoéster arílico **93**, siguiendo procedimientos previamente descritos (Rossi *et al.*, 1999) que implican la condensación de **93** con exceso de clorhidrato de *N*-metoxihidroxilamina, empleando piridina como base y disolvente, a temperatura ambiente (**Esquema 3.4**). Como suele ser habitual para este tipo de condensación cuando se lleva a cabo a temperatura ambiente, la reacción es estereoselectiva, conduciendo a una mezcla 3:1 de los dos estereoisómeros geométricos *E* y *Z*, **96** y **97** respectivamente. La diferencia de polaridad entre los dos estereoisómeros es lo bastante grande como para efectuar una separación total de ambos productos sin dificultad. Tal como es habitual para este tipo de isómeros geométricos, el isómero *Z* es menos polar que el *E*, eluyéndose en primer lugar en el proceso cromatográfico. En nuestro caso, los isómeros *E* y *Z* se obtuvieron con un 71% y 28% de rendimiento, por lo que el rendimiento global de la reacción de condensación puede considerarse prácticamente cuantitativo.



Esquema 3.4

La estereoquímica del enlace imínico de ambos isómeros pudo asignarse a través de la comparación de los espectros de RMN de ^{13}C de ambos isómeros entre sí y con el de KM (**Figura 3.5**). Como se observa en otros compuestos con una agrupación funcional similar (Rossi *et al.*, 1999), existe una pequeña pero significativa diferencia entre los desplazamientos químicos del metilo oxiiimínico de ambos isómeros, que aparece a valores ligeramente mayores en el isómero *E* (entre 63.3 y 63.9 ppm) que en el *Z* (entre 62.8 y 63.3), mientras el desplazamiento químico correspondiente al carbono imínico (C=N) se observa a valores ligeramente menores en el isómero *E* (entre 147.0 y 149.4 ppm) que en el *Z* (entre 147.2 y 150.7 ppm).

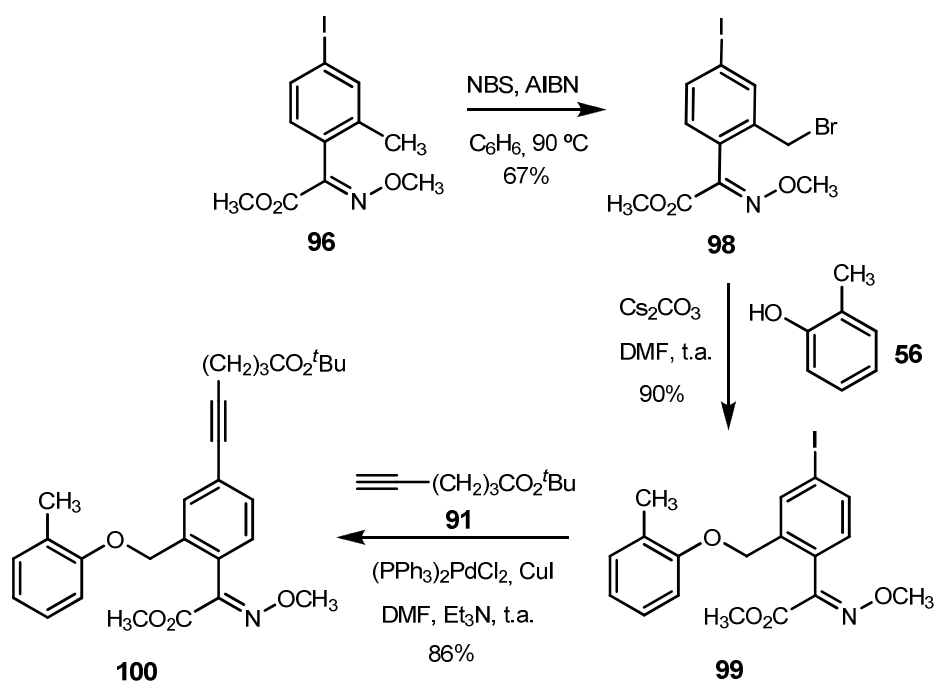
Figura 3.5. Asignación de la estereoquímica de los isómeros geométricos **96** y **97**

Una vez obtenido el intermedio **96**, se llevó a cabo la bromación de la posición bencílica mediante una halogenación radicalaria, empleando como fuente de bromo *N*-bromosuccinimida (NBS) y como iniciador de radicales azobisisobutironitrilo (AIBN) a reflujo de benceno (Li *et al.*, 2009). La reacción proporcionó el bromuro bencílico **98** con un rendimiento del 67% (**Esquema 3.5**). Diversos intentos de incrementar el rendimiento de la reacción de bromación, bien aumentando el tiempo de reacción, modificando el

disolvente utilizado o incrementando la cantidad de NBS utilizada, no condujeron a resultados satisfactorios. En general, cuando se intenta forzar las condiciones de la reacción de bromación radicalaria, se produce una disminución del rendimiento aislado del bromuro bencílico **98** a costa de la formación de productos de dibromación y tribromación. De la reacción también se aíslan, aunque en muy pequeña cantidad, los productos de sustitución del átomo de iodo arílico por bromo, un intercambio de halógeno que también se ha observado en situaciones similares (Amijs *et al.*, 2003).

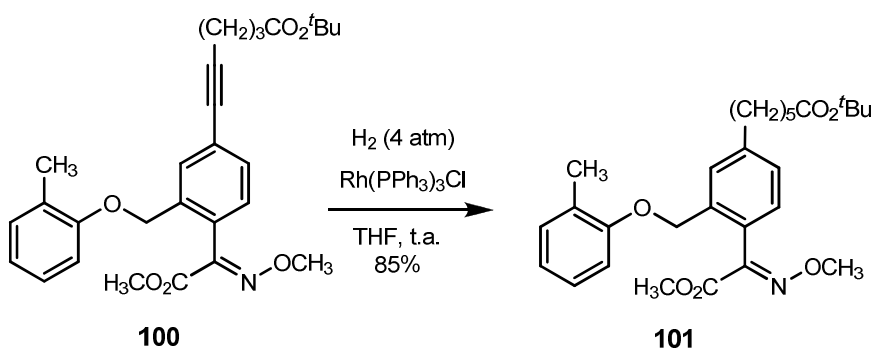
A continuación, se llevó a cabo la reacción de Williamson entre el bromuro bencílico **98** y *o*-cresol (**56**), reacción que completa la estructura biarílica de KM. En esta reacción se emplearon condiciones básicas suaves, Cs₂CO₃ en DMF a temperatura ambiente, obteniéndose el éter intermedio **99** con un excelente rendimiento (**Esquema 3.5**). Es de resaltar la elevada capacidad catalítica de las bases de cesio en este tipo de procesos (Dueno *et al.*, 1999). Las mismas, como en este caso el Cs₂CO₃, han demostrado ser muy eficaces en la síntesis de éteres debido a sus particulares propiedades físicas y químicas (alta solubilidad en variedad de disolventes orgánicos, basicidad adecuada y buena estabilidad).

Por otra parte, para incorporar el brazo espaciador se escogió una reacción de acoplamiento cruzado tipo Sonogashira, catalizada por paladio, entre el yoduro arílico **99** y el alquino terminal **91** como equivalente sintético del brazo espaciador ácido. Para llevar a cabo esta reacción se han descrito infinidad de condiciones (Chinchilla y Najera, 2007; Nagumo *et al.*, 2009). En nuestro caso se utilizó Pd(PPh₃)₂Cl₂ como especie pre catalizadora de Pd(0) y CuI como co-catalizador, trietilamina (Et₃N) como base nitrogenada y DMF como disolvente. En estas condiciones el acoplamiento transcurrió con gran eficiencia, permitiendo obtener el intermedio funcionalizado **100** con un rendimiento del 86% después del correspondiente proceso cromatográfico (**Esquema 3.5**).



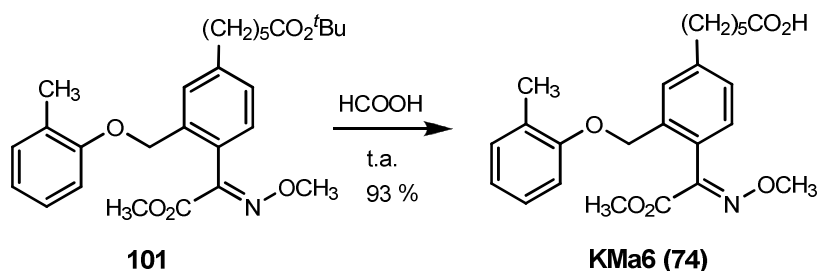
Esquema 3.5

La cadena saturada que constituye el brazo espaciador del hapteno se completó vía hidrogenación del triple enlace del intermedio alquínico **100**, la cual se efectuó en condiciones homogéneas utilizando el catalizador de Wilkinson ($\text{Rh}(\text{PPh}_3)\text{Cl}$) en THF a una presión de hidrógeno de 4 atmósferas, para obtener el derivado **101** con elevado rendimiento (**Esquema 3.6**).



Esquema 3.6

La síntesis del hapteno KMa6 (**74**) se completó con buen rendimiento por hidrólisis del grupo éster *tert*-butílico de **101** con ácido fórmico a temperatura ambiente (**Esquema 3.7**), condiciones ácidas muy suaves que son necesarias para el éxito del proceso ya que la agrupación acetato de metoxi-imino es bastante sensible a condiciones ácidas o básicas más energéticas.

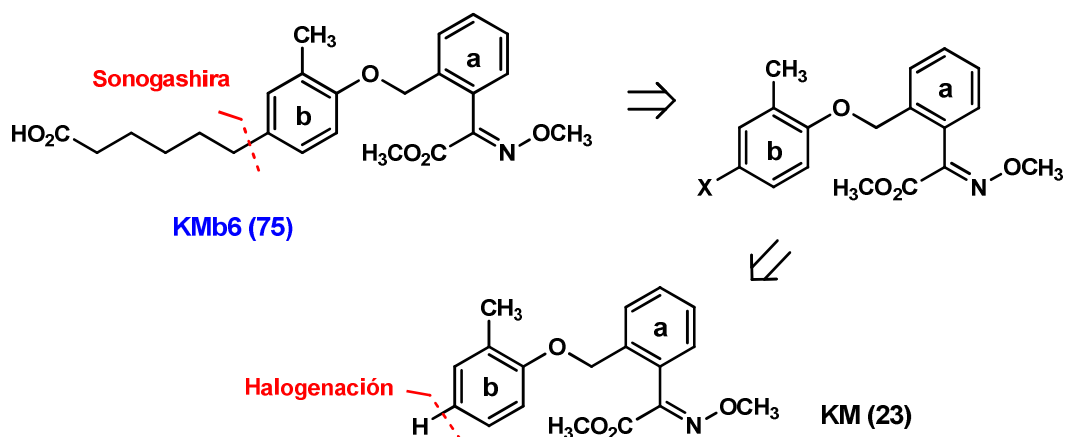


Esquema 3.7

En resumen, la síntesis del hapteno KMa6 fue posible a través de la ruta propuesta que implica siete etapas que transcurren con un rendimiento global aproximado del 15%.

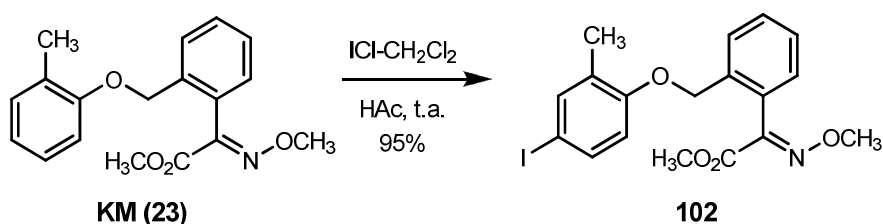
3.1.2.2. Síntesis del hapteno KMb6

En principio, la forma más simple y rápida de acceder al hapteno KMb6 (75) sería a partir del propio KM, para lo que se requiere simplemente introducir la cadena hidrocarbonada directamente sobre la posición deseada del anillo arílico **b** (Esquema 3.8). En principio, esta posibilidad es factible de realizar ya que el anillo de toliilo (**b**) está más activado para reacciones de sustitución electrofílica aromática que el anillo **a**, lo que permitiría introducir un átomo de halógeno en la posición *para* a la función oxigenada, para posteriormente incorporar la cadena hidrocarbonada a través de una reacción de Sonogashira, de forma análoga a como se introduce en el hapteno KMa6.



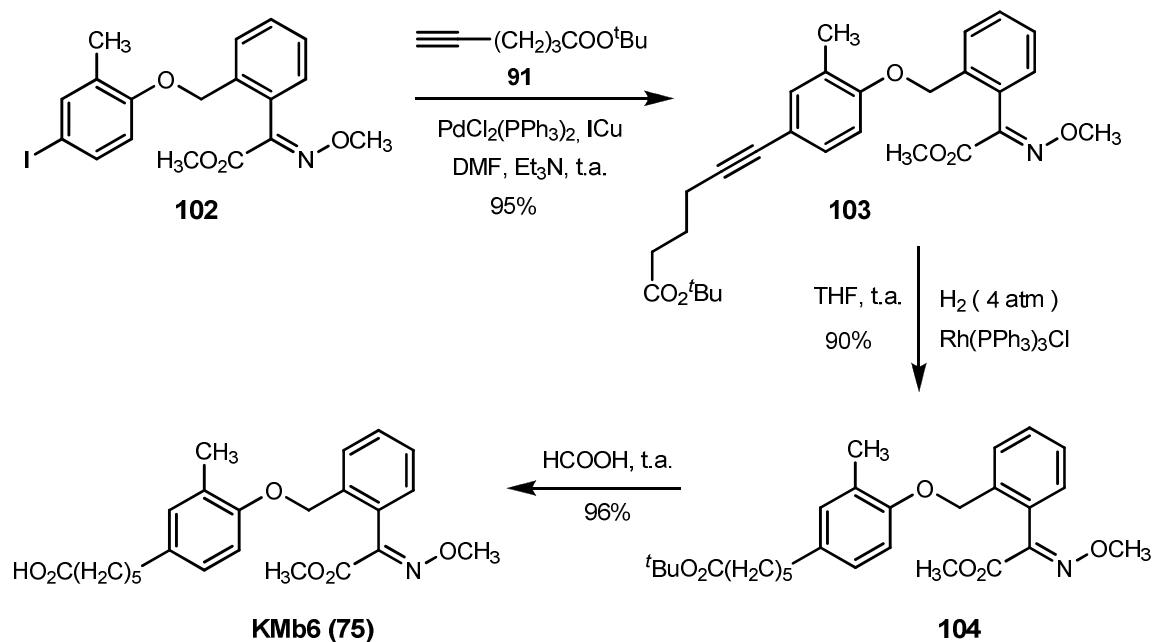
Esquema 3.8. Análisis retrosintético para la preparación del hapteno KMb6

Para llevar a cabo la halogenación de KM se emplearon condiciones utilizadas en la yodación de dihidrobenzofuranos (Walser *et al.*, 1991), y que implican el uso de ICl (disolución 1M en CH₂Cl₂) como fuente de yodo electrófilo y ácido acético como disolvente a temperatura ambiente. El papel del ácido acético en la reacción es esencial, ya que no sólo actúa como disolvente sino también como catalizador favoreciendo la formación del ión yodonio (I⁺) que actúa como electrófilo. La reacción es altamente regioselectiva debido al efecto *para* dirigente del sustituyente oxigenado, obteniéndose de forma exclusiva el yoduro arílico **102** (Esquema 3.9). La incorporación del yodo en la posición indicada se comprobó de forma inequívoca a partir del análisis de los datos espectroscópicos de RMN de ¹H y ¹³C. Así, por ejemplo, el espectro de RMN de ¹H de **102** muestra que el protón en *meta* al iodo aparece a δ 6.52 ppm como un doblete ($J = 8.6$ Hz), sólo compatible con dicho patrón de sustitución en el anillo de toliolo.



Esquema 3.9

Una vez introducido el átomo de yodo en la posición deseada fue posible realizar la reacción de acoplamiento cruzado tipo Sonogashira catalizada por paladio con el hex-5-ionato de *terc*-butilo (**91**). Bajo condiciones similares a las previamente empleadas en la preparación del compuesto **100**, se pudieron acoplar eficientemente **102** y **91** para obtener al alquino arílico **103** con un rendimiento prácticamente cuantitativo.



Esquema 3.10

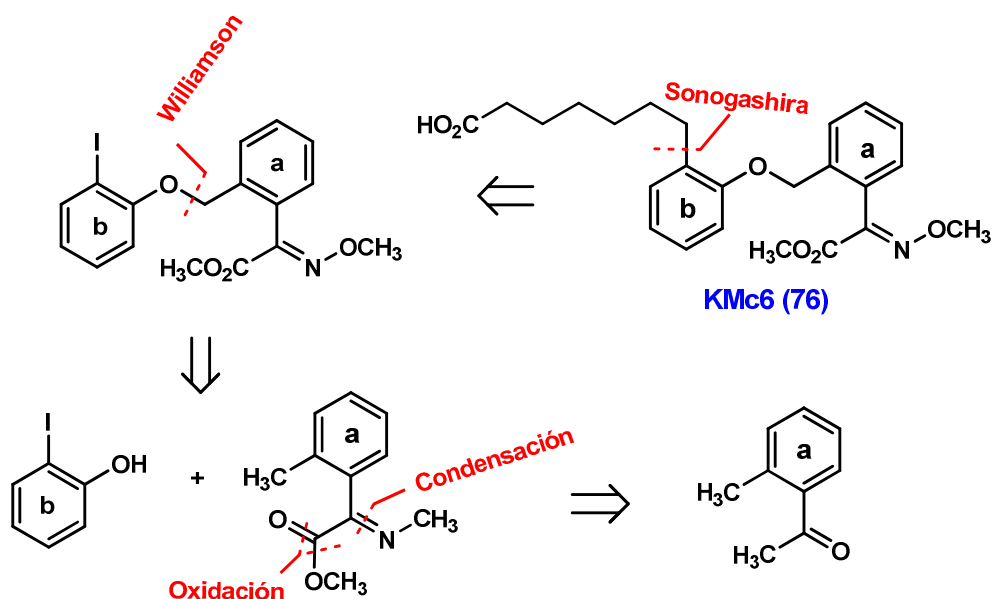
Llegados a este punto, la preparación del hapteno KMb6 (75) se completó sin mayores problemas y muy eficazmente mediante una hidrogenación en fase homogénea del triple enlace, usando el catalizador de Wilkinson, y posterior hidrólisis del éster *tert*-butílico 104 en condiciones ácidas suaves (Esquema 3.10).

La síntesis del hapteno KMb6 resulta extremadamente simple y eficaz a través de esta aproximación que utiliza KM como material de partida, requiriéndose solamente cuatro etapas y obteniéndose el hapteno con un rendimiento global del 78%.

3.1.2.3. Síntesis del hapteno KMc6

La propuesta de síntesis para el hapteno KMc6 (76) es análoga a la del hapteno KMa6; en este caso, el brazo espaciador se incorpora en el anillo arílico **b**, en *orto* a la función etér del sistema biarílico del hapteno (Esquema 3.11). La etapa clave es la oxidación de la 2-metilacetofenona al correspondiente α -cetoácido, que permite introducir la agrupación 2-metoxi-1-(metoxiimino)-2-oxoetilo a través de la formación del correspondiente α -cetoéster. Como para la mayoría de haptenos, el sistema bifenílico se completa por reacción de Williamson entre los anillos arílicos **a** y **b**

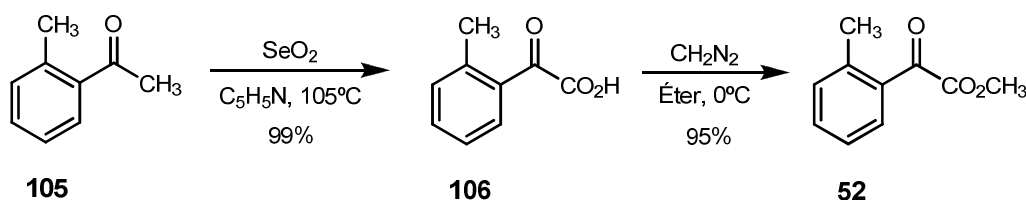
y el brazo espaciador se introduce vía una reacción de acoplamiento de Sonogashira.



Esquema 3.11. Análisis retrosintético para la preparación del hapteno KMc6

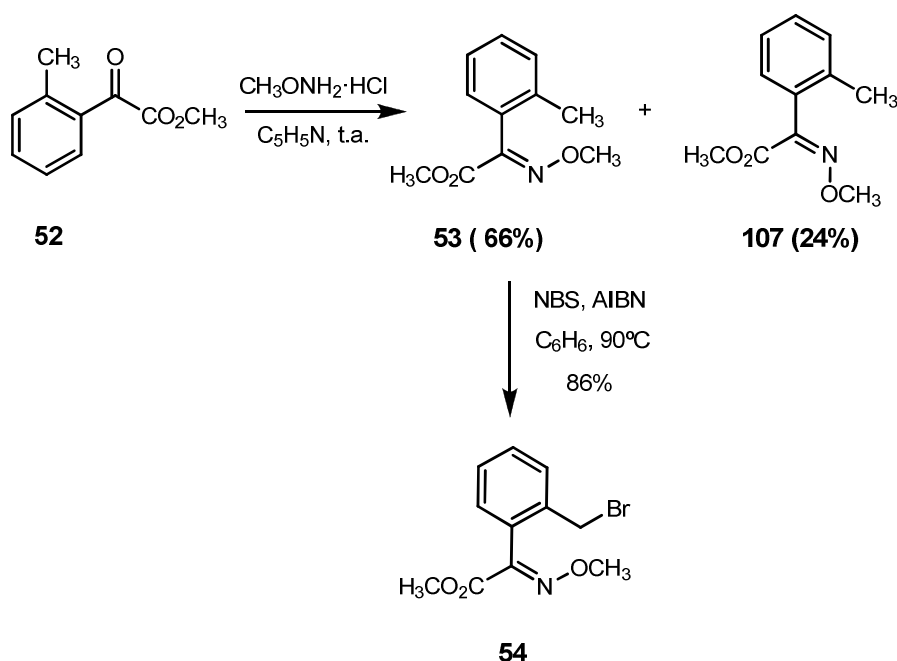
Así, la primera etapa de la síntesis del hapteno regioisomérico KMc6 (**76**) requirió la preparación previa del sintón correspondiente al anillo fenílico **a**. El primer paso para la preparación de este intermedio fue la oxidación del grupo metilo de la acetofenona **105** al correspondiente ácido carboxílico (**Esquema 3.12**), para lo que se recurrió al procedimiento utilizado por Beebe *et al.* (2003), para la transformación de acetofenonas en α -cetoácidos por oxidación con dióxido de selenio en piridina o bien permanganato potásico. Un procedimiento similar había sido también utilizado previamente en 1998 por Tayler y colaboradores para la obtención de productos intermedios en la síntesis de haptenos derivados de α -cetoamidas (Taylor *et al.*, 1998). En nuestro caso, y para evitar la posible oxidación del grupo metilo bencílico, la transformación de la acetofenona comercial **105** en el α -cetoácido **106** se llevó a cabo usando dióxido de selenio como agente oxidante. Para que se completara la reacción fue necesario calentarla durante toda la noche a 110 °C, pero la reacción se produjo con una gran eficiencia proporcionando el correspondiente α -cetoácido con un rendimiento cuantitativo. El ácido obtenido no requirió purificación y fue transformado directamente en el correspondiente

éster metílico por tratamiento con una disolución de diazometano en éter a 0 °C, obteniéndose el α -cetoéster **52** con un rendimiento global para las dos etapas del 95%, después de la correspondiente purificación cromatográfica (**Esquema 3.12**).



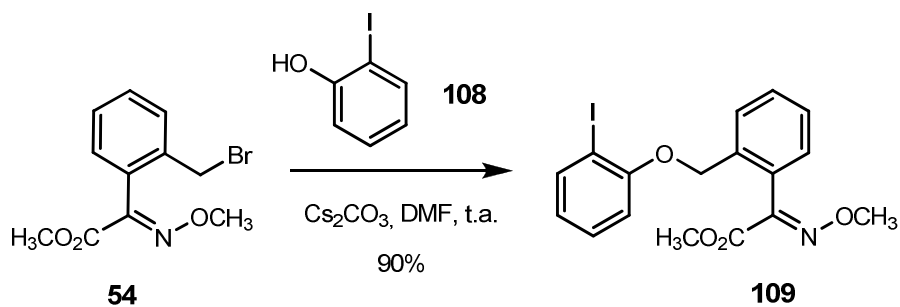
Esquema 3.12

Tras la condensación del grupo carbonílico cetónico del α -cetoéster **52** con exceso de clorohidrato de *N*-metoxihidroxilamina y posterior bromación radicalaria se obtuvo el bromuro bencílico **54**, requerido para la incorporación del anillo **a** de KMc6 (**Esquema 3.13**). Las condiciones de reacción empleadas fueron análogas a las utilizadas en la síntesis del hapteno KMa6 para la obtención del intermedio **98**; al igual que este caso, la reacción de condensación condujo a una mezcla aproximadamente 3:1 de los isómeros geométricos *E* y *Z*. Los dos isómeros también pudieron separarse sin dificultad por cromatografía de columna, obteniéndose el isómero mayoritario *E* (**53**) con un rendimiento del 66%. La posterior bromación de la metoxiimina **53** con NBS y AIBN a reflujo de benceno generó el bromuro bencílico **54** con un excelente 86% de rendimiento. Es destacable el elevado rendimiento obtenido en la reacción de bromación radicalaria de los sistemas bencílicos no yodados como éste, frente al obtenido en la bromación de los sistemas bencílicos yodados análogos, como el compuesto **98**, y que debe atribuirse a la interferencia producida en el proceso radicalario por el átomo de yodo, debido a la facilidad de fragmentación homolítica del enlace C-I [$D(\text{C-I}) = 56 \text{ Kcal/mol}$ vs $D(\text{C-Br}) = 70 \text{ Kcal/mol}$ y $D(\text{C-Cl}) = 82 \text{ kcal/mol}$].



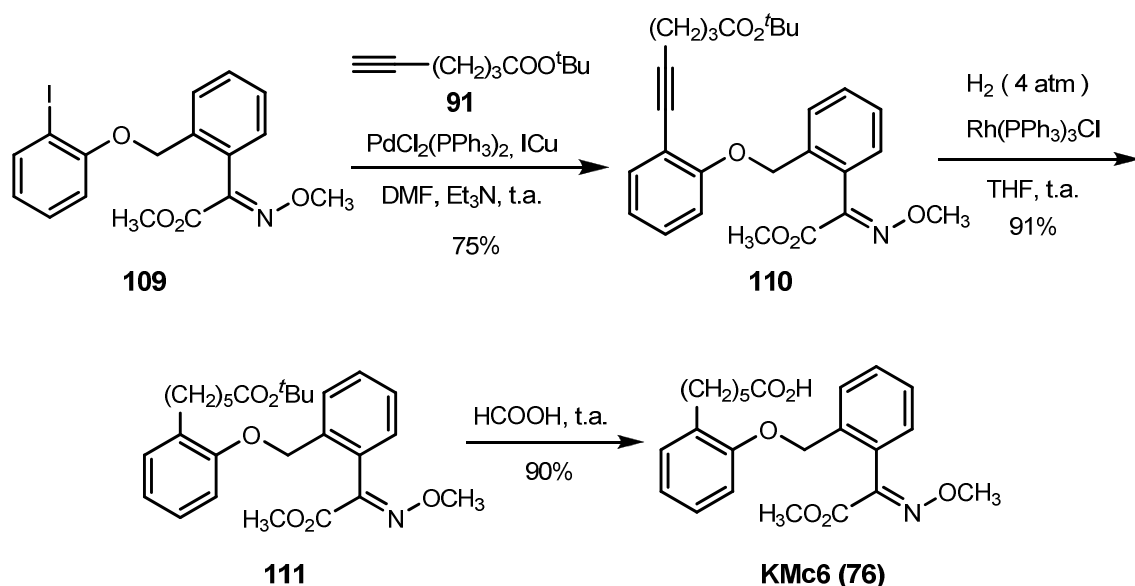
Esquema 3.13

Una vez se dispuso del sintón correspondiente al anillo **a**, la posterior elaboración del esqueleto hidrocarbonado del hapteno se completó a través de la reacción de eterificación del bromuro bencílico **54** con 2-iodofenol (**108**) empleando Cs_2CO_3 en DMF a temperatura ambiente (**Esquema 3.14**).



Esquema 3.14

Siguiendo el procedimiento general utilizado en la síntesis de todos los haptenos para la incorporación del brazo espaciador carboxilado, la síntesis del hapteno KMc6 (**76**) se completó mediante acoplamiento cruzado de Sonogashira entre el alquino **91** y el ioduro arílico **109** catalizado por $\text{Pd}(0)$, seguido de hidrogenación del triple enlace presente en **110**, empleando las condiciones catalíticas de Wilkinson y, finalmente, hidrólisis del éster *tert*-butílico **111** con ácido fórmico (**Esquema 3.15**).



Esquema 3.15

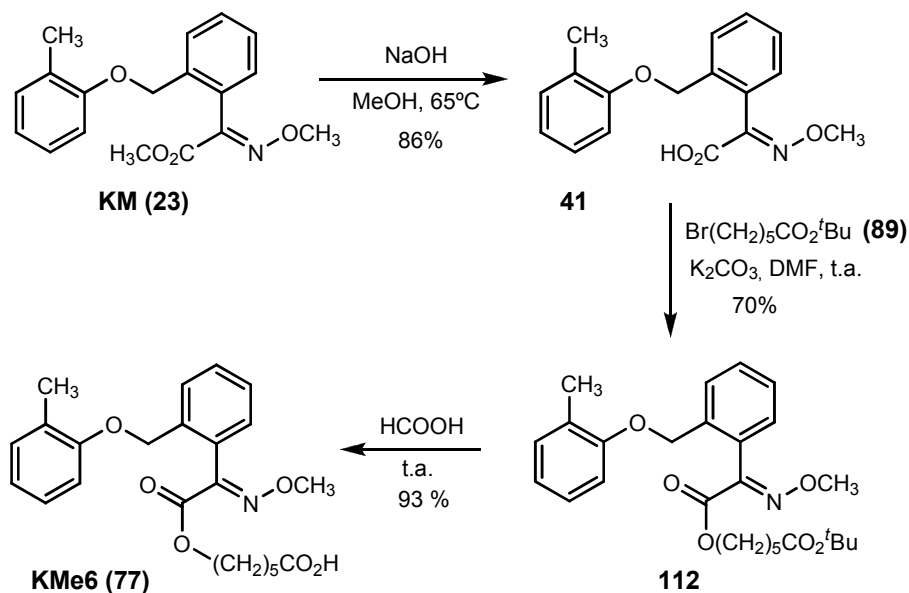
Resumiendo, la síntesis del hapteno KMc6 ha sido posible a través de una secuencia sintética de ocho etapas con un rendimiento global del 30%.

3.1.2.4. Síntesis del hapteno KMe6

La estrategia inicial en muchos trabajos para la preparación de un hapteno inmunizante consiste en intentar aprovechar algún grupo funcional del analito susceptible de ser modificado para permitir la introducción del brazo espaciador directamente sobre el mismo (Skerritt *et al.*, 2000; Hungerford *et al.*, 2006; Xu *et al.*, 2007; Mercader *et al.*, 2008 a y b; Salvador *et al.*, 2010). En nuestro caso, una posibilidad era hidrolizar el éster metílico presente en la agrupación (*E*)-2-metoxi-1-(metilimino)-2-oxoetilo de KM para obtener el correspondiente derivado ácido carboxílico, sobre el cual se podría introducir, vía *O*-alquilación, un brazo espaciador tipo alquílico para conseguir el hapteno KMe6 (77)

Así, la saponificación de KM (23) con sosa a reflujo de metanol acuoso, condiciones habituales para la hidrólisis de ésteres metílicos en condiciones básicas (Mercader *et al.*, 2008a), proporcionó el ácido carboxílico 41. La posterior *O*-alquilación del grupo carboxilato de 41, previamente aislado y purificado, con 6-bromo-hexanoato de *tert*-butilo (89) en medio básico generó el éster 112 con buen rendimiento. Por último, la síntesis del hapteno

KMe6 (**77**) se completó mediante la hidrólisis del grupo carboxilato. Para ello, se trató el éster *tert*-butílico **112** con ácido fórmico a temperatura ambiente, obteniéndose dicho hapteno con un rendimiento del 93% (**Esquema 3.16**).

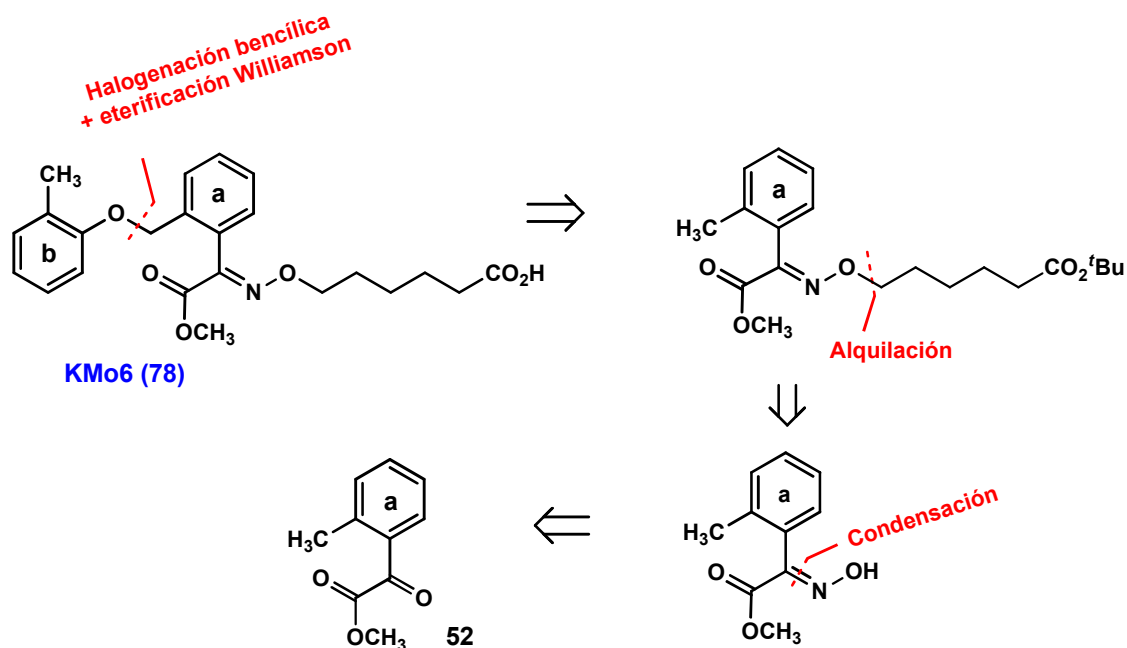


Esquema 3.16

En términos generales, la síntesis del hapteno KMe6, utilizando el fungicida comercial como producto de partida, resulta a la vez que rápida, simple y eficaz, requiriéndose solamente tres etapas y obteniéndose un rendimiento global del 56%.

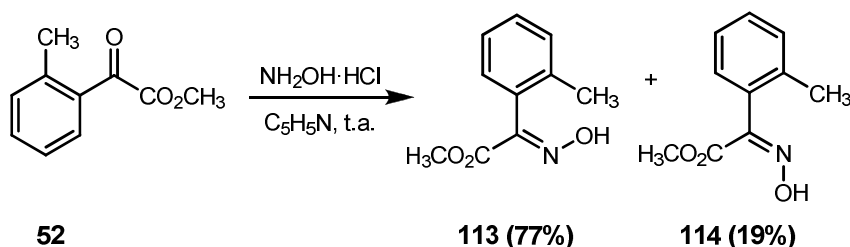
3.1.2.5. Síntesis del hapteno KMo6

La síntesis del hapteno KMo6 (**78**), que incorpora el brazo espaciador como una homologación del grupo metoxi-imínico, se basa en la preparación inicial del anillo arílico **a**, sobre el que se introduce el brazo espaciador hidrocarbonado a través de una *O*-alquilación de la agrupación oxima (**Esquema 3.17**). La incorporación del resto arílico (anillo **b**) que completa el esqueleto del hapteno KMo6 se realiza, al igual que en las síntesis de los hapteno KMa6 y KMc6, a través de una reacción de síntesis de éteres de Williamson.



Esquema 3.17. Análisis retrosintético para la preparación del hapteno KMo6

Siguiendo la estrategia sintética propuesta, la síntesis del hapteno KMo6 (**78**) utiliza como producto de partida el α -cetoéster **52**, obtenido previamente como intermedio de las síntesis del hapteno KMc6 (**76**). Así, la condensación del grupo carbonílico cetónico de **52** con exceso de clorhidrato de hidroxilamina en piridina a temperatura ambiente, proporcionó las correspondientes oximas (**113** y **114**) (**Esquema 3.18**). La condensación resultó, al igual que en los casos anteriores, altamente estereoselectiva, dando lugar al estereoisómero deseado de geometría *E* (**113**) con un rendimiento del 77% tras la correspondiente purificación cromatográfica.



Esquema 3.18

La asignación estereoquímica de los dos isómeros geométricos ya había sido descrita por Li y colaboradores en 2006 basándose en datos de IR y RMN

de protón (Li *et al.*, 2006a y b). De particular relevancia, y que apoya la asignación de la estereoquímica dada por Li, resulta el valor del desplazamiento químico del grupo hidroxiiimino, que se observa como una señal aguda a δ 10.11 ppm en el isómero *Z*, mientras que para el isómero *E* aparece como un singulete muy ancho, casi imperceptible, a δ 9.66 ppm. Esta diferencia de comportamiento del hidrógeno oximínico de ambos estereoisómeros geométricos es atribuible a la existencia, en el caso del isómero *Z*, de un puente de hidrógeno con el átomo de oxígeno del grupo carbonilo próximo, que disminuye la velocidad de intercambio del átomo de hidrógeno y permite la resolución de la señal en el espectro de RMN de ^1H . Una circunstancia que obviamente no es factible por cuestiones geométricas en el caso del isómero *E* (**Figura 3.6**).

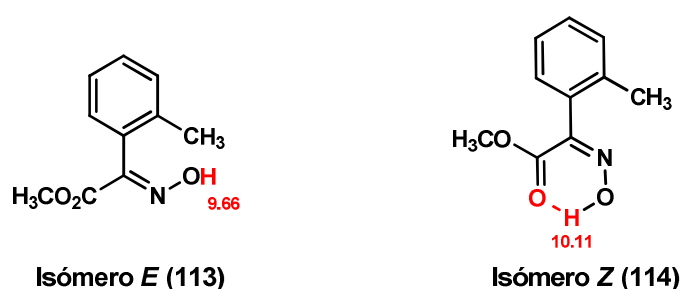
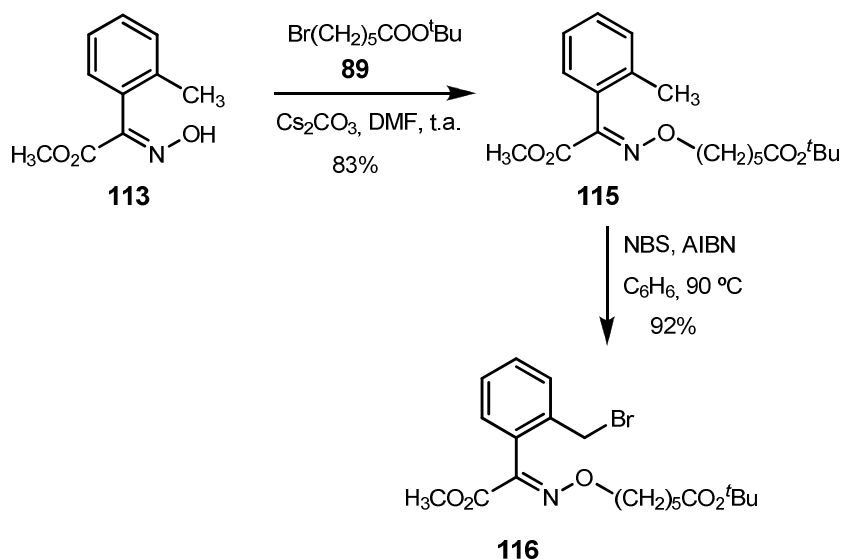


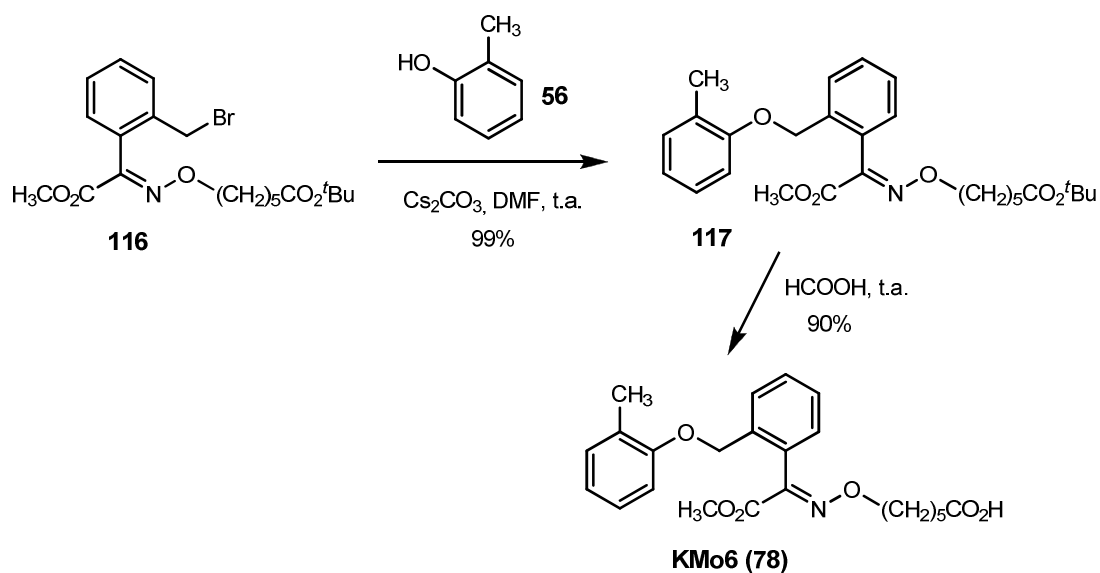
Figura 3.6. Desplazamientos químicos del hidrógeno oximínico de los isómeros *E* y *Z*

Una vez completada la elaboración de la agrupación (*E*)-2-(hidroxiiimino)acetato de metilo, se llevó a cabo la incorporación de la cadena hidrocarbonada saturada a través de la reacción de alquilación de la agrupación hidroxiiimínica de **113** con 6-bromohexanoato de *terc*-butilo (**89**) en DMF a temperatura ambiente, empleando Cs_2CO_3 como base (**Esquema 3.19**). La reacción se produce con un buen rendimiento, proporcionado el derivado *O*-alquilado **115**, que tras ser tratado con NBS y AIBN a reflujo de benceno condujo al bromuro bencílico **116** con un excelente rendimiento del 92%.



Esquema 3.19

La posterior elaboración del esqueleto completo del KMo6 (**78**) se consiguió como en los casos anteriores a través de la reacción de eterificación de Williamson con *o*-cresol, obteniéndose el compuesto **117** con un rendimiento cuantitativo. Finalmente, la hidrólisis del éster *tert*-butílico **117** proporcionó el hapteno KMo6 (**78**) con un rendimiento del 90% (**Esquema 3.20**).



Esquema 3.20

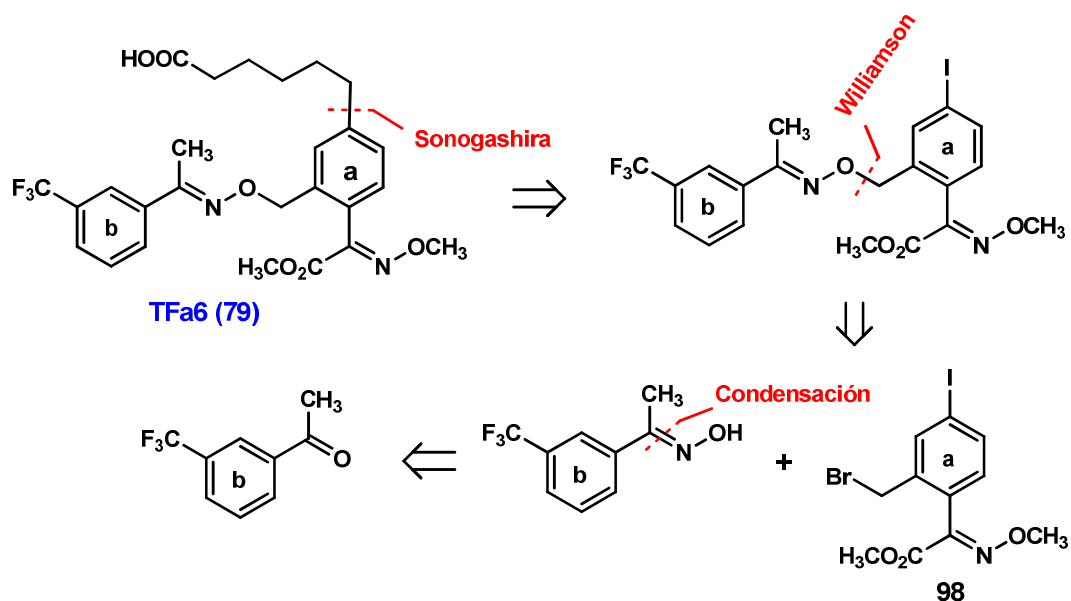
En resumen, la síntesis del hapteno KMo6 resultó también muy eficiente, completándose a partir del intermedio **52** en cinco etapas, con un rendimiento global del 52%.

3.1.3. Síntesis de haptenos para trifloxystrobin

Al igual que para los haptenos de KM, existen diversas aproximaciones sintéticas que podrían seguirse para la preparación de los haptenos diseñados para TF. En principio, la preparación de los haptenos TFe6 (**82**) y TF0 (**71**) (**Figuras 3.3** y **3.4**) se puede completar recurriendo a la hidrólisis de la agrupación éster metílico del grupo toxóforo del propio fungicida. Para los otros seis haptenos TFa6 (**79**), TFb6 (**80**), TFc6 (**81**), TFo6 (**83**), TFf6 (**84**) y TFt6 (**85**), es necesario recurrir a su síntesis total, para lo que nos hemos basado en las síntesis previas de TF y de los haptenos de KM descritas en el apartado previo, procurando, siempre que ha sido posible, utilizar el mayor número de intermedios comunes a la síntesis de ambos grupos de haptenos.

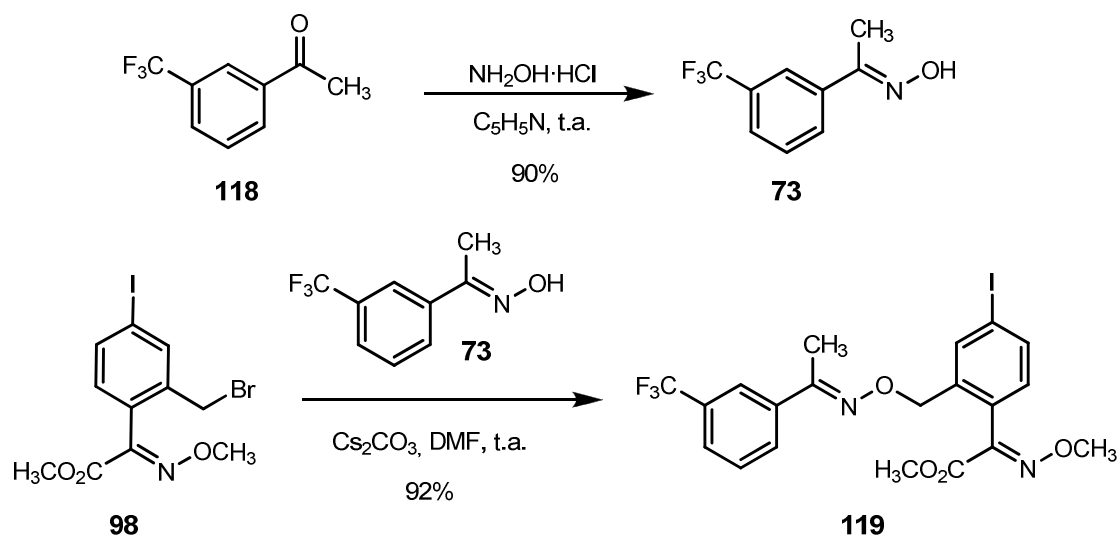
3.1.3.1. Síntesis del hapteno TFa6

La propuesta de síntesis del hapteno TFa6 (**79**) queda recogida en el **Esquema 3.21** y se basa en la preparación inicial de la oxima que se incorpora el anillo arílico **b**. La unión entre la oxima correspondiente y el bromuro bencílico **98** (sintetizado previamente para la obtención de KMa6, **apartado 3.1.2.1**) se lleva a cabo, al igual que en secuencias anteriores, a través de una reacción de eterificación y la inserción del brazo espaciador mediante una reacción de acoplamiento cruzado de tipo Sonogashira.



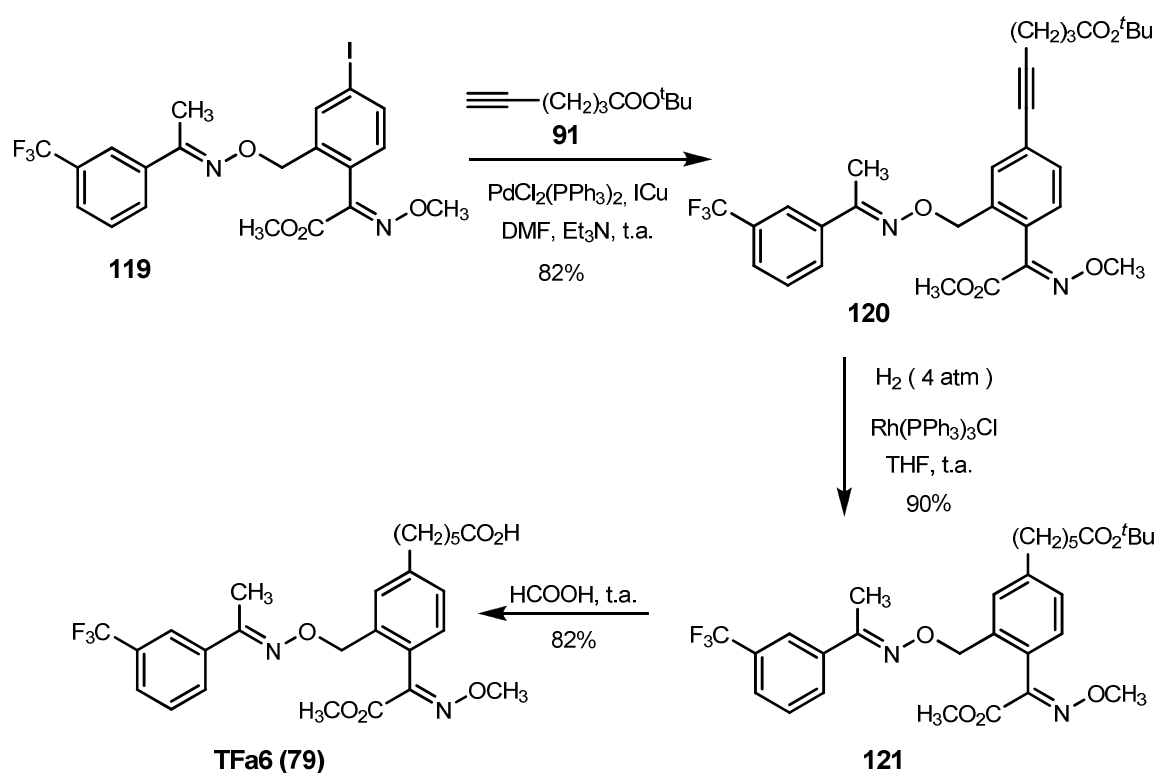
Esquema 3.21. Análisis retrosintético para la preparación del hapteno TFa6

Para ello, se llevó a cabo la transformación de la 3-trifluorometilacetofenona (**118**) en la correspondiente oxima **73**, utilizando exceso de clorhidrato de hidroxilamina en piridina a temperatura ambiente (**Esquema 3.22**). La condensación resultó ser totalmente estereoselectiva, dando exclusivamente el estereoisómero requerido de geometría *E*. La oxima **73** se obtuvo con un rendimiento y grado de pureza (determinada por RMN de ¹H) muy elevados, por lo que no fue necesaria su purificación. Así, tras su alquilación con el bromuro bencílico **98**, bajo condiciones básicas suaves, se completó el esqueleto básico del hapteno (**119**).



Esquema 3.22

Una vez se dispuso del ioduro arílico **119**, la incorporación de la cadena alquílica totalmente saturada se realizó, al igual que en la preparación de KMa6, KMb6 y KMc6, a través de una secuencia en dos etapas, implicando en primer lugar una reacción de acoplamiento cruzado tipo Sonogashira catalizada por $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_2\text{Cl}_2$ con el alquino terminal **91**, para dar el correspondiente derivado funcionalizado **120**, seguido de la hidrogenación catalítica del triple enlace de **120**. Finalmente, la hidrólisis del éster *tert*-butílico **121** con ácido fórmico a temperatura ambiente durante tres horas proporcionó el hapteno TFa6 (**79**) con un rendimiento del 82% (**Esquema 3.23**).

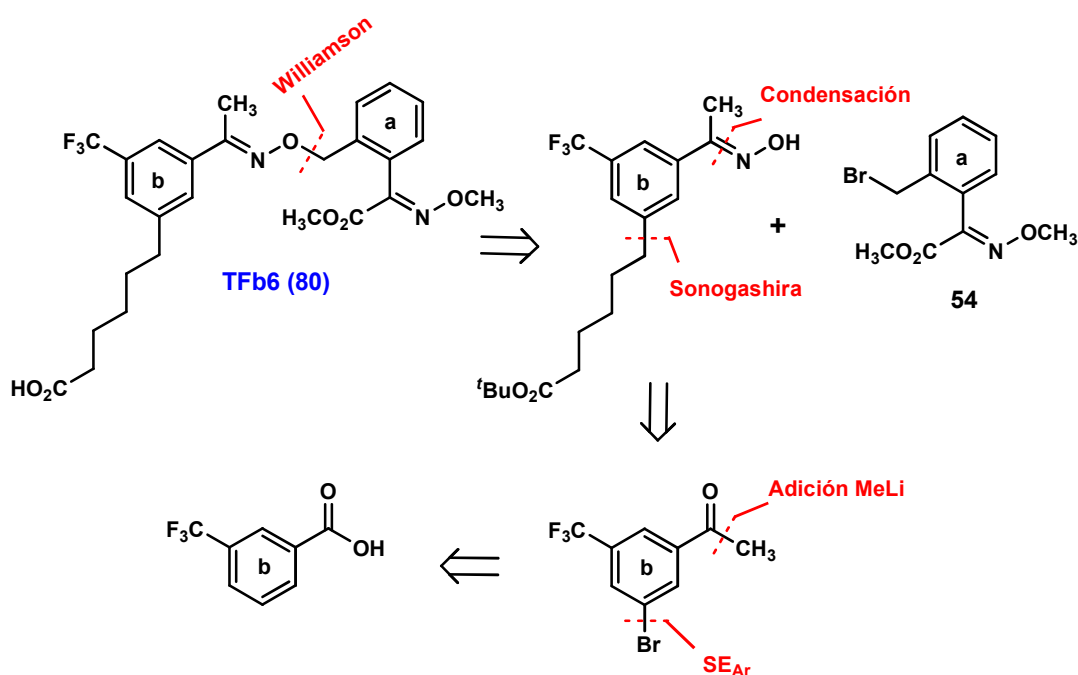


Esquema 3.23

En resumen, la síntesis del hapteno TFa6 a través de la ruta propuesta, que utiliza como productos de partida la 3-trifluorometilacetofenona comercial y el mismo bromuro bencílico utilizado en la síntesis del hapteno KMa6, el compuesto **98**, requiere solamente cinco etapas que transcurren con un rendimiento global del 50%.

3.1.3.2. Síntesis del hapteno TFb6

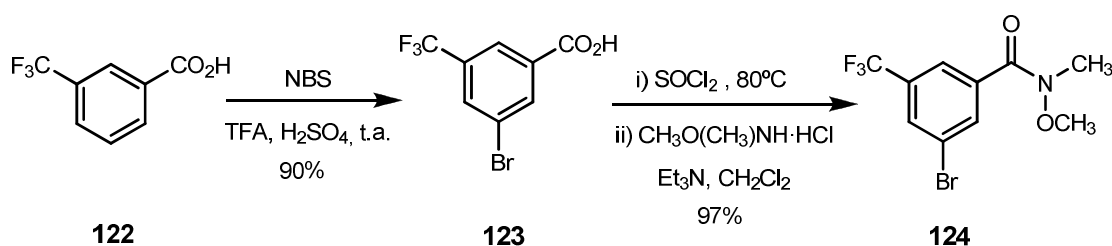
La síntesis del hapteno TFb6 (**80**) sigue una estrategia semejante a la descrita en el apartado precedente para la síntesis del hapteno KMa6, pero adelantando la etapa de introducción del brazo espaciador, presente en este caso sobre el anillo arílico **b**, a las primeras etapas de la síntesis, tal como se muestra en el **Esquema 3.24**. El primer paso es la bromación en *meta* del ácido 3-trifluorometilbenzoico comercial, aprovechando que ambos sustituyentes dirigen a esa posición, para posteriormente y tras su conversión a la correspondiente metilcetona, incorporar la cadena hidrocarbonada a través de una reacción de Sonogashira. La incorporación del resto arílico (anillo **a**) que completa el esqueleto del hapteno TFb6 se realiza a través de una reacción de eterificación.



Esquema 3.24. Análisis retrosintético para la preparación del hapteno TFb6

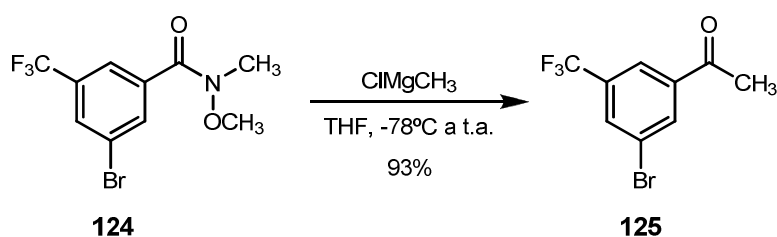
La síntesis del anillo **b** se inició con la bromación electrofílica aromática del ácido benzoico **122** empleando NBS como fuente de bromo electrofílico, ácido trifluoroacético (TFA) como disolvente y una cantidad catalítica de ácido sulfúrico (Bonneau y Deroy, 2006); de esta forma se obtuvo el bromuro arílico **123** con un 90% de rendimiento (**Esquema 3.25**). Debido a la presencia del bromo sobre el anillo aromático de **123** no es posible la transformación directa

del grupo carboxilato del ácido en la correspondiente metilcetona, por lo que esta transformación se llevó a cabo a través de la correspondiente amida de Weinreb (Caturla *et al.*, 2004; Bourne *et al.*, 2007). En primer lugar se generó el correspondiente cloruro de ácido calentado a reflujo de cloruro de tionilo, el cual, tras eliminar el exceso del agente clorante, se hizo reaccionar *in situ* con clorhidrato de *N*-metil-*N*-metoxihidroxilamina disuelta en una mezcla de Et₃N y CH₂Cl₂. De esta forma se obtuvo la amida **124** con un rendimiento cuantitativo (**Esquema 3.25**).



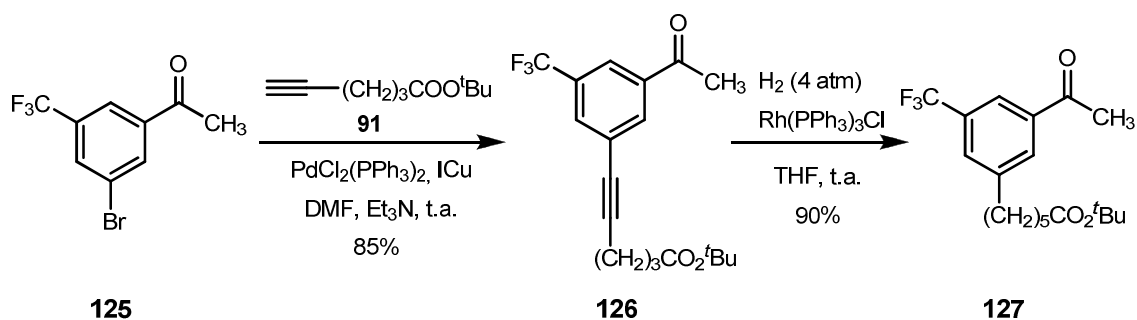
Esquema 3.25

Para acabar de obtener la metilcetona **125** a partir de la amida **124** se emplearon condiciones descritas para sistemas análogos (Lynch *et al.*, 2006). Así, el uso de ClMgCH_3 en THF seco durante toda la noche, proporcionó la acetofenona **125** con un rendimiento del 93% tras la purificación cromatográfica (**Esquema 3.26**).



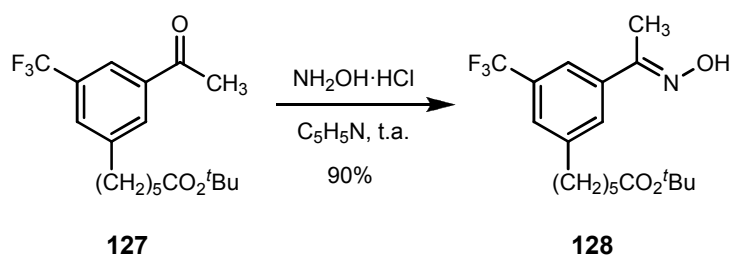
Esquema 3.26

A continuación, se incorporó la cadena hidrocarbonada a través de una reacción de acoplamiento cruzado entre el bromuro arílico **125** y el hex-5-inoato de *terc*-butilo (**91**). Las condiciones empleadas fueron las mismas que en los haptenos anteriormente sintetizados por esta vía. Tras la posterior hidrogenación del triple enlace de **126** con $\text{Rh}(\text{PPh}_3)_3\text{Cl}$ en THF se obtuvo **127** con un excelente rendimiento (**Esquema 3.27**).



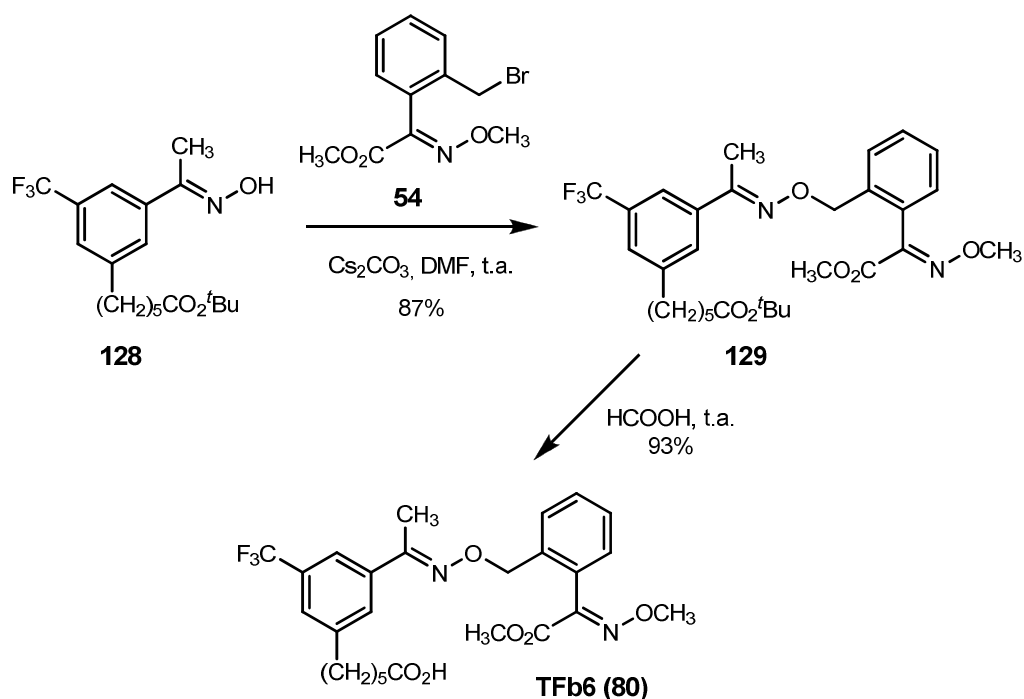
Esquema 3.27

Seguidamente, se llevó a cabo la reacción de condensación del grupo carbonilo de la metilcetona **127** con clorhidrato de hidroxilamina en piridina a temperatura ambiente (**Esquema 3.28**), obteniéndose exclusivamente la oxima **128** (anillo **b**) con la geometría *E*.



Esquema 3.28

El esqueleto bicíclico del hapteno objetivo se completó a través de la reacción de Williamson con el bromuro bencílico **54**, previamente preparado en la síntesis de KMc6, y la oxima **128**, empleando Cs₂CO₃ en DMF seca. Finalmente, la desprotección de la agrupación de éster *terc*-butílico de **129** bajo condiciones ácidas suaves condujo al hapteno TFb6 (**80**) con un rendimiento del 90% (**Esquema 3.29**).

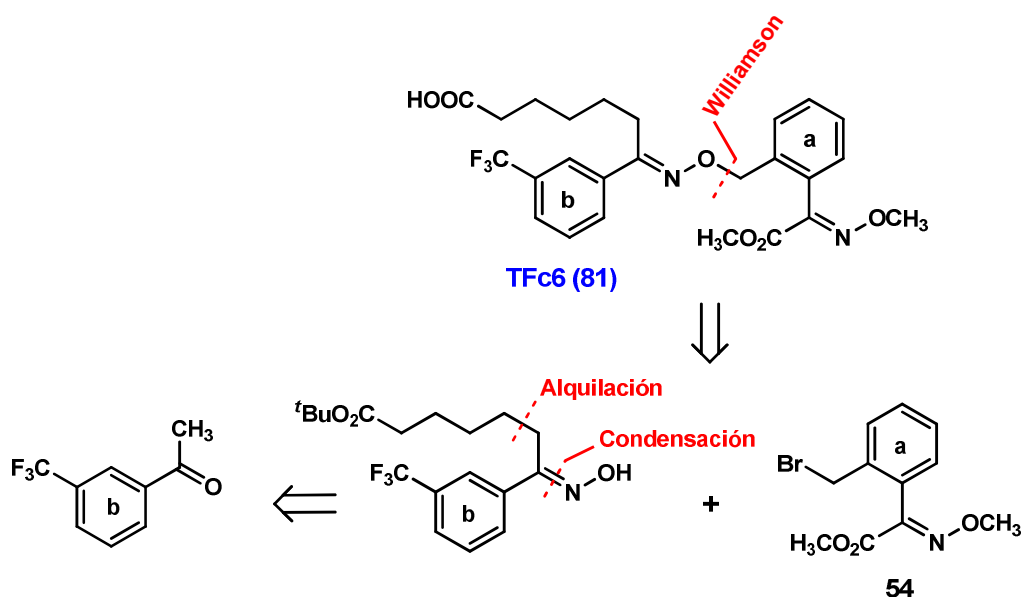


Esquema 3.29

En resumen, el hapteno TFb6 se pudo preparar de modo eficaz, en ocho etapas a partir del ácido 3-trifluorometilbenzoico comercial, con un rendimiento global del 47%.

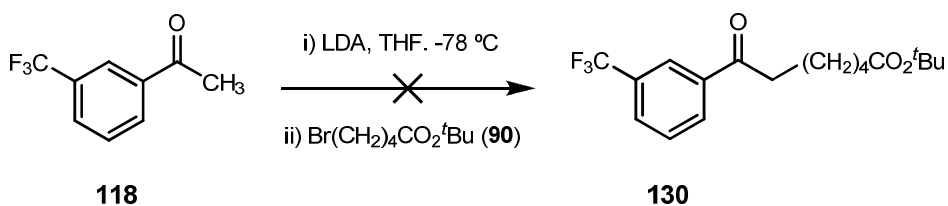
3.1.3.3. Síntesis del hapteno TFc6

Al igual que para la preparación de TFa6, en la síntesis de TFc6 (**81**) se parte de la 3-trifluorometilacetofenona, que se incorpora como el anillo **b** del hapteno, sobre la que se introduce la cadena hidrocarbonada del brazo espaciador por homologación del grupo metilo vía un proceso de alquilación. Como fragmento arílico **a** se utiliza el bromuro bencílico **54** (intermedio en la síntesis del hapteno KMc6). La unión de ambos anillos se realiza a través de una reacción de síntesis de éteres de Williamson (**Esquema 3.30**).



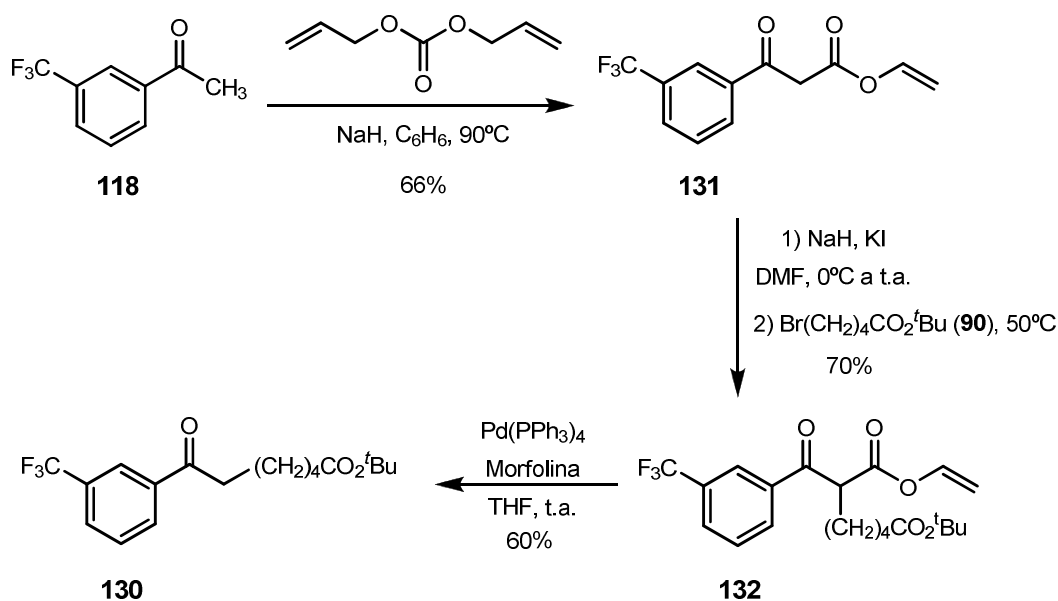
Esquema 3.30. Análisis retrosintético para la preparación del hapteno TFc6

Para llevar a cabo la introducción de la cadena que constituye el brazo espaciador sobre el grupo metilo de la trifluoroacetofenona **118** se intentó en primer lugar la alquilación directa mediante una reacción de alquilación del correspondiente anión enolato. Así, se empleó LDA en THF a $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ para general el enolato correspondiente y luego se hizo reaccionar éste con el 5-bromopentanoato de *tert*-butilo (**90**) (**Esquema 3.31**). Sin embargo, de la reacción no se aisló el producto de alquilación deseado **130**, observándose exclusivamente en el crudo de reacción el producto de partida y el bromuro alquílico. El empleo de *t*-BuOK en DMF seca y posterior reacción con el bromuro alquílico **90** condujo a los mismos resultados. Aunque un tanto inesperados y difícilmente explicables, estos resultados podrían atribuirse a la presencia de la agrupación trifluorometano sobre el anillo aromático que podría ejercer algún efecto desactivante sobre la capacidad nucleofílica del enolato intermedio, puesto que en la literatura existen numerosos ejemplos de procesos de alquilación semejantes sobre acetofenonas carentes de esta agrupación (Tiecco *et al.*, 1990; Crotti *et al.*, 1999; Chacón-García y Martínez, 2002; Amat *et al.*, 2003; Clive y Wang, 2004; Moore *et al.*, 2004; Breen *et al.*, 2005; Biswas y Venkateswaran, 2005; Ma *et al.*, 2006).



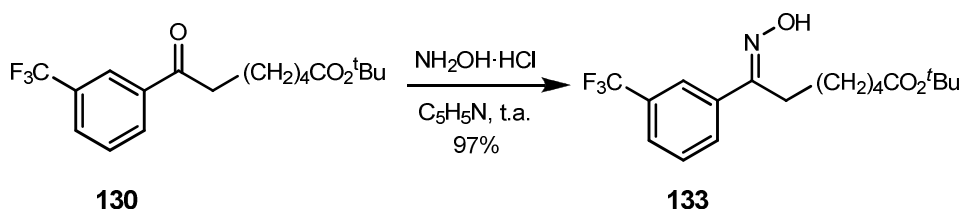
Esquema 3.31

Ante las dificultades encontradas para la alquilación directa de la metilcetona se decidió proceder a la activación previa de esta posición a través de la formación de un β -cetoéster, que una vez cumplido su papel activante en el proceso de alquilación se elimina mediante un proceso descarboxilativo (Paulvannan y Chen, 1999). En primer lugar se generó el enolato sódico correspondiente por tratamiento de **118** con NaH que, *in situ*, se hizo reaccionar con carbonato de dialilo para proporcionar el β -cetoéster **131** (Esquema 3.32). Tras la reacción de alquilación de **131** con el 5-bromopentanoato de *tert*-butilo (**90**), previa generación del enolato correspondiente, se generó el α -alquil- β -cetoéster **132**, que fue posteriormente descarboxilado utilizando Pd(PPh₃)₄ como catalizador y morfolina como base, proporcionando el éster *tert*-butilo **130**. Aunque este proceso permite la obtención del producto de alquilación de la acetofenona deseado, las diferentes etapas que implica se producen con un rendimiento sólo moderado con lo que el rendimiento global del proceso de alquilación es relativamente bajo (30%), muy inferior al obtenido para este tipo de transformación y que refuerza la idea mencionada previamente sobre el efecto del grupo trifluorometilo en este tipo de sistema.



Esquema 3.32

Una vez que se dispuso de la cetona **130**, se condensó con clorohidrato de hidroxilamina haciendo uso de las mismas condiciones descritas anteriormente. Así, se obtuvo finalmente la oxima **133** (anillo **b** del hapteno) con un rendimiento prácticamente cuantitativo para esta etapa (**Esquema 3.33**).



Esquema 3.33

Los resultados obtenidos en cuanto a la estereoquímica de la reacción fueron análogos a los obtenidos en TFA6 y TFB6, obteniéndose exclusivamente el isómero *E*, cuya estereoquímica en este caso si pudo determinarse por experimentos NOESY. De particular relevancia resultaron las señales de cruce NOE entre OH/H₂-3 (δ 7.95/1.62), OH/H₂-5 (δ 7.95/1.57), y H₂-6/H-6' (δ 2.82/7.77) que apoyan inequívocamente la estereoquímica asignada (**Figura 3.7**).

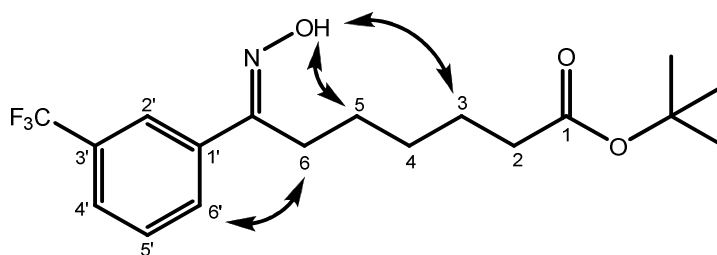
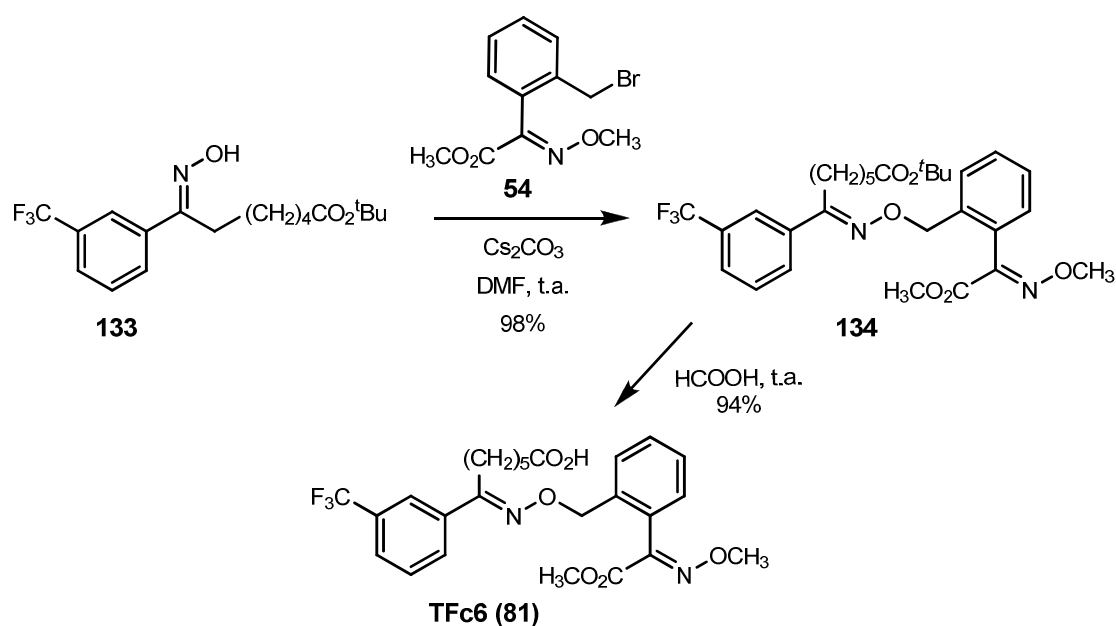


Figura 3.7. Efectos NOE observados en **133**

El esqueleto biarílico del hapteno TFc6 se completó como en los casos anteriores a través de la reacción de Williamson entre el bromuro bencílico **54** y la oxima **133**, dando lugar al éster *tert*-butílico **134**, que después de ser tratado con ácido fórmico proporcionó el hapteno TFc6 (**81**) con un rendimiento global del 25% (Esquema 3.34).



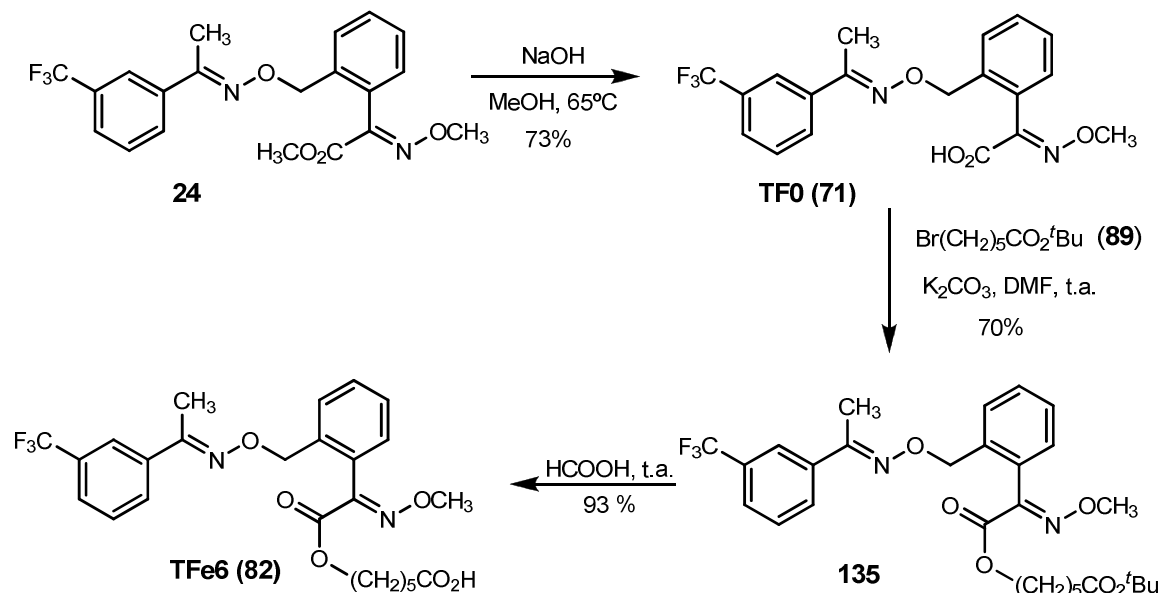
Esquema 3.34

3.1.3.4. Síntesis de los haptenos TF0 y TFe6

Una primera y más inmediata aproximación para la preparación de los haptenos TF0 y TFe6, siguiendo la misma estrategia que en la preparación del hapteno KMe6 de KM, estaría basada en la hidrólisis del éster metílico presente en el grupo toxóforo de TF (Figuras 3.3 y 3.4), para obtener el correspondiente derivado ácido carboxílico, hapteno TF0 (**71**), sobre el cual se

podría introducir, vía *O*-alquilación, el brazo espaciador y obtener el hapteno TFe6 (**82**).

Así, la hidrólisis del éster metílico presente en TF (**24**) se llevó a cabo sin mayores dificultades en condiciones estándar, empleando sosa a reflujo de metanol acuoso, proporcionando el hapteno TF0 (**71**), que no presenta brazo espaciador (**Esquema 3.35**).



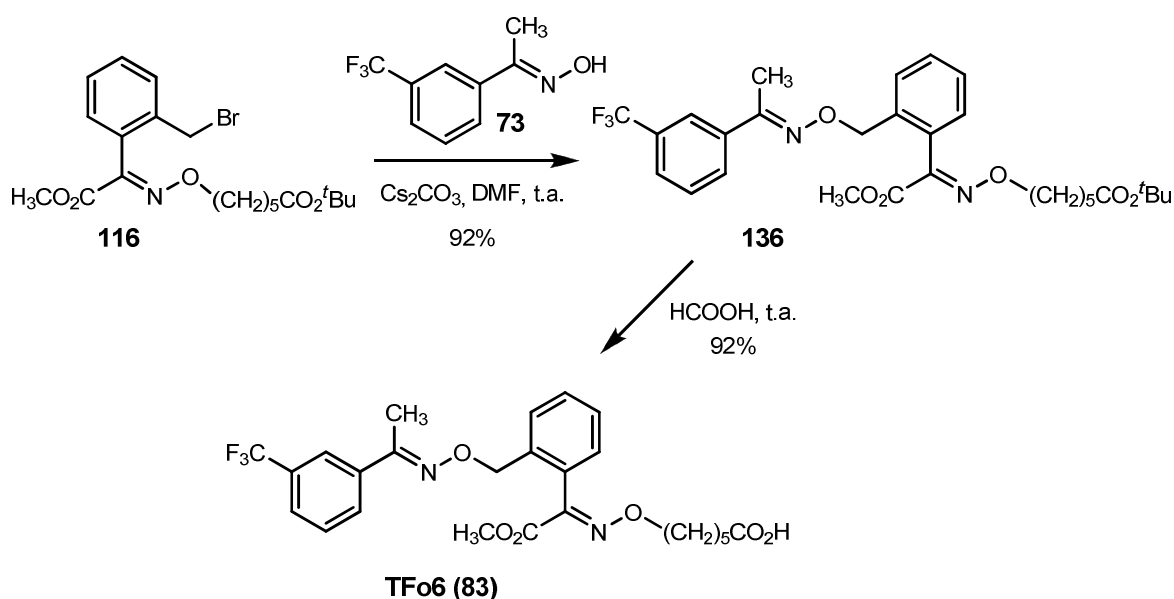
Esquema 3.35

La reacción de alquilación del grupo carboxilato de **71** con 6-bromohexanoato de *tert*-butilo (**89**), empleando carbonato potásico en DMF, y posterior hidrólisis ácida del éster *tert*-butílico **135** proporcionó el hapteno TFe6 (**82**) con un excelente rendimiento del 93% (**Esquema 3.35**).

3.1.3.5. Síntesis del hapteno TFo6

Para abordar la síntesis de TFo6 de la forma más rápida y sencilla, según se expone en el **Esquema 3.36**, se partiría de la oxima **73** y el bromuro bencílico **116**, ambos productos preparados previamente como intermedios en la síntesis de otros haptenos, completándose la estructura de este hapteno, al igual que en los casos anteriores, por unión de los dos fragmentos arílicos a través de la reacción de eterificación de Williamson.

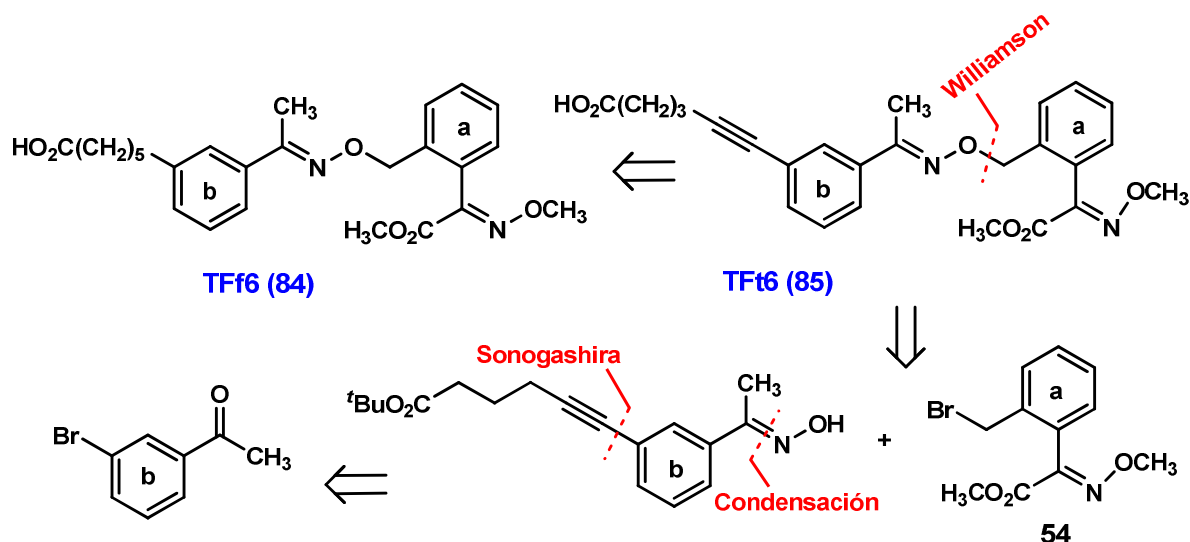
Así pues, la reacción de eterificación entre el bromuro bencílico **116** (intermedio en la síntesis del hapteno KMo6) y la oxima **73** (sintón **b** de TFa6), se llevó a cabo en condiciones anteriormente descritas para proporcionar el hapteno protegido **136** con un elevado rendimiento después de la purificación cromatográfica. La hidrólisis éster *tert*-butílico de **136**, por tratamiento con ácido fórmico a temperatura ambiente, proporcionó el hapteno TFo6 (**83**) con un rendimiento global de las dos etapas del 85%.



Esquema 3.36

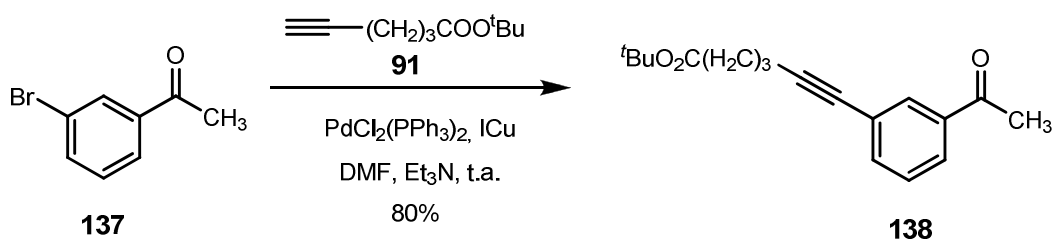
3.1.3.6. Síntesis de los haptenos TFt6 y TFf6

La síntesis de los haptenos TFt6 (**85**) y TFf6 (**84**), que se diferencian exclusivamente en el grado de saturación de dos átomos de carbono del brazo espaciador, requiere introducir el mismo por el anillo arílico **b**, en la posición arílica que ocupa el sustituyente trifluorometilo de la estructura de TF, lo que se efectúa a través de una reacción de acoplamiento cruzado sobre la 3-bromoacetofenona. El resto de etapas que completan la preparación del hapteno TFt6 son equivalentes a las utilizadas en la preparación de otros haptenos, mientras que el hapteno TFf6 se completa directamente a partir del primero mediante un proceso de hidrogenación del triple enlace (Esquema 3.37).



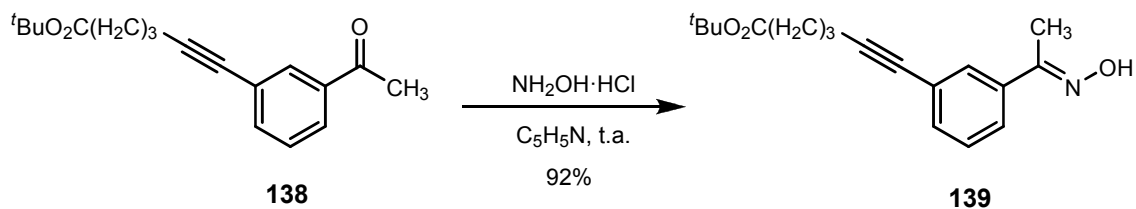
Esquema 3.37. Análisis retrosintético para la preparación de los haptenos TFf6 y TFf6

La síntesis del hapteno TFf6 (**85**) se inició con la preparación del sintón correspondiente al anillo fenílico **b**, para la cual se partió de la 2-bromoacetofenona comercial (**137**). Primero se incorporó el brazo espaciador a través de la reacción de Sonogashira entre el bromuro arílico **137** y el alquino terminal **91** (**Esquema 3.38**). Este acoplamiento transcurrió de forma eficaz en las condiciones generales utilizadas previamente en la síntesis de otros haptenos de KM y TF descritas previamente.



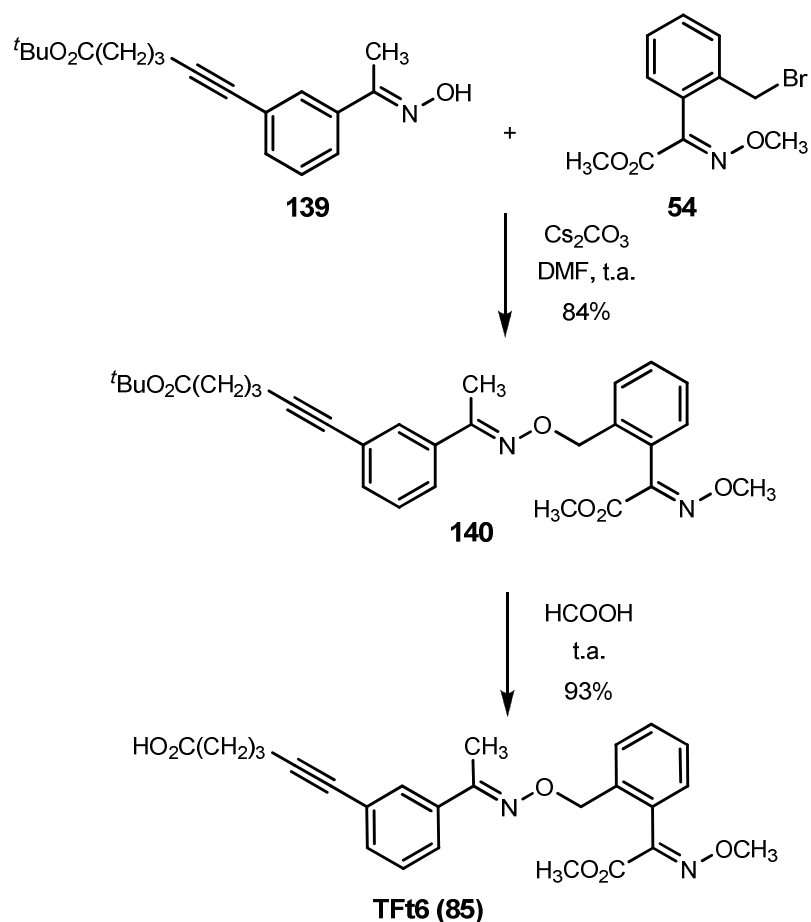
Esquema 3.38

Una vez incorporada la cadena alquínica al sistema de acetofenona, se procedió a la formación de la oxima requerida. Para ello se hizo reaccionar la metilcetona **138** con clorhidrato de hidroxilamina en piridina a temperatura ambiente, para obtener, de forma análoga a los casos anteriores, exclusivamente el isómero geométrico *E* de la oxima (**Esquema 3.39**).



Esquema 3.39

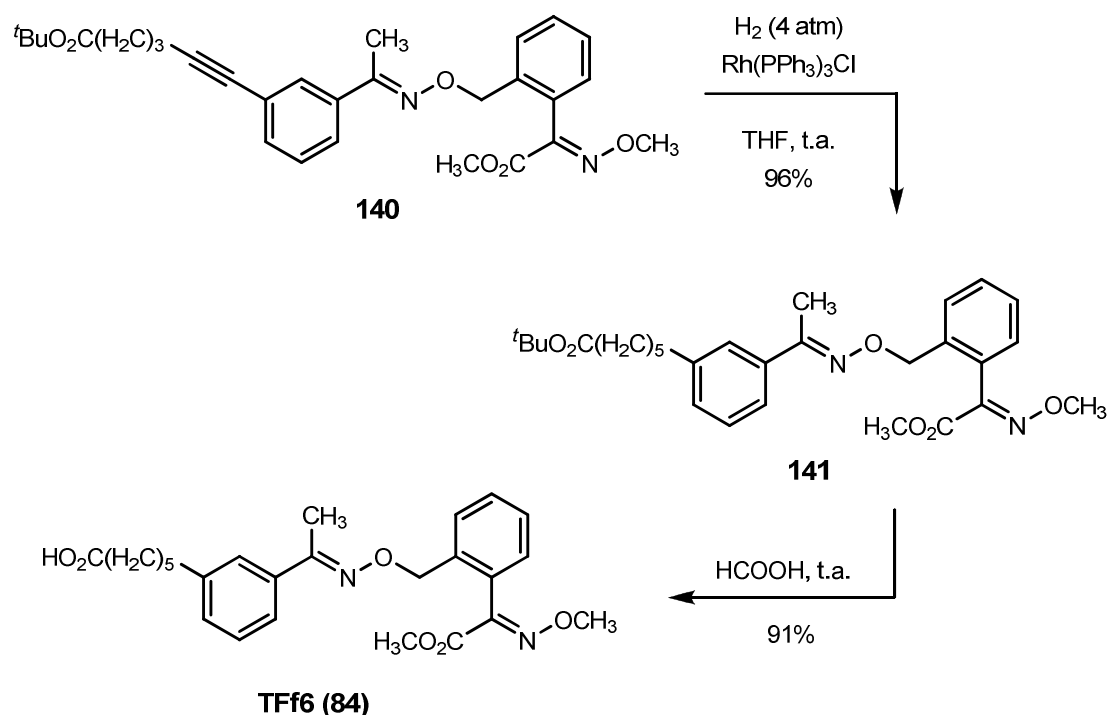
Una vez se dispuso de la oxima **139**, la síntesis del hapteno TFt6 se completó tras su unión con el resto bencílico del bromuro **54** e hidrólisis de la agrupación éster *tert*-butílico de **140**. Ambas etapas se producen de forma muy eficaz, proporcionando el hapteno TFt6 con un rendimiento global para las dos etapas mayor del 78% (**Esquema 3.40**).



Esquema 3.40

Para la síntesis del hapteno TFt6 (**84**) se utilizó el alquino **140**, obtenido como intermedio en la síntesis del hapteno TFt6, que tras ser sometido a hidrogenación completa del triple enlace en condiciones homogéneas e

hidrólisis del grupo éster de **141** en medio ácido proporcionó el hapteno TFf6 (**84**) con un rendimiento global de las dos etapas del 87% (**Esquema 3.41**).



Esquema 3.41

En términos generales, la estrategia seguida para la preparación de los haptenos TFf6 y TFt6 resulta simple y eficiente, permitiendo obtener el primero en solo cuatro etapas a partir de 2-bromoacetofenona, con un rendimiento global del 57%, y el segundo con una etapa adicional pero también con un excelente rendimiento global del 54%.

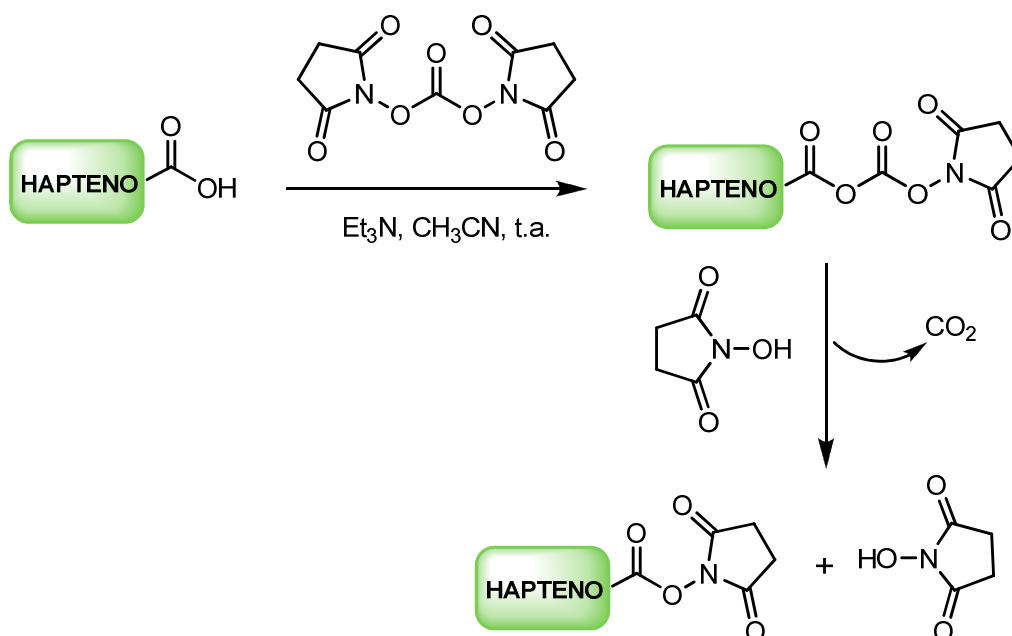
A modo de resumen, se puede concluir que desde el punto de vista sintético los procedimientos seguidos para la preparación de los diferentes haptenos, tanto de KM como de TF, han resultado por lo general simples y eficaces, habiéndose logrado la preparación de los mismos con un número limitado de etapas sintéticas y haciendo uso, siempre que ha sido posible, de intermedios de las síntesis de unos haptenos para la preparación de otros. Es especialmente destacable la eficacia del procedimiento utilizado para la incorporación del brazo espaciador hidrocarbonado a la estructura de analito. La reacción de acoplamiento cruzado de Sonogashira entre un haluro arílico y un alquino terminal catalizada por Pd(0), seguido de hidrogenación o no del

triple enlace, es un procedimiento que puede considerar general e interesante para la síntesis de haptenos, no sólo de la familia de las estrobilurinas, sino también de muchos otros plaguicidas, xenobióticos y toxinas, ya que la mayoría de estos compuestos incorporan anillos aromáticos en su estructura.

3.2. Activación de los haptenos

Una vez preparados los haptenos de ambos fungicidas y previamente a su conjugación con proteínas y/o enzimas, fue necesaria la activación del grupo carboxilato terminal presente en todos ellos, activación que se llevó a cabo por formación de un éster de succinimidilo, a través de lo que se conoce como método del éster activo. El procedimiento más ampliamente utilizado para la activación del grupo carboxilo terminal de haptenos emplea *N,N'*-diciclohexilcarbodiimida (DCC) y *N*-hidroxisuccinimida (NHS) en DMF (Lagone y Van Vunaskis, 1982). La DCC fue introducida por primera vez en la síntesis de péptidos en 1955 por Sheehan y Hess, y actualmente sigue siendo un reactivo ampliamente utilizado para la activación de haptenos. Sin embargo, este método produce diciclohexilurea como subproducto, la cual frecuentemente interfiere en la separación cromatográfica de los correspondientes haptenos activados, dificultando su aislamiento y purificación. Otro de los procedimientos utilizados para la formación de los ésteres activos se basa en la utilización del carbonato de *N,N'*-disuccinimidilo (DSC) (Ogura *et al.*, 1979). Este compuesto fue originalmente preparado por Ogura y colaboradores como un reactivo más conveniente que la DCC en la síntesis de ésteres activos y péptidos. Durante los últimos años, el uso de DSC ha sido ampliamente aceptado para la activación de grupos amino, hidroxilo y carboxilo, así como para la formación de ureas asimétricas, carbamatos y enlaces amida (Takeda *et al.*, 1983; Gosh *et al.*, 1992; Boden *et al.*, 1998; Morpurgo *et al.*, 1999). No obstante, existen pocos casos descritos en los que se haya empleado para la preparación de ésteres de succinimidilo, a pesar de ser una alternativa eficaz, capaz de proporcionar elevados rendimientos y dar lugar a reacciones más limpias (Koziorowski *et al.*, 1998; Prasad *et al.*, 2005; Vaidyanathan y Zalutsky, 2006; Ustinov *et al.*, 2008; Hilderbrand *et al.*, 2008).

La formación del éster de succinimidilo mediante este procedimiento alternativo implica la reacción del hapteno con DSC y Et₃N como base en acetonitrilo seco. Primero, el grupo carboxilo reacciona con el DSC, generando el correspondiente carbonato mixto y liberando la cantidad de NHS necesaria para atacar al carbonilo activado en la siguiente etapa, dando como resultado la formación del éster de succinimidilo y como subproductos CO₂ y NHS, la cual puede volver a reaccionar con más grupos carboxilato (**Esquema 3.42**). Se trata de un proceso eficiente y limpio; el mismo reactivo es activador del grupo carboxilo y fuente de NHS, y sólo produce productos secundarios fácilmente eliminables (la NHS es soluble en agua).

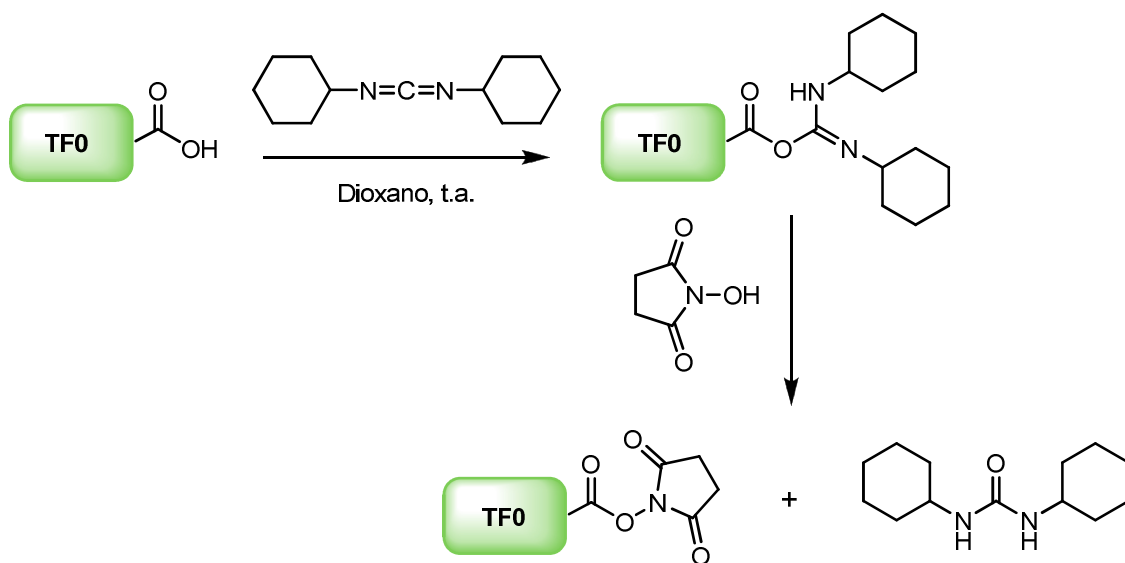


Esquema 3.42. Activación de los haptenos con DSC/Et₃N en CH₃CN

Todos los haptenos sintetizados tanto para KM como para TF, a excepción del hapteno TF0, fueron activados empleando DSC, obteniéndose los ésteres activos correspondientes con buenos rendimientos después de la purificación cromatográfica (60–95%).

Por motivos que no pudieron ser precisados, la formación del éster activo del hapteno TF0 con la NHS empleando DSC no funcionó adecuadamente, y en todos los intentos que se realizaron para su formación con este reactivo se recuperó exclusivamente el hapteno de partida del crudo de la reacción. Debido a esta circunstancia, se recurrió en este caso al procedimiento convencional

para la formación del éster de succinimidilo basado en la reacción del grupo carboxilo con DCC/NHS en dioxano. En este caso, el grupo carboxilo reacciona con la agrupación diimida de la DCC dando lugar a la *O*-acilisourea, que es atacada por el hidroxilo de la NHS para formar el éster activo y dicitclohexilurea (**Esquema 3.43**). Mediante este procedimiento, y tras la correspondiente purificación cromatográfica, se obtuvo el hapteno TF0 activado con un rendimiento aceptable (68%).



Esquema 3.43. Activación de TF0 con DCC/NHS en dioxano

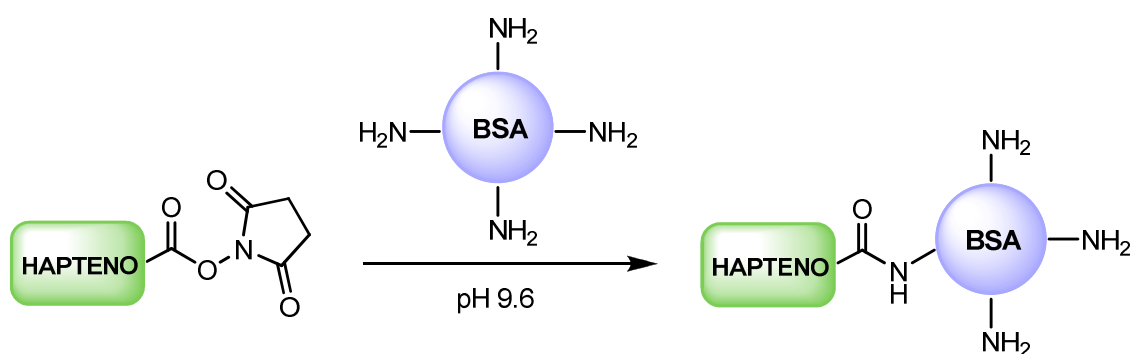
3.3. Preparación de conjugados proteicos

Una vez activados todos los haptenos, se procedió a acoplarlos covalentemente a proteínas transportadoras y a enzimas para obtener los correspondientes conjugados de inmunización, conjugados de tapizado para ser empleados en el formato competitivo ELISA indirecto (ci-ELISA) y trazadores enzimáticos para ser empleados en el formato competitivo ELISA directo (cd-ELISA). Se utilizaron proteínas diferentes en la preparación de inmunógenos y conjugados competidores de ensayo, favoreciendo de esta forma la selección de anticuerpos dirigidos hacia la porción hapténica del inmunógeno.

En este trabajo, para la obtención de los diferentes conjugados proteicos, hemos empleado procedimientos clásicos bien establecidos, consistentes en

la formación de enlaces amida entre los grupos carboxilo de los haptenos y los grupos aminos libres de los aminoácidos básicos de las proteínas/enzimas.

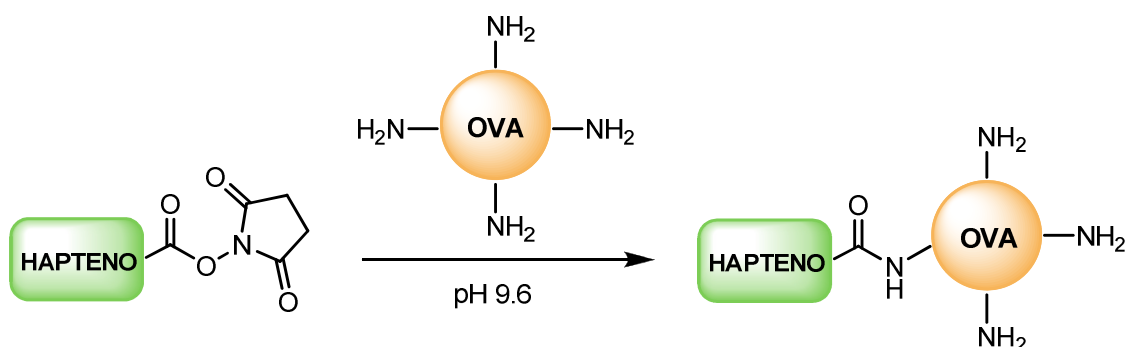
En nuestro caso, para la preparación de los conjugados proteicos inmunogénicos, se escogió la BSA (peso molecular 67 kDa). Se eligió esta proteína porque tolera muy bien una elevada carga hapténica sin pérdida de solubilidad y tiene numerosos grupos funcionales para acoplarse a moléculas pequeñas como los haptenos. Más concretamente, la BSA es un polipéptido de cadena simple que presenta numerosos grupos carboxilato libres procedentes de aspartatos y glutamatos, lo que le confiere una carga neta negativa ($pI = 5.1$), y 59 grupos amino procedentes de residuos de lisinas, de los cuales se estima que 30–35 se encuentran accesibles para su derivatización (Hermanson, 1996). Todos los ésteres activos se hicieron reaccionar, previa purificación cromatográfica de los mismos, con BSA en medio básico (tampón carbonato, 50 mM, pH 9.6) para formar los correspondientes conjugados BSA–hapteno (**Esquema 3.44**), los cuales fueron purificados por cromatografía de exclusión molecular.



Esquema 3.44. Conjugación con la proteína BSA

Para la preparación de los conjugados de tapizado empleados en el ELISA de formato indirecto se eligió la OVA (peso molecular 45 kDa) que contiene 20 residuos de lisinas accesibles para la conjugación con los haptenos. Además, la OVA es un polipéptido de cadena simple que contiene 14 residuos de ácido aspártico y 33 residuos de ácido glutámico que aportan grupos carboxilato, proporcionándole, al igual que ocurre en la BSA una carga neta negativa ($pI = 4.63$) (Hermanson, 1996). La obtención de los distintos conjugados OVA–hapteno se llevó a cabo siguiendo la misma estrategia que para los

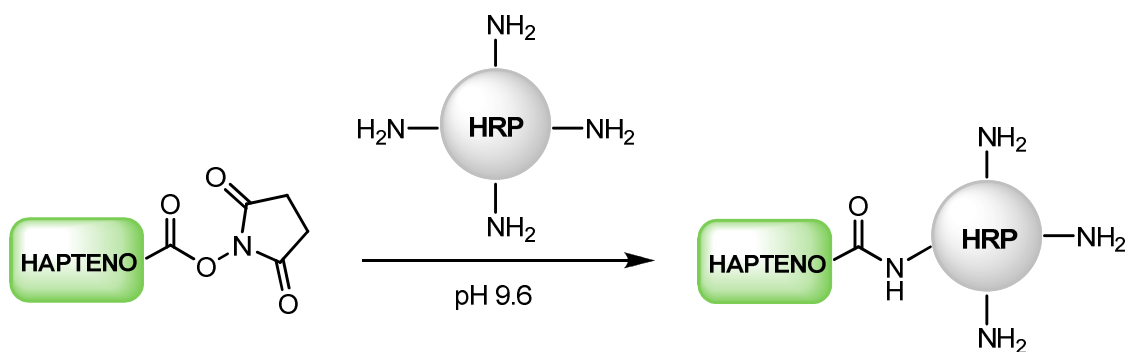
conjugados de BSA; es decir, se emplearon los restos de lisina disponibles para la formación del enlace amida con los grupos carboxilato de los haptenos activados (**Esquema 3.45**).



Esquema 3.45. Conjugación con la proteína OVA

Por último, se prepararon los trazadores enzimáticos empleados en el formato de ELISA directo. Para ello, se escogió como enzima la HRP (peso molecular 40 kDa), una glicoproteína que presenta cuatro lisinas disponibles para su conjugación sin pérdida destacable de su actividad enzimática.

Todos los haptenos de KM y TF se acoplaron covalentemente a HRP siguiendo procedimientos análogos a los empleados en la preparación de los conjugados de BSA y OVA (**Esquema 3.46**).



Esquema 3.46. Conjugación con la enzima HRP

Una vez obtenidos todos los conjugados, para confirmar que la reacción de conjugación con las proteínas/enzima se había producido correctamente, se llevó a cabo la determinación de la relación molar (RM). Aprovechando que todos los haptenos sintetizados presentan un pico de absorción en el UV, la estimación de la carga hapténica se llevó a cabo mediante espectrofotometría UV-Vis. A modo de ejemplo, se muestra el espectro de absorción obtenido

para el conjugado OVA–TFc6, donde se observa una clara modificación del espectro de absorción de OVA por conjugación con moléculas del hapteno TFc6 (**Figura 3.8**). Como resultado, la absorbancia para el conjugado a una determinada longitud de onda se puede considerar la suma de las absorbancias del hapteno y de la proteína. Por tanto, calculados los coeficientes de extinción molar de ambos componentes, es posible estimar la relación molar proteína:hapteno mediante una serie de cálculos sencillos, tal como se detalla en la parte experimental (ver **apartado 5.4.1**). Este tipo de aproximación matemática, además de simple, resulta bastante precisa, ya que en aquellos casos en los que se ha realizado una comparación de los valores de RM determinados por UV y por MALDI–TOF se ha encontrado que guardan una estrecha correlación (Adamczyk *et al.*, 1994; Singh *et al.*, 2004; Mercader *et al.*, 2011).

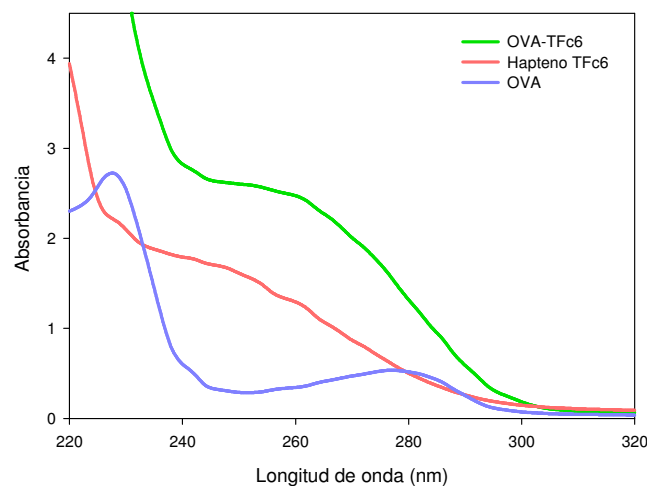


Figura 3.8. Modificación del espectro de absorción de OVA tras la conjugación con el hapteno TFc6. Los espectros UV–Vis se realizaron a partir de disoluciones 1 mg/mL para OVA y el conjugado OVA–TFc6 y 0.25 mM para TFc6

La importancia del valor de RM en el caso de los conjugados de BSA viene determinada por el hecho de que cargas bajas de hapteno pueden dar lugar a una débil respuesta inmunológica, mientras que cargas muy elevadas pueden reducir la afinidad de la respuesta inmune. Así pues, para los conjugados de BSA empleados en la inmunización son deseables relaciones molares de 1:10 a 1:20 (proteína:hapteno). Por otro lado, debido al carácter competitivo de los inmunoensayos, una carga hapténica elevada en los conjugados competidores

de ensayo puede traducirse en un mayor reconocimiento por parte de los anticuerpos, dificultando la unión de los mismos al analito libre, es decir, favoreciendo el equilibrio hacia la formación del complejo anticuerpo–conjugado en lugar de hacia el complejo anticuerpo–analito (Singh *et al.*, 2004). Por ello, la RM proteína:hapteno inicial empleada para la preparación de los conjugados de OVA fue menor que la que se utilizó para la preparación de los inmunógenos, y en el caso de los conjugados con HRP la RM inicial fue todavía menor, ya que, como se ha comentado, el empleo de RM elevadas puede causar la inactivación de la enzima.

Tabla 3.3.1. Valores de RM de los conjugados proteicos

Hapteno	Proteína de conjugación		
	BSA ^a	OVA ^b	HRP ^c
KMa6	14	4	5
KMb6	15	5	5
KMc6	16	3	4
KMe6	16	5	5
KMo6	13	3	4
TF0	10	5	5
TFa6	8	3	4
TFb6	19	5	3
TFc6	8	3	7
TFe6	10	3	7
TFo6	8	3	6
TFf6	19	3	4
TFt6	22	3	3

^a Proteína empleada para la preparación de inmunógenos. ^b Proteína empleada para la preparación de los conjugados de tapizado (ci-ELISA). ^c Enzima empleada para la preparación de los trazadores (cd-ELISA).

En la **Tabla 3.3.1** se muestra el valor de RM calculado para cada conjugado. Todos los valores de RM obtenidos para los conjugados de BSA y OVA se encuentran dentro del rango esperable en función del número de residuos de lisina accesibles para cada proteína.

En el caso particular de la conjugación con la enzima HRP, que sólo dispone de 4 lisinas accesibles para la conjugación, se observó que con más de la

mitad de los haptenos (KMa6, KMb6, KMe6, TF0, TFc6, TFe6 yTFo6) se obtenían valores de RM anómalos (entre 5 y 7). Esta sobreestimación podría ser debida a cambios en los coeficientes de extinción molar de algunos de los componentes a consecuencia de la conjugación, o a otros artefactos experimentales no determinados. No obstante, como se verá en secciones siguientes, estos trazadores funcionaron adecuadamente. Además, en nuestra experiencia, encontrar valores de RM superiores a los teóricos en los conjugados con HRP es una circunstancia habitual (Abad *et al.*, 1998; Mercader y Montoya, 1999; Suárez–Pantaleón *et al.*, 2008; Mercader *et al.*, 2008c y 2011).

3.4. Inmunización y producción de anticuerpos

Con la finalidad de obtener anticuerpos anti–KM y anti–TF, se inmunizaron animales de experimentación con los conjugados proteicos BSA–hapteno preparados para cada analito. En teoría, y debido a diferencias en el sistema inmunológico, el uso de distintas especies de animales para el proceso de inmunización con el mismo antígeno puede conducir a la producción de anticuerpos con diferentes propiedades (Harlow y Lane, 1988). Por ello, se decidió ensayar dos sistemas animales para la producción de anticuerpos: conejos para la obtención de pAbs, con la idea esencial de llevar a cabo un estudio básico para determinar en qué grado afecta la estructura del hapteno a la respuesta inmune, y ratones para la producción de mAbs con los que desarrollar inmunoensayos de elevada afinidad y selectividad.

3.4.1. Producción de anticuerpos policlonales

Existen gran cantidad de referencias bibliográficas en las que se ha descrito el desarrollo de inmunoensayos con elevada sensibilidad y selectividad basados en el uso de pAbs para la determinación de residuos alimentarios, debido principalmente a la facilidad de su producción (Raymond *et al.*, 1990; Schneider *et al.*, 1994; Watanabe *et al.*, 2002; Krämer *et al.*, 2004; Degelmann *et al.*, 2004; Ramehs *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2007; Ramón–Azcón *et al.*, 2009; Xu *et al.*, 2009; Liu *et al.*, 2010; Suárez–Pantaleón *et al.*, 2010). Este hecho, unido

a la menor carga de trabajo y coste que se requiere para su generación en comparación con los mAbs, así como a nuestro interés por analizar las diferencias en la respuesta inmune global que se puedan producir en función de la estructura del hapteno inmunizante, nos llevó a inmunizar un total de 26 hembras de conejo New Zealand, dos con cada uno de los conjugados BSA–hapteno. Estos conejos recibieron cuatro inyecciones subcutáneas del inmunógeno cada tres semanas, y diez días después de la cuarta inmunización fueron exanguinados (ver protocolo en la parte experimental), obteniéndose 10 antisueros de conejo para KM y 16 para TF (**Tabla 3.4.1**).

Tabla 3.4.1. Anticuerpos policlonales obtenidos para cada fungicida

Kresoxim–methyl		Trifloxystrobin	
Inmunógeno	rAs anti–KM	Inmunógeno	rAs anti–TF
BSA–KMa6	rKMa6#1, rKMa6#2	BSA–TFa6	rTFa6#1, rTFa6#2
BSA–KMb6	rKMb6#1, rKMb6#2	BSA–TFb6	rTFb6#1, rTFb6#2
BSA–KMc6	rKMc6#1, rKMc6#2	BSA–TFc6	rTFc6#1, rTFc6#2
BSA–KMe6	rKMe6#1, rKMe6#2	BSA–TFe6	rTFe6#1, rTFe6#2
BSA–KMo6	rKMo6#1, rKMo6#2	BSA–TFo6	rTFo6#1, rTFo6#2
		BSA–TFf6	rTFf6#1, rTFf6#2
		BSA–TF0	rTF0#1, rTF0#2
		BSA–TFt6	rTFt6#1, rTFt6#2

Todos estos rAs se caracterizaron mediante ELISA directo e indirecto para determinar la afinidad de los anticuerpos presentes en cada uno de ellos hacia los dos analitos de estudio. Los datos obtenidos se muestran más adelante.

3.4.2. Producción de anticuerpos monoclonales

Con el objetivo último de producir mAbs se inmunizaron cuatro hembras de ratón BALB/c con cada uno de los conjugados BSA–hapteno disponibles. La inmunización se realizó siguiendo el protocolo descrito en la parte experimental, mediante el cual los ratones recibieron cuatro inyecciones intraperitoneales del inmunógeno. Cuatro días después de la cuarta inmunización, los animales fueron sacrificados y se llevó a cabo la generación de hibridomas. El procedimiento completo de la fusión y las etapas posteriores

de estabilización de hibridomas y obtención de mAbs se detalla en la parte experimental.

3.4.2.1. Generación de hibridomas y producción de anticuerpos monoclonales

Las fusiones celulares se realizaron con todos los ratones inmunizados, en total 52 (20 ratones inmunizados con los conjugados BSA–hapteno de KM y 32 de TF), empleando protocolos bien establecidos para la generación de hibridomas (Mercader *et al.*, 2008a). El resumen de los resultados de las fusiones celulares se muestra en la **Tabla 3.4.2**.

En general, el rendimiento de las fusiones resultó satisfactorio. Está claro que una elevada eficiencia de fusión contribuye a incrementar la probabilidad de encontrar clones productores de anticuerpos de interés. Sin embargo, tal como se muestra en la tabla, incluso con eficiencias inferiores al 40–50% se lograron estabilizar un número de hibridomas equivalente al conseguido a partir de fusiones con rendimientos superiores al 80%.

La selección de líneas celulares productoras de anticuerpos anti–KM y anti–TF se realizó mediante un proceso secuencial de doble ensayo empleando el formato de ELISA indirecto y el conjugado de tapizado homólogo. En el primer ensayo, siguiendo la estrategia de **ELISA diferencial** desarrollada por Abad y Montoya en 1994, cada sobrenadante de cultivo se analizó en paralelo en ausencia y presencia de analito libre. Este sencillo análisis permitió identificar simultáneamente tanto clones positivos, es decir, pocillos cuyo sobrenadante contenía anticuerpos capaces de reconocer perfectamente al conjugado de tapizado, como clones productores de anticuerpos capaces de reconocer a los fungicidas en su forma libre (hibridomas o clones competitivos).

En este sentido, se obtuvieron clones positivos a partir de fusiones celulares llevadas a cabo con ratones inmunizados con todos los haptenos, si bien se observó una variabilidad importante en el número de clones positivos en función del inmunógeno de origen, que van desde 8 hasta 761 para KM y desde 4 hasta 644 para TF. Los inmunógenos BSA–KMb6 y BSA–TFt6 produjeron un porcentaje significativamente mayor de clones positivos que el

resto de conjugados inmunogénicos. Por el contrario, las fusiones realizadas a partir de ratones inmunizados con los conjugados BSA–KMa6 y BSA–TFa6 fueron las que dieron lugar al menor número de clones positivos.

Llegados a este punto, con la intención de seleccionar los mejores hibridomas para su posterior clonación y expansión, se llevó a cabo un segundo estudio para un gran número de clones positivos utilizando un **ensayo de tipo bidimensional competitivo** (Mercader *et al.*, 2008a). Así, se evaluaron los sobrenadantes a varias diluciones frente a varias concentraciones de analito y a varias concentraciones de conjugado de tapizado, lo que permitió clasificar los hibridomas en función de la afinidad que mostraban hacia los dos compuestos diana.

Es importante destacar que a partir de todos los haptenos sintetizados se pudieron obtener hibridomas productores de anticuerpos capaces de reconocer a las dos estrobilurinas objeto de estudio (clones competitivos). Dentro de este contexto, resulta relevante que en algunos casos se observó cierta heterogeneidad en la obtención y estabilización de hibridomas (*e.g.* BSA–KMo6; ratones 1 y 2), dato que refuerza la decisión de llevar a cabo fusiones celulares con todos los animales inmunizados. Por último, una vez asegurado el carácter monoclonal de los hibridomas seleccionados tras sucesivas clonaciones, las células se expandieron y se recogió el sobrenadante de cultivo. Los procedimientos detallados para cada una de estas etapas se exponen en la parte experimental.

En total se seleccionaron, clonaron y estabilizaron 46 líneas celulares de hibridoma, 17 de ellas para KM y 29 para TF. Tras la purificación por cromatografía de afinidad de los 46 mAbs producidos, se llevó a cabo su isotipación, resultando ser todos ellos de isotipo IgG₁, a excepción de los mAbs KMa6#26, KMb6#322, TFo6#14 y TFt6#316 que presentaron isotipo IgG_{2b}, y el mAb TFa6#22, de isotipo IgG_{2a}. Todos los mAbs poseían cadenas ligeras de tipo κ .

Los 46 mAbs producidos se caracterizaron mediante ELISAs competitivos, tanto en el formato indirecto como en el directo. Los resultados obtenidos se muestran en la **sección 3.5.2**.

Tabla 3.4.2. Resumen de las fusiones celulares y selección de hibridomas

Conjugado inmunizante	Fusión n°	Eficiencia fusión (%) ^a	Número de pocillos			Hibridomas estabilizados
			Cultivados	Positivos ^b	Competitivos ^c	
BSA-KMa6	1*	32	384	8	4	0
	2*	46	960	17	10	2
BSA-KMb6	1	59	78	68	10	1
	2	45	576	19	4	0
	3	91	672	653	10	2
	4	77	768	761	10	1
BSA-KMc6	1	58	1152	33	11	0
	2	94	768	24	10	1
	3*	47	768	119	9	1
BSA-KMe6	1*	33	1056	24	8	2
	2*	45	864	50	7	2
BSA-KMo6	1	93	864	97	10	5
	2	88	864	50	4	0
	3	19	480	19	5	0
	4	17	576	95	1	0
BSA-TFa6	1*	33	576	6	1	1
	2*	58	960	13	6	3
BSA-TFb6	1	78	864	23	6	1
	2	53	480	4	0	0
	3	45	960	56	3	0
	4	81	672	23	4	1
BSA-TFc6	1**	75	960	200	10	3
	1	26	672	16	3	0
BSA-TFe6	2	29	672	31	7	2
	3	82	672	107	3	2
	4	49	960	453	6	0
	1*	85	1152	57	14	4
BSA-TFo6	2*	39	864	5	0	0
	1*	47	1344	38	5	1
BSA-TFf6	2*	39	1056	30	8	2
	1	41	768	120	10	1
BSA-TFt6	2	22	864	635	4	3
	3*	58	1440	644	10	4
	1	80	576	31	7	1
BSA-TF0	2	65	672	18	0	0

^a Porcentaje de pocillos cultivados que mostraron crecimiento celular claro mediante inspección visual al microscopio 11 días después de la fusión. ^b Se consideraron positivos aquellos pocillos con valores de A_{max} por encima de 0.5 en ausencia de analito. ^c Pocillos con inhibición de la señal $\geq 50\%$ a una concentración de KM y TF de 100 nM. * Se mezclaron los linfocitos de los bazo de dos ratones y se fusionaron conjuntamente. ** Uno de los ratones falleció y se fusionaron conjuntamente los linfocitos de los tres ratones de TFc6.

3.5. Caracterización de anticuerpos

Todos los trabajos de caracterización realizados para determinar la afinidad de los pAbs y mAbs hacia los analitos de estudio se llevaron a cabo mediante

el uso de ELISAs bidimensionales competitivos directos e indirectos (Mercader *et al.*, 2008c; Esteve-Trujillas *et al.*, 2010). Estos ensayos se realizaron utilizando los procedimientos descritos en la parte experimental e ilustrados en el **apartado 1.6.4** de la introducción.

Para una adecuada evaluación de la afinidad es necesario trabajar a las concentraciones de inmunorreactivos óptimas para cada anticuerpo, ya que los valores de IC_{50} de las curvas de inhibición son consecuencia de un delicado balance de las concentraciones de los inmunorreactivos que participan. En este sentido, un ensayo bidimensional competitivo consiste en combinar en una misma placa de ELISA de 96 pocillos varias concentraciones de anticuerpo frente a varias concentraciones de conjugado de tapizado o de trazador enzimático, según el formato utilizado, usando para cada combinación una curva patrón completa de analito. De este modo se genera una curva de inhibición de analito para cada combinación de reactivos, lo que propicia una evaluación más rigurosa de la afinidad de los anticuerpos.

3.5.1. Caracterización de anticuerpos policlonales de conejo

Con el objetivo último de realizar un estudio básico, sistemático y exhaustivo sobre la influencia que ejerce la posición del brazo espaciador en los distintos haptenos en la afinidad de los anticuerpos producidos hacia los dos fungicidas de estudio, se llevó a cabo la caracterización de la colección de rAs producidos tanto para KM como para TF. También este estudio fue dirigido a proporcionar algo de luz sobre si los resultados independientes obtenidos para cada fungicida son comparables entre sí.

3.5.1.1. Formato directo o de anticuerpo inmovilizado

Todos los rAs fueron caracterizados siguiendo la estrategia bidimensional planteada para el formato de anticuerpo inmovilizado. En este formato se ensayaron en una misma placa tres diluciones de cada rAs (1/3000, 1/10000 y 1/30000) frente a cuatro concentraciones de cada trazador enzimático (10, 30, 100 y 300 ng/mL). Cada rAs se ensayó tanto con su trazador homólogo como con los trazadores heterólogos, en total cuatro para KM y siete para TF. A cada

combinación se añadió una curva patrón constituida por siete concentraciones de analito (desde 10 μM en ensayo, factor de dilución 10) más un blanco.

A partir de la familia de curvas obtenidas para cada rAs con cada trazador enzimático, se seleccionaron las combinaciones que proporcionaron un menor valor de IC_{50} para una señal de absorbancia máxima entre 0.7 y 1.5.

A modo de resumen y para facilitar la interpretación de los datos, éstos se presentan divididos por analito en la **Tabla 3.5.1** (rAs para KM) y **3.5.2** (rAs para TF). En primer lugar nos centraremos en los resultados obtenidos por parte de los rAs producidos hacia KM y en segundo lugar se comentarán los resultados obtenidos para los rAs de TF.

La primera conclusión importante que se deriva de los datos recogidos en la **Tabla 3.5.1** es que los cinco inmunógenos basados en los cinco haptenos sintetizados generaron pAbs capaces de reconocer a KM. Además, también se observa que las respuestas inmunes generadas fueron bastante reproducibles, ya que los pAbs de los conejos inmunizados con el mismo conjugado BSA–hapteno presentaron valores de IC_{50} equivalentes, a excepción de los rAs obtenidos con el hapteno KMa6, los cuales mostraron una diferencia de afinidad hacia KM de cuatro veces.

Sin embargo, a pesar de que todos los haptenos generaron pAbs anti–KM, se aprecian importantes diferencias en términos de afinidad entre unos y otros haptenos. Si nos fijamos exclusivamente en los valores de IC_{50} obtenidos en las combinaciones homólogas (diagonal de la tabla), podría decirse que los rAs derivados de los haptenos KMb6 y KMc6 muestran una menor afinidad hacia KM, seguidos de los procedentes de KMa6, KMe6 y, sobre todo KMo6, los cuales muestran una afinidad claramente mayor.

Tabla 3.5.1. Afinidad de los antisueros de conejo frente a kresoxim–methyl en el formato de ELISA competitivo directo.

Valores de IC ₅₀ (nM) ^a					
Trazadores Enzimáticos HRP–hapteno					
rAs	KMa6	KMb6	KMc6	KMe6	KMo6
KMa6#1	28	b			5
KMa6#2	<i>117</i>				25
KMb6#1		<i>350</i>	36	16	<u>13</u>
KMb6#2		300	<u>19</u>	9	
KMc6#1	<u>268</u>	30	<i>180</i>	2	
KMc6#2	76	1000	<i>200</i>		
KMe6#1	23	<u>12</u>	<u>4</u>	11	<u>5</u>
KMe6#2	<i>48</i>	<u>20</u>	<i>9</i>	<i>27</i>	
KMo6#1				4	<u>3</u>
KMo6#2	<u>4</u>	5		<u>3</u>	<i>7</i>

^a Cada valor de IC₅₀ representa el promedio de tres experimentos independientes. ^b Las celdas vacías representan aquellas combinaciones para las que se obtuvo una señal de absorbancia inferior a 0.7 empleando una concentración de trazador enzimático de 300 ng/mL y una dilución del antisuero de 1/3000. El estilo de la fuente para los valores de IC₅₀ se refiere a la concentración de tapizado: **negrita**: rAs a 1/3000; **subrayado**: rAs a 1/10000; **normal**: rAs a 1/30000. El estilo de fuente en cursiva corresponde a los ensayos homólogos (diagonal de la tabla). El código de colores hace referencia al cociente obtenido al dividir el valor de IC₅₀ del ensayo homólogo por el valor de IC₅₀ del ensayo heterólogo. Así, **rojo**: cociente < 0.5; **crema**: 0.5 ≤ cociente < 3; **verde claro**: 3 ≤ cociente < 5; **verde oscuro**: 5 ≤ cociente < 10; **azul**: cociente ≥ 10.

En la **Figura 3.9** se muestran las curvas de inhibición obtenidas con el mejor de los antisueros generado a partir de cada hapteno. Estos resultados demuestran que la posición en la que se introduce el brazo espaciador en la estructura de KM influye en la afinidad de los anticuerpos producidos. Así, los rAs obtenidos a partir de haptenos que incorporan el brazo espaciador sobre los anillos aromáticos, es decir, las aproximaciones tipo 'a', 'b' y 'c', presentan todos ellos una menor afinidad hacia KM. En contraposición, los haptenos funcionalizados a través del grupo toxóforo (KMe6 y KMo6) resultaron ser los más adecuados para la producción de pAbs para este fungicida. De hecho, las curvas obtenidas utilizando antisueros de los citados haptenos muestran una inhibición completa de la señal con 10 μM KM, mientras que se observa una menor inhibición con los antisueros obtenidos a partir de los restantes haptenos. Merece la pena destacar que el rAs rKMo6#1, con un valor de IC₅₀ de 3 nM, resultó ser con diferencia el mejor de todos los antisueros. En

principio, la estrategia de incorporar el brazo espaciador sobre anillos aromáticos a través de simples enlaces C–C introduce pocas modificaciones electrónicas en el anillo, razón por la que se seleccionó. Lo cierto es que, aunque en este trabajo en particular no parece haber funcionado de forma óptima, ha proporcionado excelentes resultados con otros haptenos/analitos (Suárez–Pantaleón *et al.*, 2010; Parra *et al.*, 2011b). La razón por la que en este caso parece no haber funcionado tan bien como sería esperable en base a resultados previos y estimaciones teóricas, en particular con el hapteno KMc6, se nos escapa.

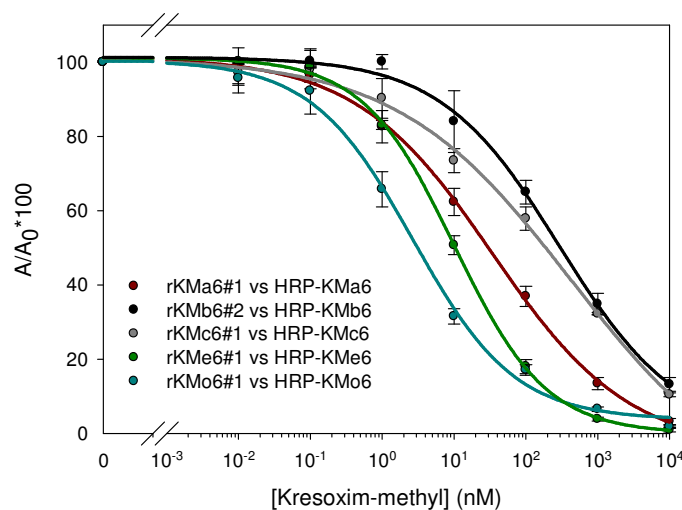


Figura 3.9. Reconocimiento de KM por antisueros de conejo ensayados por ELISA directo homólogo. Las curvas de inhibición normalizadas corresponden a los mejores antisueros obtenidos a partir de cada uno de los haptenos inmunizantes. La concentración de rAs en el tapizado fue para rKMa6#1 de 1/30000, para rKMb6#2 de 1/10000, para rKMc6#1 de 1/10000, para rKMe6#1 de 1/30000 y para rKMo6#1 de 1/10000. Las concentraciones de los trazadores empleadas en cada combinación fueron: (●) 10 ng/mL, (●) 30 ng/mL, (●) 10 ng/mL, (●) 30 ng/mL y (●) 10 ng/mL. Los valores obtenidos son la media de 3 experimentos independientes.

En cuanto al empleo de trazadores heterólogos, es decir, trazadores HRP preparados con haptenos diferentes al empleado en la inmunización, se observó una respuesta muy variable y dependiente del hapteno de origen, de forma que hubo rAs que sólo reconocieron a un trazador heterólogo (rKMa6#1, rKMa6#2 y rKMo6#1), mientras que otros fueron capaces de reconocer a la mayoría e incluso a todos los trazadores (rKMe6#1). En este caso tampoco se observaron diferencias importantes de reconocimiento hacia trazadores heterólogos por parte de cada pareja de rAs, a excepción de los antisueros

obtenidos a partir del hapteno KMo6. En este caso en particular, mientras que el rAs rKMo6#2 reconoce a todos los trazadores excepto a HRP–KMc6, el rAs rKMo6#1 sólo es capaz de reconocer al heterólogo HRP–KMe6. Esto demuestra que las poblaciones que componen cada antisuero son distintas pese a haber sido obtenidos a partir del mismo hapteno, lo que no hace más que confirmar la variabilidad de los resultados obtenidos con sistemas vivos.

Como ya se comentó en la introducción, la utilización de conjugados heterólogos puede modificar la afinidad aparente de los anticuerpos hacia un analito. Así pues, se decidió averiguar si las conclusiones establecidas previamente mediante ELISA homólogo, referentes a la idoneidad estructural de unos haptenos sobre otros, se modificaban en alguna medida cuando los antisueros se ensayaban mediante ELISA heterólogo.

En líneas generales, para la mayor parte de los antisueros hubo al menos un trazador heterólogo frente al cual la IC_{50} del ensayo correspondiente fue menor que la obtenida utilizando el conjugado homólogo. Sin embargo, mientras que los rAs de KMe6 y KMo6 no mejoraron significativamente su afinidad con el uso de heterólogos, quizás porque estos antisueros ya presentaban afinidades relativamente elevadas, para el resto de rAs (los que peores resultados proporcionaron en ELISA homólogo) esta estrategia resultó especialmente eficiente, consiguiendo aumentar la afinidad de los mismos hacia KM incluso hasta en dos órdenes de magnitud.

En la **Figura 3.10** se muestra como ejemplo representativo las curvas de inhibición de los rAs rKMb6#2 y rKMc6#1, los cuales mejoran claramente su afinidad hacia KM usando los conjugados heterólogos apropiados. Para apreciar mejor el grado de mejora que se puede conseguir, para cada uno de los antisueros se incluye además de la curva más significativa de las heterólogas, su curva homóloga. Tal y como se puede apreciar en la **Figura 3.10** estos antisueros originaron curvas de inhibición completas mediante la utilización de trazadores heterólogos, cuando con anterioridad no mostraron asíntotas inferiores bien definidas empleando trazadores homólogos.

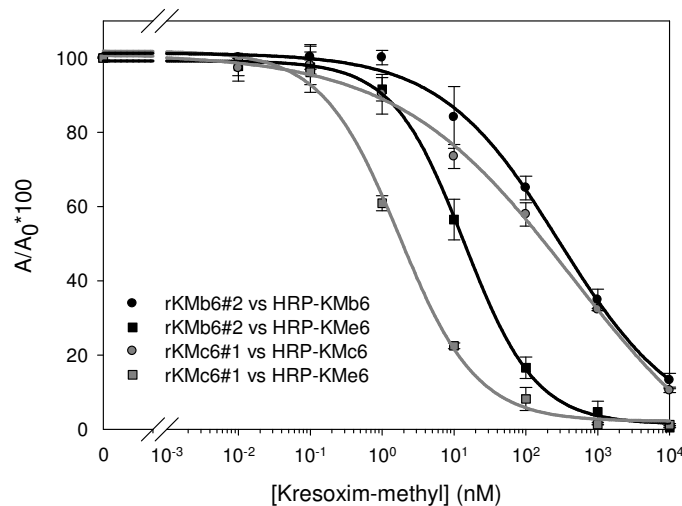


Figura 3.10. Influencia de la heterología de hapteno sobre la afinidad de los antisueros rKMb6#2 y rKMc6#1 en el formato directo. La concentración de tapizado fue para rKMb6#2 de 1/10000 tanto con HRP-KMb6 como con HRP-KMe6, y para rKMc6#1 fue de 1/10000 con HRP-KMc6 y de 1/3000 con HRP-KMe6. Las concentraciones de los trazadores empleadas en cada combinación fueron: (●) 30 ng/mL, (■) 100 ng/mL, (○) 10 ng/mL, (□) 100 ng/mL. El intervalo de A_{max} obtenido para las curvas de inhibición fue de 1.0–1.3. Los valores obtenidos son la media de 3 experimentos independientes.

Con independencia de todo lo anteriormente expuesto, conviene destacar que, en términos absolutos y empleando trazadores heterólogos, prácticamente todos los antisueros se igualan, es decir son capaces de mostrar una buena afinidad hacia KM, con valores de IC_{50} comparables. Aun así, los menores valores de IC_{50} , y en consecuencia los antisueros con una mayor afinidad, siguen siendo los obtenidos a partir de los haptenos KMe6 y sobre todo a partir de KMo6, lo cual no hace sino confirmar la conclusión previa de que KMe6 y KMo6 son los haptenos estructuralmente más adecuados para la producción de pAbs hacia KM.

Finalmente, habría que indicar que si se quisiera desarrollar un inmunoensayo para la detección de KM basado en pAbs, objetivo inicialmente no contemplado en la presente Tesis Doctoral, las mejores combinaciones de inmunorreactivos estarían constituidas por el rAs rKMo6#1 junto con el trazador enzimático HRP-KMo6 (ensayo homólogo) y por el rAs rKMc6#1 con el trazador HRP-KMe6 (ensayo heterólogo).

Por otra parte, de los resultados de caracterización obtenidos para los rAs producidos hacia TF (**Tabla 3.5.2**), al igual que en el caso de KM, una de las

principales conclusiones es que con los diferentes inmunógenos preparados se obtuvieron pAbs capaces de reconocer a TF.

Tabla 3.5.2. Afinidad de los antisueros de conejo frente a trifloxystrobin en el formato de ELISA competitivo directo

Valores de IC ₅₀ (nM) ^a								
Trazadores Enzimáticos HRP–hapteno								
rAs	TF0	TFa6	TFb6	TFc6	TFe6	TFo6	TFf6	TFt6
TF0#1	^b				26	36		
TF0#2					28	31		
TFa6#1		1000			88	60		
TFa6#2		218			118	42		
TFb6#1		660	48	69	10	155	68	116
TFb6#2			141	22	13	15	36	44
TFc6#1		1000		269	30		12	21
TFc6#2		118	595	142	47	54	104	106
TFe6#1		23			52	42	72	69
TFe6#2		127			32	21	50	47
TFo6#1		72			35	44		
TFo6#2		62			40	38		
TFf6#1			735	276	15		195	161
TFf6#2				2	2		9	10
TFt6#1			102	143	4		50	75
TFt6#2			800	800	6		127	145

^a Cada valor de IC₅₀ representa el promedio de tres experimentos independientes. ^b Las celdas vacías representan aquellas combinaciones para las que se obtuvo una señal de absorbancia inferior a 0.7 empleando una concentración de trazador enzimático de 300 ng/mL y una dilución del antisuero de 1/3000. El estilo de la fuente para los valores de IC₅₀ se refiere a la concentración de tapizado: **negrita**: rAs a 1/3000; **subrayado**: rAs a 1/10000; **normal**: rAs a 1/30000. El estilo de fuente en cursiva corresponde a los ensayos homólogos (diagonal de la tabla). El código de colores hace referencia al cociente obtenido al dividir el valor de IC₅₀ del ensayo homólogo por el valor de IC₅₀ del ensayo heterólogo. Así, **rojo**: cociente < 0.5; **crema**: 0.5 ≤ cociente < 3; **verde claro**: 3 ≤ cociente < 5; **verde oscuro**: 5 ≤ cociente < 10; **azul**: cociente ≥ 10.

Como se puede observar en la **Tabla 3.5.2**, también para TF, cada pareja de conejos inmunizada con el mismo conjugado generó respuestas muy similares (ensayo homólogo, diagonal de la tabla), excepto en el caso del hapteno TFf6, para el cual el rAs rTFf6#2 mostró una afinidad un orden de magnitud mayor que el rAs rTFf6#1. Además, los distintos valores de IC₅₀ obtenidos mediante la aproximación homóloga demuestran de nuevo que, al igual que sucedía con los

rAs de KM, en función de la estructura del hapteno inmunizante se consiguen pAbs de mayor o menor afinidad hacia TF. En la **Figura 3.11** se muestra las curvas de inhibición del mejor antisuero obtenidas a partir de cada hapteno. Lo cierto es que, salvo la excepción anteriormente mencionada para el rAs rTFf6#2, los haptenos que mejores resultados proporcionaron, es decir, los que mostraron una mayor afinidad hacia TF, fueron de nuevo los que incorporaban el brazo espaciador por el grupo toxóforo (aproximaciones tipo 'e' y 'o'), si bien en este caso las diferencias no son tan evidentes, pudiendo establecerse en consecuencia el siguiente orden $\text{TFo6} \cong \text{TFe6} > \text{TFb6} \cong \text{TFt6} \cong \text{TFf6} > \text{TFc6} > \text{TFa6}$ (de mayor a menor afinidad).

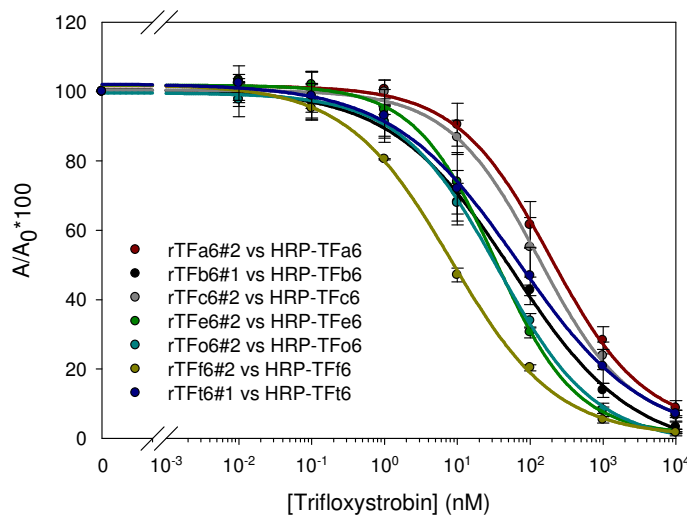


Figura 3.11. Reconocimiento de TF por antisueros de conejo ensayados por ELISA directo homólogo. Las curvas de inhibición normalizadas corresponden a los mejores antisueros obtenidos a partir de cada uno de los haptenos inmunizantes. La concentración de tapizado fue para rTFa6#2 de 1/3000, para rTFb6#1 de 1/3000, para rTFc6#2 de 1/30000, para rTFe6#2 de 1/10000, para rTFo6#2 de 1/3000, para rTFf6#2 de 1/3000 y para rTFt6#1 de 1/3000. Las concentraciones de los trazadores empleadas en cada combinación fueron: (●) 30 ng/mL, (●) 10 ng/mL, (●) 30 ng/mL, (●) 10 ng/mL, (●) 10 ng/mL, (●) 10 ng/mL y (●) 10 ng/mL. Los valores obtenidos son la media de 3 experimentos independientes

En el caso particular de los antisueros procedentes del hapteno TF0 (que no presenta brazo espaciador) no fue posible llevar a cabo ELISAs homólogos, debido a que tanto el rAs rTF0#1 como el rAs rTF0#2 no muestran reconocimiento hacia su trazador. Sin embargo, si nos fijamos en los datos detalladamente, observamos que ambos antisueros sí que reconocen perfectamente a otros trazadores (HRP-KMe6 y HRP-KMo6), lo que podría

indicar una preparación defectuosa del trazador HRP-TF0. No obstante, la ausencia de reconocimiento hacia trazadores que no presentan brazo espaciador ha sido documentada previamente (Abad *et al.*, 1997a; Mercader y Montoya, 1999), habiéndose atribuido generalmente a impedimentos estéricos como consecuencia de la proximidad entre el hapteno y la enzima e incluso a una posible inactivación de esta última (Manclús *et al.*, 1996).

Con respecto a la heterología, la primera observación que se puede hacer de la **Tabla 3.5.2** es que los rAs de TF exhiben un mayor grado de reconocimiento hacia distintos trazadores heterólogos que los rAs de KM y además, en general, cada pareja de rAs reconoce al mismo número de trazadores heterólogos. En este sentido, el reconocimiento es mayor hacia trazadores funcionalizados por el mismo anillo aromático, aunque también en ciertos casos son reconocidos trazadores compuestos por haptenos con el brazo espaciador en la posición opuesta. El trazador HRP-TFe6 es el único reconocido por todos los antisueros.

En base a los resultados mostrados en la **Tabla 3.5.2**, podemos afirmar que el uso de heterología también sirvió para mejorar en muchas ocasiones la afinidad aparente hacia TF, consiguiendo rebajar los valores de IC_{50} de los correspondientes ensayos homólogos. Además, para aquellos antisueros que experimentaron una mejora en la afinidad, ese efecto se generó con varios trazadores heterólogos, especialmente en el caso de los rAs rTFb6#2 y rTFc6#1. Mención aparte merece el rAs rTFt6#2, que combinado con HRP-TFe6, muestra una IC_{50} de 6 nM, mejorando por lo tanto su afinidad hacia TF en un orden de magnitud. Para mayor claridad visual del potencial de la heterología, en la **Figura 3.12** se muestran las curvas de inhibición heterólogas más significativas obtenidas para los rAs rTFb6#2, rTFc6#1 y rTFt6#2, junto con su curva homóloga.

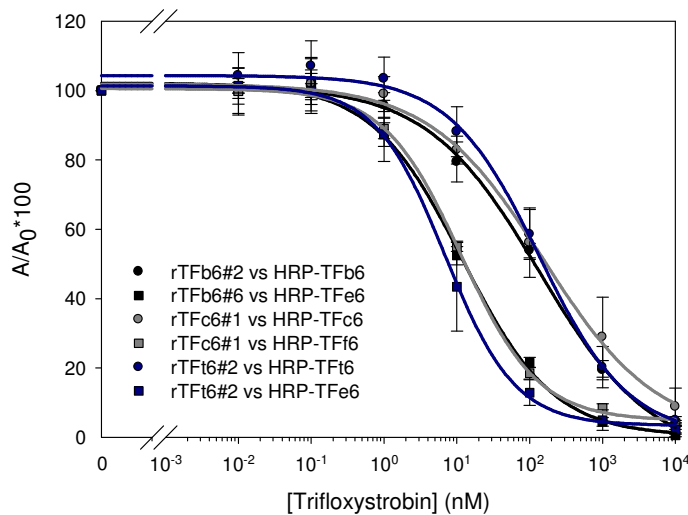


Figura 3.12. Influencia de la heterología de hapteno sobre la afinidad de los antisueros rTFb6#2, rTFc6#1 y rTFt6#2 en el formato directo. La concentración de tapizado fue para rTFb6#2 de 1/10000 con HRP-TFb6 y HRP-TFe6, para rTFc6#1 de 1/10000 con HRP-TFc6 y de 1/3000 con HRP-TFf6, y para rTFt6#2 fue de 1/30000 con HRP-TFt6 y de 1/10000 con HRP-TFe6. Las concentraciones de los trazadores empleadas en cada combinación fueron: (●) 10 ng/mL, (■) 30 ng/mL, (◐) 30 ng/mL, (◑) 30 ng/mL, (◕) 10 ng/mL, (◔) 100 ng/mL. El intervalo de A_{max} obtenido para las curvas de inhibición fue de 0.8–1.2. Los valores obtenidos son la media de 3 experimentos independientes.

Finalmente, cabe destacar que, de los rAs producidos hacia TF, el que ofrece una mayor afinidad fue rAs rTFt6#2, que aun mostrando una buena afinidad en formato homólogo, consigue rebajar su valor de IC_{50} hasta 2 nM con el uso de los trazadores heterólogos HRP-TFc6 y HRP-TFe6. Por lo tanto, en el caso hipotético de querer desarrollar un inmunoensayo para la determinación de TF en muestras agroalimentarias basado en pAbs, indiscutiblemente se llevaría a cabo con este antisuero en combinación con alguno de los dos trazadores anteriormente mencionados.

3.5.1.2. Formato indirecto o de conjugado inmobilizado

Con el objetivo de confirmar los resultados obtenidos tras la caracterización de los rAs en el formato directo, se realizó un experimento competitivo bidimensional en el formato indirecto. Para ello, se ensayaron en una misma placa ELISA seis diluciones de cada antisuero (1/3000, 1/10000, 1/30000, 1/100000, 1/300000 y 1/1000000) frente a dos concentraciones de cada conjugado de OVA (0.1 y 1.0 $\mu\text{g/mL}$), empleando tanto el conjugado homólogo como los heterólogos. De nuevo, las curvas patrón de los analitos para la

competición incluyeron siete concentraciones (desde 10 μM en ensayo, factor de dilución 10) más un blanco.

En este caso, también se seleccionaron como combinaciones de inmunorreactivos más adecuadas aquéllas que proporcionaron un menor valor de IC_{50} para una señal de absorbancia máxima entre 0.7 y 1.5.

Al igual que se ha realizado en el apartado previo y para facilitar la presentación y discusión de los datos obtenidos, éstos se esbozan resumidos en la **Tabla 3.5.3** (rAs para KM) y en la **Tabla 3.5.4** (rAs para TF).

Tabla 3.5.3. Afinidad de los antisueros de conejo frente a kresoxim–methyl en el formato de ELISA competitivo indirecto.

Valores de IC_{50} (nM) ^a					
Conjugados de Tapizado OVA–hapteno					
rAs	KMa6	KMb6	KMc6	KMe6	KMo6
KMa6#1	244	200	487	51	18
KMa6#2	526	22	65	18	71
KMb6#1	12	<i>620</i>	432	38	133
KMb6#2	39	240	64	59	212
KMc6#1	126	31	<i>2000</i>	10	140
KMc6#2	737	1000	712	339	1000
KMe6#1	78	16	23	101	22
KMe6#2	155	29	102	154	19
KMo6#1	4	1	9	2	15
KMo6#2	10	4	28	12	63

^a Cada valor de IC_{50} representa el dato obtenido en un único experimento. El estilo de la fuente para los valores de IC_{50} se refiere a la concentración de tapizado: **negrita**: 0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$; **normal**: 1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$. El estilo de fuente en cursiva corresponde a los ensayos homólogos (diagonal de la tabla). El código de colores hace referencia al cociente obtenido al dividir el valor de IC_{50} del ensayo homólogo por el valor de IC_{50} del ensayo heterólogo. Así, **crema**: $0.5 \leq \text{cociente} < 3$; **verde claro**: $3 \leq \text{cociente} < 5$; **verde oscuro**: $5 \leq \text{cociente} < 10$; **azul**: $\text{cociente} \geq 10$.

Tabla 3.5.4. Afinidad de los antisueros de conejo frente a trifloxystrobin en el formato de ELISA competitivo indirecto

Valores de IC ₅₀ (nM) ^a								
Conjugados de Tapizado OVA–hapteno								
rAs	TF0	TFa6	TFb6	TFc6	TFe6	TFo6	TFf6	TFt6
TF0#1	882	b			96	102		
TF0#2	371				75	108		
TFa6#1	22	707			104	111		
TFa6#2	54	187			81	67		
TFb6#1	110	435	465	256	38	279	43	40
TFb6#2	238	395	250	52	60	17	120	108
TFc6#1	15	661	11	534	56	223	5	6
TFc6#2	48	22	431	81	35	19	50	176
TFe6#1	14	39	37	43	34	28	23	55
TFe6#2	22	26	27	14	38	30	21	35
TFo6#1	44	94			146	265		
TFo6#2	31	113			41	45		
TFf6#1	28	11613	491	624	138	2	1821	420
TFf6#2	10		264	5	2	2	48	54
TFt6#1	3		1145	194	5	5	167	523
TFt6#2	5	451	181	104	6	13	145	154

^a Cada valor de IC₅₀ representa el valor obtenido en un único experimento. ^b Las celdas vacías representan aquellas combinaciones para las que a una concentración de tapizado de 1 µg/mL y a una dilución 1/3000 de rAs se obtuvo una señal de absorbancia inferior a 0.7. El estilo de la fuente para los valores de IC₅₀ se refiere a la concentración de tapizado: **negrita**: 0.1 µg/mL; **normal**: 1.0 µg/mL. El estilo de fuente en cursiva corresponde a los ensayos homólogos (diagonal de la tabla). El código de colores hace referencia al cociente obtenido al dividir el valor de IC₅₀ del ensayo homólogo por el valor de IC₅₀ del ensayo heterólogo. Así, **rojo**: cociente < 0.5; **crema**: 0.5 ≤ cociente < 3; **verde claro**: 3 ≤ cociente < 5; **verde oscuro**: 5 ≤ cociente < 10; **azul**: cociente ≥ 10.

La principal conclusión que se extrae de este experimento es que, en líneas generales, se confirman los resultados obtenidos anteriormente en el formato directo. En este sentido, no sólo se corroboró que los diferentes inmunógenos preparados para ambos fungicidas producen pAbs capaces de reconocer, aunque con diferente afinidad, a KM y TF, sino que además las respuestas generadas por cada pareja de rAs también resultan ser bastante similares. Igualmente se observó una gran disparidad entre la afinidad de los dos antisueros obtenidos para TFf6, nuevamente con un orden de magnitud de diferencia entre los valores de IC₅₀ de ambos.

Con respecto a la mayor idoneidad de un hapteno u otro para inducir anticuerpos anti-KM y/o anti-TF, los resultados obtenidos en el ensayo homólogo también confirmaron que los rAs obtenidos a partir de los haptenos tipo 'e' y 'o' muestran una respuesta competitiva significativamente mayor que el resto de aproximaciones. No obstante, se observa una cierta diferencia entre los valores de IC_{50} de este formato con los obtenidos en el formato directo, siendo este último con el que se consigue, en general, una mayor sensibilidad para estos antisueros. A modo de ejemplo, el mejor de los rAs producidos hacia KM y TF en el formato directo, rKMo6#1 ($IC_{50} = 3$ nM) y rTFf6#2 ($IC_{50} = 9$ nM), presenta en el formato indirecto valores de IC_{50} de 15 nM y 48 nM, respectivamente.

En cuanto al empleo de conjugados heterólogos, tal y como se puede observar en la **Tabla 3.5.3** y en la **Tabla 3.5.4**, los pAbs mostraron un perfil de reconocimiento hacia los distintos conjugados de ensayo más permisivo que en el formato directo, ya que en este formato la mayoría de rAs reconocen a todos los competidores heterólogos. Esto no resulta extraño, ya que normalmente el número de conjugados enzimáticos unidos por los anticuerpos inmovilizados es claramente inferior al número de conjugados de OVA reconocidos por los mismos anticuerpos en solución. Se han descrito resultados similares con respecto a un escaso, o incluso nulo, reconocimiento de haptenos cuando se acoplan a HRP, mientras que estos mismos haptenos son perfectamente reconocidos por los anticuerpos cuando se conjugan a proteínas portadoras (Bekheit *et al.*, 1993; Abad *et al.*, 1998; Galve *et al.*, 2002; Pastor-Navarro *et al.*, 2004; Brun *et al.*, 2004 y 2005; Mercader *et al.*, 2011). Aun así, este resultado de reconocimiento resultó llamativo, teniendo en cuenta que con los haptenos heterólogos se ofrecen a los anticuerpos partes de la molécula muy diferentes a las que se presentan con el hapteno inmunizante durante el proceso de formación biológica del inmunorreactivo.

En este caso, al igual que en los casos anteriormente expuestos, el uso de heterología de hapteno también resultó una estrategia muy útil para mejorar notablemente la afinidad aparente de los rAs por su analito, consiguiendo por lo tanto disminuir significativamente los valores de IC_{50} de los correspondientes ensayos homólogos, en dos órdenes de magnitud para KM (*e.g.* rKM6#1 vs

OVA–KMe6) y hasta en tres órdenes de magnitud en el caso de TF (e.g. rTFf6#1 vs OVA–TFo6).

Por último, merece la pena destacar que, al igual que en el formato directo, los ensayos de mayor afinidad fueron obtenidos con el rAs rKMo6#1 (para KM), en este caso usando como conjugado de tapizado OVA–KMb6#1 ($IC_{50} = 1$ nM) y con el rAs rTFf6#2 (para TF) con, por ejemplo, el heterólogo OVA–TFe6 ($IC_{50} = 2$ nM), lo que no hace más que confirmar que ambos antisueros serían los más adecuados en el caso de que se quisiera finalmente desarrollar un inmunoensayo.

3.5.1.3. Conclusiones generales de la caracterización de los anticuerpos policlonales

En base a la amplia caracterización de todos los rAs haciendo uso del formato directo y posterior confirmación en el formato indirecto, podemos concluir que con todos los inmunógenos BSA–hapteno preparados se consigue obtener pAbs capaces de reconocer a cada uno de los dos analitos de estudio. No obstante, en este estudio se ha demostrado que no todas las aproximaciones sintéticas son igualmente satisfactorias, obteniéndose diferentes respuestas inmunes en función de la posición en la que se incorpora el brazo espaciador dentro de la estructura del hapteno. Más concretamente, la estrategia de funcionalización de los haptenos a través del grupo toxóforo (aproximación tipo ‘e’ y ‘o’) para ambos fungicidas resulta más apropiada que el resto de aproximaciones sintéticas. Por lo tanto, estos resultados parecen sugerir que en el caso de moléculas que poseen restos con elevada libertad conformacional, resultaría conveniente introducir el brazo espaciador en esta posición para así ofrecer al sistema inmune la zona menos flexible, es decir, la más rígida.

En cuanto al uso de la heterología, tanto con los rAs de KM como con los de TF, ha proporcionado en muchas ocasiones mejoras importantes de la afinidad aparente, lo que confirma la utilidad de esta estrategia para el eventual desarrollo de métodos inmunoquímicos basados en anticuerpos policlonales.

A tenor de los resultados obtenidos y con la finalidad de desarrollar inmunoensayos para la detección de KM y TF, todos los haptenos sintetizados fueron utilizados para la producción de mAbs. En principio, se puede pensar que no hubiese sido necesario inmunizar con todos los conjugados inmunogénicos, sino solamente con aquéllos que han generado los rAs de mayor afinidad. Sin embargo, y puesto que se trataba de un estudio en el que se pretendía abordar los aspectos más básicos relacionados con la producción de anticuerpos, se decidió también obtener mAbs a partir de todos los haptenos inmunizantes disponibles con vistas a comprobar si realmente pueden trasladarse las conclusiones derivadas de la producción de anticuerpos policlonales a la producción de monoclonales.

3.5.2. Caracterización de anticuerpos monoclonales

Inicialmente, todos los mAbs producidos hacia KM y TF se caracterizaron mediante experimentos bidimensionales competitivos empleando, en ambos formatos de ELISA, los conjugados de ensayo homólogos (**Tablas 3.5.5 y 3.5.6**).

En el formato indirecto todos los anticuerpos reconocieron a su conjugado de tapizado homólogo, a excepción de los mAbs KMc6#25, TFo6#13, TFf6#21, TFf6#22 y TFt6#39 (no incluidos en las tablas). Existen dos posibles causas por las que estos anticuerpos no dieron señal, bien porque cuando se decidió expandirlos las líneas celulares perdieron la capacidad de producir anticuerpos con la selectividad deseada, o bien que fueran susceptibles al pH ácido empleado en la elución durante la purificación de los mismos, modificándose el sitio de unión y perdiendo su actividad. Experimentos posteriores con los sobrenadantes no purificados permitieron comprobar que estos anticuerpos sí eran capaces de reconocer a su conjugado homólogo y, por lo tanto, seguramente perdieron su actividad tras el proceso de purificación. Dado que se disponía de un número suficiente de mAbs para cada fungicida con propiedades de afinidad similares, se optó por no abordar procedimientos alternativos de purificación, por lo que estos anticuerpos se excluyeron definitivamente del estudio.

Tabla 3.5.5. Caracterización de los anticuerpos monoclonales producidos hacia kresoxim-methyl empleando conjugados homólogos

mAb	Formato ELISA					
	ci-ELISA			cd-ELISA		
	[OVA] ^a	[Ab] ^b	IC ₅₀ ^c	[Ab] ^d	[HRP] ^e	IC ₅₀
KMa6#26	1.0	100	41.08	1.0	300	– ^f
KMa6#29	1.0	300	95.34	1.0	300	–
KMb6#19	1.0	100	17.42	1.0	300	–
KMb6#32	1.0	30	0.80	1.0	300	2.02
KMb6#322	0.1	10	1.52	0.3	100	0.76
KMb6#44	1.0	30	3.78	1.0	30	3.41
KMc6#35	1.0	300	27.08	1.0	300	–
KMe6#14	1.0	30	3.24	0.3	10	1.77
KMe6#18	1.0	30	5.51	0.3	10	1.90
KMe6#26	1.0	30	2.72	1.0	300	–
KMe6#211	1.0	30	3.11	1.0	300	–
KMo6#11	1.0	100	28.44	1.0	100	1.61
KMo6#111	1.0	30	3.02	0.3	30	2.08
KMo6#112	0.1	100	12.64	1.0	30	6.02
KMo6#114	0.1	100	6.18	1.0	300	–
KMo6#117	0.1	100	1.61	0.3	30	1.70

^a Concentración del conjugado de tapizado en µg/mL. ^b Concentración del anticuerpo en ng/mL. ^c Todos los valores (nM) son la media de al menos tres experimentos independientes. ^d Concentración del anticuerpo en µg/mL. ^e Concentración del trazador enzimático en ng/mL. ^f No hubo señal a las concentraciones máximas ensayadas.

Tabla 3.5.6. Caracterización de los anticuerpos monoclonales producidos hacia trifloxystrobin empleando conjugados homólogos

mAb	Formatos ELISA					
	ci-ELISA			cd-ELISA		
	[OVA] ^a	[Ab] ^b	IC ₅₀ ^c	[Ab] ^d	[HRP] ^e	IC ₅₀
TF0#17	1.0	30	5.24	1.0	300	– ^f
TFa6#11	1.0	100	20.54	1.0	300	–
TFa6#22	1.0	100	72.66	1.0	300	–
TFa6#24	1.0	30	11.69	1.0	30	45.05
TFa6#26	1.0	300	29.94	1.0	300	–
TFb6#14	1.0	100	3.19	1.0	300	–
TFb6#32	1.0	100	16.71	1.0	300	–
TFc6#146	1.0	100	8.17	1.0	300	–
TFc6#151	1.0	100	17.44	1.0	300	–
TFc6#163	1.0	30	10.21	1.0	30	7.93
TFe6#23	1.0	100	6.09	1.0	30	6.55
TFe6#25	1.0	30	4.22	1.0	30	6.49
TFe6#38	1.0	30	1.75	1.0	100	4.48
TFe6#310	1.0	300	22.60	1.0	100	21.89
TFo6#14	1.0	30	5.50	0.3	10	8.49
TFo6#110	1.0	30	11.60	1.0	30	7.33
TFo6#112	1.0	100	7.95	1.0	100	7.32
TFf6#13	0.1	100	2.88	1.0	10	8.05
TFt6#14	1.0	300	41.08	1.0	300	–
TFt6#21	1.0	300	4.36	1.0	300	–
TFt6#35	1.0	300	15.20	1.0	300	–
TFt6#211	1.0	30	5.27	1.0	10	4.26
TFt6#313	0.1	100	25.17	1.0	300	–
TFt6#316	0.1	30	3.27	0.3	10	9.66
TFt6#324	1.0	300	11.45	1.0	300	–

^a Concentración del conjugado de tapizado en µg/mL. ^b Concentración del anticuerpo en ng/mL. ^c Todos los valores (nM) son la media de al menos tres experimentos independientes. ^d Concentración del anticuerpo en µg/mL. ^e Concentración del trazador enzimático en ng/mL. ^f No hubo señal a las concentraciones máximas ensayadas

En cuanto al formato directo, se observó un comportamiento diferente en función del origen de los mAbs. En primer lugar, como era de esperar, el mAb TF0#17 no fue capaz de reconocer a su trazador homólogo (HRP–TF0). Tampoco ninguno de los mAbs producidos a partir de los haptenos tipo ‘a’ y ‘c’ funcionaron, salvo TFa6#24 y TFc6#163. Algo similar se observó con los mAbs

procedentes de TFt6, ya que solamente dos de los seis mAbs obtenidos, TFt6#211 y TFt6#316, los que mostraron mayor afinidad hacia TF en el formato indirecto, consiguieron generar ensayos directos. En contraposición, la mayoría de mAbs que provenían de los haptenos tipo 'e' y 'o', además del mAb TFf6#13, reconocieron eficazmente a sus trazadores homólogos. Finalmente hay que destacar que se observó una cierta disparidad en el comportamiento de los mAbs generados a partir de la aproximación 'b', ya que mientras todos los mAbs producidos a partir de BSA-KMb6, excepto KMb6#19, fueron capaces de reconocer a su homólogo, ninguno de los producidos para TF funcionó en este formato.

La afinidad hacia KM y TF de muchos de los mAbs producidos resultó muy superior a la de los correspondientes antisueros de conejo, generalmente en uno o dos órdenes de magnitud. Mención aparte merece que aunque en general se obtuvieron buenos anticuerpos de casi todas las fusiones realizadas, sólo algunos de ellos pueden clasificarse como excelentes. Es más, aunque razonablemente debería existir una relación entre la afinidad de los antisueros de conejo y los mAbs obtenidos a partir del mismo hapteno, en nuestra experiencia tal relación resultó ser más cualitativa que cuantitativa. En principio, y tomando como base los resultados obtenidos a partir de los antisueros de conejo, con los inmunógenos tipo 'e' y 'o' deberían de haberse obtenido los mejores mAbs. Sin embargo, mientras que esta estimación ha resultado adecuada para los mAbs de TF, ya que el mAb TFe6#38 con valores de IC_{50} de 2 y 4 nM en el formato indirecto y directo, respectivamente, ha sido el que mayor afinidad ha presentado, dicha suposición no se pudo establecer de forma clara para KM. Lo cierto es que a pesar de que los haptenos KMe6 y KMo6 generaron mAbs muy buenos, los ensayos más sensibles se obtuvieron curiosamente con el hapteno KMb6 (el que proporcionó los rAs de menor afinidad), lo que no hace sino confirmar que a través de la tecnología de generación de hibridomas existe claramente la posibilidad de obtener mAbs de elevada afinidad incluso a partir de haptenos inmunizantes menos favorables. Así pues, el mAb KMb6#32 en el ELISA indirecto y el mAb KMb6#322 en el directo, con valores de IC_{50} del orden de subnanomolar (0.80 y 0.76 nM,

respectivamente), fueron los que proporcionaron los ensayos de mayor sensibilidad.

Por otra parte, la sensibilidad lograda en ambos formatos de ensayo resultó bastante similar; en general se obtuvieron valores de IC_{50} comparables, salvo en el caso particular del mAb KMo6#11, el cual generó un ensayo con una sensibilidad un orden de magnitud inferior en el formato directo. Más concretamente, este anticuerpo proporcionó un valor de IC_{50} de 1.61 nM empleando el ensayo directo, frente al valor de 28.44 nM obtenido en el ELISA indirecto.

Una vez caracterizados todos los mAbs en el formato homólogo, se llevó a cabo la caracterización de los mismos en ambos formatos ELISA frente a todos los conjugados/trazadores de ensayo heterólogos disponibles. Este estudio tuvo como objetivo fundamental identificar las mejores combinaciones de inmunorreactivos con vistas al desarrollo de inmunoensayos para la detección de KM y TF.

3.5.2.1. Formato indirecto: Efecto de la heterología de hapteno

Los resultados de la caracterización de los mAbs en este formato se muestran en la **Tabla 3.5.7** (mAbs para KM) y en la **Tabla 3.5.8** (mAbs para TF). Se llevó a cabo un estudio bidimensional competitivo combinando seis concentraciones de anticuerpo (1, 3, 10, 30, 100 y 300 ng/mL) frente a dos concentraciones de tapizado (0.1 y 1.0 μ g/mL) de cada conjugado de ensayo. Para cada combinación se utilizó una curva patrón completa de analito a siete concentraciones (desde 1 μ M en ensayo, factor de dilución 10) más un blanco. Como en anteriores ocasiones, esta estrategia proporcionó para cada anticuerpo y conjugado una colección de curvas con diferentes valores de A_{max} e IC_{50} , lo que facilitó la selección de las mejores combinaciones para la determinación de KM y TF. Así, de la familia de curvas obtenidas para cada mAb con cada conjugado de tapizado, solamente se seleccionaron las combinaciones que proporcionaron un menor valor de IC_{50} para una señal de absorbancia máxima entre 0.8 y 1.5.

Tabla 3.5.7. Afinidad de los mAbs hacia kresoxim–methyl en el formato ci–ELISA

mAb	Valores de IC ₅₀ (nM) ^a				
	Conjugado de Tapizado OVA-hapteno				
	KMa6	KMb6	KMc6	KMe6	KMo6
KMa6#26	41.08	^b			
KMa6#29	95.34				
KMb6#19		17.42			
KMb6#32	1.15	0.80	1.35	1.90	2.38
KMb6#322	1.57	1.52	0.60	2.66	1.77
KMb6#44		3.78	2.07		2.25
KMc6#35			27.08		
KMe6#14				3.24	5.80
KMe6#18				5.51	3.91
KMe6#26				2.78	2.19
KMe6#211				3.11	2.15
KMo6#11				29.51	28.44
KMo6#111				4.34	3.02
KMo6#112				15.31	12.64
KMo6#114	3.29	6.20			6.18
KMo6#117				1.76	1.61

^a Cada valor de IC₅₀ representa el promedio de tres experimentos independientes. ^b Las celdas vacías representan aquellas combinaciones para las que a una concentración de tapizado de 1 µg/mL y a una concentración de mAb de 300 ng/mL se obtuvo una señal de absorbancia inferior a 0.8. El estilo de la fuente para los valores de IC₅₀ se refiere a la concentración de tapizado: **negrita**: 0.1 µg/mL; **normal**: 1.0 µg/mL. El estilo de fuente en cursiva corresponde a los ensayos homólogos. El código de colores hace referencia al cociente obtenido al dividir el valor de IC₅₀ del ensayo homólogo por el valor de IC₅₀ del ensayo heterólogo. Así, **rojo**: cociente < 0.5; **crema**: 0.5 ≤ cociente < 1.5; **verde**: 1.5 ≤ cociente < 3.

Tabla 3.5.8. Afinidad de los mAbs hacia trifloxystrobin en el formato ci-ELISA

mAb	Valores de IC ₅₀ (nM) ^a							
	Conjugados de Tapizado OVA-hapteno ^b							
	TF0	TFa6	TFb6	TFc6	TFe6	TFo6	TFf6	TFt6
TF0#17	5.24	^c	2.48	4.89	5.29	4.48	1.76	2.32
TFa6#11		20.54						
TFa6#22		72.66				80.59		
TFa6#24		11.69			12.2			
TFa6#26	19.69	29.94				25.1		
TFb6#14	2.34		3.19		2.97	2.06	2.30	3.41
TFb6#32			16.71	20.67			15.43	
TFc6#146				8.17				
TFc6#151				17.44				
TFc6#163	12.14			10.21	10.08	3.07		
TFe6#23	3.93				6.09	6.72		
TFe6#25	6.61				4.22	4.09		
TFe6#38	2.02				1.75	1.81		
TFe6#310	14.49				22.60	23.05		
TFo6#14	4.70	3.82			8.45	5.50		
TFo6#110	10.40	12.08			9.27	11.60		
TFo6#112	7.92					7.95		
TFf6#13			3.52	2.71	2.40		2.88	5.14
TFt6#14							39.40	41.08
TFt6#21						4.03	5.06	4.36
TFt6#35							15.05	15.20
TFt6#211	3.02	1.44	1.84		2.43		3.76	5.27
TFt6#313	60.69				12.63		25.19	25.17
TFt6#316	3.96				4.46	1.63	3.36	3.27
TFt6#324	11.92						38.47	11.45

^a Cada valor de IC₅₀ representa el promedio de tres experimentos independientes. ^b La concentración del conjugado de tapizado fue de 1.0 µg/mL en todos los casos. ^c Las celdas vacías representan aquellas combinaciones para las que a una concentración de tapizado de 1 µg/mL y a una concentración de mAb de 300 ng/mL se obtuvo una señal de absorbancia inferior a 0.8. El estilo de fuente en cursiva corresponde a los ensayos homólogos. El código de colores hace referencia al cociente obtenido al dividir el valor de IC₅₀ del ensayo homólogo por el valor de IC₅₀ del ensayo heterólogo. Así, **rojo**: cociente < 0.5; **crema**: 0.5 ≤ cociente < 1.5; **verde**: 1.5 ≤ cociente < 3; **azul**: cociente ≥ 3.

En primer lugar llama la atención que el número de conjugados de tapizado heterólogos reconocidos por parte de los mAbs tanto de KM como de TF es significativamente menor al observado con los rAs de conejo. Probablemente, los rAs, por el hecho de ser una mezcla de anticuerpos, muestran propiedades más variadas de unión al antígeno, lo que posibilita la unión a un mayor grupo de conjugados que los mAbs, los cuales, por ofrecer un único sitio de unión, muestran un perfil de reconocimiento más restrictivo.

En líneas generales cada mAb muestra un perfil de reconocimiento propio, particular, que hace difícil extraer conclusiones generales. No obstante, los mAbs producidos a partir de los haptenos KMa6, KMc6, TFa6 y TFc6, o son incapaces de reconocer a ninguno de los conjugados heterólogos, como en el caso de KM, o solamente reconocen a aquellos conjugados que presentan la funcionalización a través del grupo toxóforo, como en el caso de TF. Otro ejemplo de comportamiento muy similar lo encontramos en los mAbs tipo 'e' y 'o' ya que en la gran mayoría de casos sólo reconocen conjugados formados por haptenos funcionalizados a través del mismo anillo. Algo similar también se observó con los haptenos TFf6 y TFt6, ya que todos los mAbs de TFt6 reconocen al conjugado OVA–TFf6 y viceversa.

Sin embargo, el caso inverso lo encontramos con los mAbs derivados de KMb6 y TF0 ya que, salvo KMb6#19, el resto muestran reconocimiento hacia la mayoría de conjugados de tapizado. De hecho, KMb6#32 y KMb6#322 son los únicos mAbs que generaron ensayos indirectos de elevada afinidad con todos los heterólogos. TF0#17, por su parte, presenta un comportamiento singular ya que no es capaz de reconocer al conjugado que presenta la derivatización sobre el mismo anillo aromático (OVA–TFa6) y si muestra reconocimiento por heterólogos funcionalizados con el espaciador en posición distal de la molécula. Este tipo de comportamiento diferencial de reconocimiento hacia conjugados también lo encontramos con KMo6#114 y TFb6#14, que presentan un perfil que no parece guardar relación con el hapteno de origen.

Con los mAbs la utilización de heterología de hapteno dio lugar a modificaciones en la afinidad aparente menos llamativas que en caso de los rAs, ya que la gran mayoría de combinaciones heterólogas generaron una sensibilidad equivalente a la obtenida en la combinación homóloga (color

crema), lo que suele ser habitual en los ensayos basados en este tipo de inmunoglobulinas. Sin embargo, a pesar de que cuantitativamente el efecto es menor, utilizando conjugados heterólogos se consigue rebajar los valores de IC_{50} entre 2 y 4 veces, sobre todo con los mAbs de TF. Algunos ejemplos destacables se producen con los mAbs KMo6#114, TF0#17, TFc6#163 y TFt6#211, que pasan de valores de IC_{50} de 6.18, 5.24, 10.21 y 5.27 nM, respectivamente, en el formato homólogo, a valores de 3.29, 1.76, 3.07 y 1.44 nM con los conjugados heterólogos apropiados. En la **Figura 3.13** se ilustran las curvas de inhibición obtenidas para el mAb TFt6#211 empleando el conjugado homólogo y los heterólogos OVA-TFa6 y OVA-TFe6, poniéndose de manifiesto la importante mejora que experimenta este anticuerpo, alcanzando valores de IC_{50} cuatro veces inferiores con respecto al ensayo homólogo.

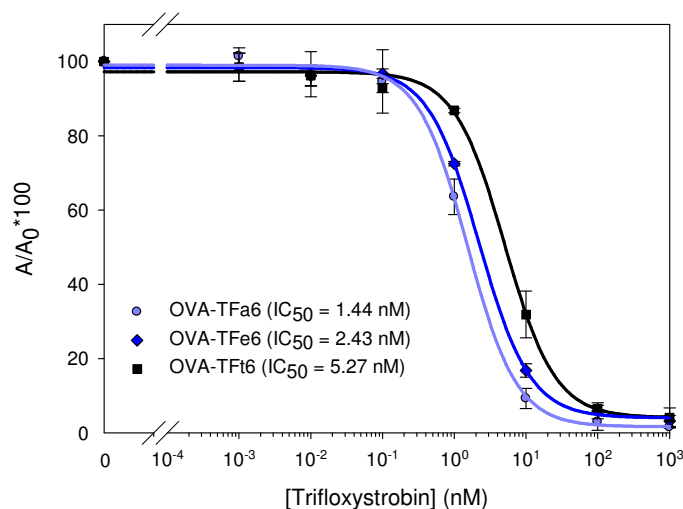


Figura 3.13. Influencia de la heterología de hapteno sobre la afinidad aparente del mAb TFt6#211 en el formato indirecto. La concentración de tapizado fue de 1.0 $\mu\text{g/mL}$. Las concentraciones de mAb empleadas en cada combinación fueron: (\bullet) 100 ng/mL, (\blacklozenge) 30 ng/mL, y (\blacksquare) 30 ng/mL. Los valores de A_{max} obtenidos para las curvas de inhibición fueron de 0.85–1.25. Los datos representados son la media de 3 experimentos independientes.

En general, a la vista de los resultados obtenidos, se puede concluir que ha sido posible obtener mAbs de elevada afinidad hacia las dos estrobilurinas objeto de estudio, con valores de IC_{50} en rango nanomolar e incluso subnanomolar.

Otro aspecto relevante a destacar, y que es de gran importancia a la hora de desarrollar un inmunoensayo cuantitativo, son los valores de las pendientes de las curvas de inhibición generadas, que en la gran mayoría de combinaciones derivadas de la caracterización preliminar de los anticuerpos monoclonales oscilaban entre -0.85 y -1.5 , valores adecuados para desarrollar ensayos con rangos de medida suficientemente amplios.

Finalmente, de todos los mAbs producidos para cada fungicida se seleccionaron sólo aquellas combinaciones que en la primera evaluación dieron lugar a los inmunoensayos más sensibles, tomando como criterio fundamental la detectabilidad, la pendiente, la reproducibilidad y otros factores como el crecimiento de la línea celular o la productividad de anticuerpos en cultivo de la misma. Dichas combinaciones se reevaluaron con el fin de asegurar la selección de los mejores ensayos para la detección de KM y TF.

En la **Tabla 3.5.9** se muestran los parámetros de las curvas y las concentraciones definitivas de inmunorreactivos para los mejores ensayos indirectos basados en los mAbs finalmente seleccionados, y en las **Figura 3.14** se han representado las curvas de inhibición que proporcionan dichos inmunoensayos.

Tabla 3.5.9. Combinaciones de inmunorreactivos seleccionadas para el formato competitivo indirecto

mAb	[mAb] ^a	Conjugado de Tapizado	[C] ^b	Parámetros ^c		
				A _{max}	pendiente	IC ₅₀ (nM)
KMb6#32	10	OVA-KMc6	1.0	0.99 ± 0.14	-1.06 ± 0.15	0.89 ± 0.11
KMb6#322	10	OVA-KMo6	0.1	1.21 ± 0.17	-0.98 ± 0.13	1.33 ± 0.26
KMb6#44	10	OVA-KMo6	1.0	0.86 ± 0.12	-1.16 ± 0.14	2.00 ± 0.31
KMo6#117	100	OVA-KMo6	0.1	1.63 ± 0.18	-1.21 ± 0.15	1.56 ± 0.40
TF0#17	30	OVA-TFf6	1.0	1.51 ± 0.24	-1.24 ± 0.15	1.84 ± 0.38
TFe6#38	30	OVA-TFo6	1.0	1.64 ± 0.17	-1.27 ± 0.14	5.87 ± 2.01
TFt6#211	30	OVA-TFb6	1.0	1.56 ± 0.12	-1.17 ± 0.14	3.70 ± 0.82
TFt6#316	30	OVA-TFt6	0.1	1.37 ± 0.14	-1.16 ± 0.28	4.33 ± 0.83

^a Concentración del anticuerpo en ng/mL. ^b Concentración del conjugado de tapizado en µg/mL. ^c Los valores son la media de diez experimentos independientes. Las asíntotas inferiores (A_{min}) estuvieron siempre por debajo de 0.05.

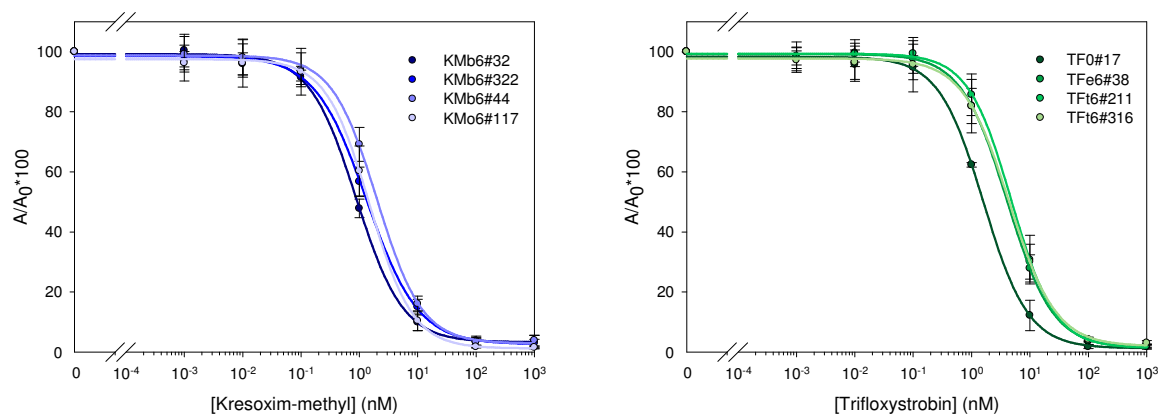


Figura 3.14. Curvas de inhibición para KM y TF de los ensayos seccionados en el formato indirecto

Finalmente, hay que destacar que en el ELISA indirecto los inmunoensayos más sensibles para cada uno de los analitos se consiguieron con las combinaciones mAb KMb6#32/OVA–KMc6 para KM, y mAb TF0#17/OVA–TFf6 para TF.

3.5.2.2. Formato directo: Efecto de la heterología de hapteno

En este formato, en cada placa de ELISA se combinaron seis concentraciones de cada trazador de peroxidasa (1, 3, 10, 30, 100 y 300 ng/mL) con dos concentraciones de anticuerpo (1 y 0.3 $\mu\text{g/mL}$). Para cada combinación se empleó nuevamente una curva patrón completa de analito de siete concentraciones (desde 1 μM en ensayo, factor de dilución 10) más un blanco.

La caracterización de todos los mAbs se muestra en la **Tabla 3.5.10** (mAbs para KM) y la **Tabla 3.5.11** (mAbs para TF). En este caso solamente se han incluido aquellos anticuerpos que reconocieron a trazadores heterólogos, así como el valor de IC_{50} del inmunoensayo que generó la señal máxima más cercana a 1 para cada combinación de inmunorreactivos.

Tabla 3.5.10. Afinidad de los mAbs hacia kresoxim–methyl en el formato cd–ELISA

Valores de IC ₅₀ (nM) ^a					
Trazador Enzimático HRP-hapteno					
mAb	KMa6	KMb6	KMc6	KMe6	KMo6
KMb6#32	^b	2.02	0.60	0.68	
KMb6#322	0.60	0.76	0.66	0.97	0.78
KMe6#14				1.77	1.72
KMe6#18				1.90	1.05
KMo6#11				2.18	1.61
KMo6#111				2.13	2.08
KMo6#112				2.22	6.02
KMo6#117				1.97	1.70

^a Cada valor de IC₅₀ representa el promedio de tres experimentos independientes. ^b No hubo señal a las concentraciones más elevadas de inmunorreactivos. El estilo de la fuente para los valores de IC₅₀ se refiere a la concentración de tapizado del anticuerpo: **negrita**: 0.3 µg/mL; **normal**: 1.0 µg/mL El estilo de fuente en cursiva corresponde a los ensayos homólogos. El código de colores hace referencia al cociente obtenido al dividir el valor de IC₅₀ del ensayo homólogo por el valor de IC₅₀ del ensayo heterólogo. Así, **crema**: 0.5 ≤ cociente < 1.5; **verde**: 1.5 ≤ cociente < 3; **azul**: cociente ≥ 3.

Tabla 3.5.11. Afinidad de los mAbs hacia trifloxystrobin en el formato cd–ELISA

Valores de IC ₅₀ (nM) ^a								
Trazador Enzimático HRP-hapteno								
mAb	TF0	TFa6	TFb6	TFc6	TFe6	TFo6	TFf6	TFt6
TF0#17	^b			1.14	1.56	1.73	1.50	1.76
TFc6#163				7.93	15.86	39.92		
TFe6#23					6.55	5.01		
TFe6#25					6.49	5.74		
TFe6#38					4.48	4.84		
TFo6#14					6.47	8.49		
TFo6#110					7.54	7.33		
TFo6#112					6.19	7.32		
TFf6#13				4.64			8.05	5.56
TFt6#211					4.14		5.29	4.26
TFt6#316					5.20		10.45	9.66

^a Cada valor de IC₅₀ representa el promedio de tres experimentos independientes. ^b No hubo señal a las concentraciones más elevadas de inmunorreactivos. El estilo de la fuente para los valores de IC₅₀ se refiere a la concentración de tapizado del anticuerpo: **negrita**: 0.3 µg/mL; **normal**: 1.0 µg/mL El estilo de fuente en cursiva corresponde a los ensayos homólogos. El código de colores hace referencia al cociente obtenido al dividir el valor de IC₅₀ del ensayo homólogo por el valor de IC₅₀ del ensayo heterólogo. Así, **rojo**: cociente < 0.5; **crema**: 0.5 ≤ cociente < 1.5; **verde**: 1.5 ≤ cociente < 3; **azul**: cociente ≥ 3.

La primera conclusión que se extrae de la caracterización es que también en este formato la inmensa mayoría de mAbs (tanto de KM como de TF) muestran una afinidad sensiblemente superior a la obtenida con los rAs y, como era de esperar, la mayoría de mAbs reconocen a un número muy limitado de trazadores enzimáticos heterólogos. De hecho, sólo 8 mAbs para KM y 11 para TF son capaces de generar ensayos empleando trazadores diferentes al homólogo. En general, la gran mayoría de mAbs solo reconocen a trazadores que incorporaban el brazo espaciador a través del mismo anillo aromático que el inmunógeno de origen.

En aquellos casos en los que se reconocen trazadores heterólogos, al igual que para el formato indirecto, solamente unas pocas combinaciones permiten mejorar ligeramente la sensibilidad obtenida frente al correspondiente ensayo homólogo. De hecho, KMb6#32 y KMo6#112 son los únicos mAbs con los que se consigue rebajar entre dos y tres veces el valor de IC_{50} .

Por otra parte, si nos fijamos detalladamente en los resultados expuestos en la **Tabla 3.5.11** para TF, observamos que el mAb TF0#17, a pesar de no admitir el ensayo homólogo, permite no solo desarrollar ensayos directos con el uso de otros trazadores, sino que también es el mAb que mayor afinidad muestra hacia TF. En particular, la combinación de inmunorreactivos TF0#17 vs HRP-TFc6 genera un ensayo con un valor de IC_{50} de 1.14 nM.

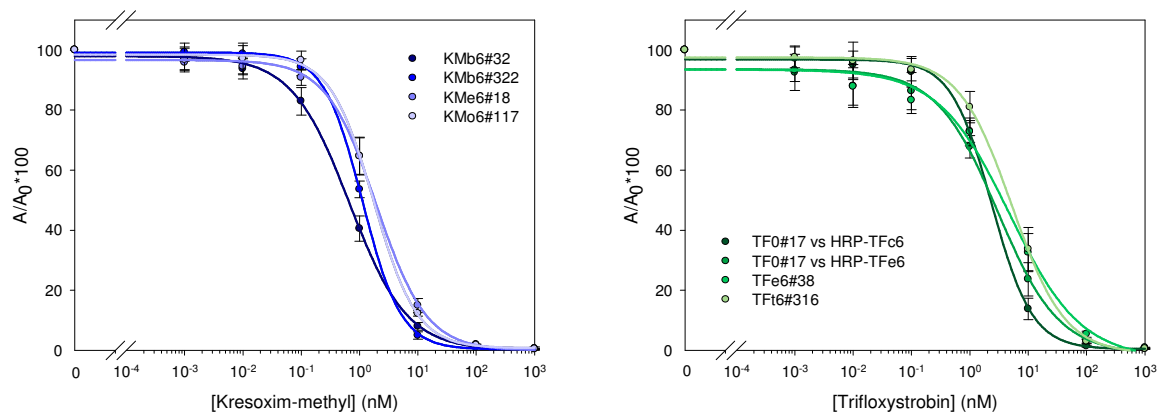
De nuevo, la selección de los ensayos se realizó en base a la sensibilidad, la pendiente de la curva de inhibición y la reproducibilidad de los mismos. En este formato también la gran mayoría de combinaciones presentaron pendientes adecuadas (entre -0.85 y -1.40). Las combinaciones más prometedoras fueron reevaluadas para asegurar que la selección de ensayos había sido la correcta. Los parámetros de ensayo y las curvas de inhibición correspondientes a los ensayos seleccionados se muestran en la **Tabla 3.5.12** y en la **Figura 3.15**.

Tabla 3.5.12. Combinaciones de inmunorreactivos seleccionadas para el formato competitivo directo

mAb	[mAb] ^a	Trazador Enzimático	[C] ^b	Parámetros ^c		
				A _{max}	pendiente	IC ₅₀ (nM)
KMb6#32	1.0	HRP-KMe6	30	1.45 ± 0.24	-0.89 ± 0.09	0.68 ± 0.14
KMb6#322	0.3	HRP-KMa6	10	1.03 ± 0.08	-1.40 ± 0.15	1.17 ± 0.42
KMe6#18	0.3	HRP-KMe6	10	1.65 ± 0.22	-1.02 ± 0.13	1.96 ± 0.36
KMo6#117	0.3	HRP-KMo6	30	2.06 ± 0.19	-1.15 ± 0.15	1.40 ± 0.20

TF0#17	0.3	HRP-TFc6	30	0.92 ± 0.14	-1.19 ± 0.15	2.08 ± 0.49
	0.3	HRP-TFe6	30	1.78 ± 0.33	-0.91 ± 0.17	2.89 ± 0.51
TFe6#38	1.0	HRP-TFe6	100	1.17 ± 0.18	-0.82 ± 0.14	4.95 ± 0.99
TFt6#316	0.3	HRP-TFe6	100	1.70 ± 0.35	-1.04 ± 0.16	5.57 ± 0.82

^a Concentración del anticuerpo en µg/mL. ^b Concentración del trazador enzimático en ng/mL. ^c Los valores son la media de diez experimentos independientes. Las asíntotas inferiores (A_{min}) estuvieron siempre por debajo de 0.05.

**Figura 3.15.** Curvas de inhibición para KM y TF de los ensayos seleccionados en el formato directo.

En este caso también se han podido desarrollar ensayos directos de excelente sensibilidad a partir de mAbs producidos hacia KM y TF. Como se observa en la **Tabla 3.5.12**, las mejores combinaciones están constituidas por los mismos anticuerpos seleccionados en el formato de conjugado inmobilizado. De nuevo, los ensayos proporcionados por los mAbs KMb6#32 y TF0#17 resultan ser los más sensibles y, en principio, serían los más apropiados para conseguir el objetivo último de este trabajo.

3.5.2.3. Conclusiones de la caracterización de los mAbs en ambos formatos de ELISA

A la vista de los resultados de caracterización de los mAbs en los dos formatos de ELISA, podemos concluir que con todos los inmunógenos preparados se ha conseguido obtener anticuerpos monoclonales mediante la tecnología de generación de hibridomas, habiéndose desarrollado además ensayos de elevada sensibilidad.

La afinidad mostrada hacia KM y TF de los mAbs producidos ha puesto de manifiesto dos aspectos importantes. En primer lugar, la alta afinidad mostrada por la mayoría de mAbs producidos hacia su analito supone una mejora importante respecto a la de los antisueros de conejo, especialmente para aquellos haptenos que generaron respuestas de menor afinidad. Esto es debido principalmente al proceso de obtención de cada uno de los inmunorreactivos: mientras la tecnología de generación de hibridomas permite seleccionar específicamente aquellos clones productores de anticuerpos de mayor afinidad hacia el analito de entre los otros muchos que producen anticuerpos peores, un rAs constituye la respuesta inmune completa del animal, formada por una mezcla compleja de anticuerpos con una afinidad promedio hacia el analito. En consecuencia, generalmente es más probable obtener anticuerpos con mejores propiedades de reconocimiento del analito con mAbs que con pAbs. En segundo lugar, como ya se había observado en la caracterización de los rAs, no todas las posiciones de funcionalización resultan equivalentes. Así pues, los valores de IC_{50} más elevados fueron proporcionados por mAbs de los tipos 'a' y 'c', lo que confirmó que en principio la funcionalización a través de la posición *orto* del anillo fenílico **b** en el caso de KM (hapteno KMc6), del grupo etilenoaminóxido en el caso de TF (hapteno TFc6), y a través de la posición *para* al grupo toxóforo del anillo fenílico **a** para ambos fungicidas (haptenos KMa6 y TFa6), resultan las estrategias menos adecuadas. Sin embargo, en general, los haptenos funcionalizados a través del anillo aromático **b** en posición *meta* o *para* (haptenos KMb6, TFb6, TFf6 y TFt6) y por el grupo toxóforo de ambos fungicidas (haptenos KMo6, KMe6, TF0, TFo6 y TFe6) permiten obtener mAbs capaces de dar lugar a ensayos con una excelente sensibilidad.

Por otra parte, el comportamiento de los mAbs en ambos formatos resultó ser bastante análogo. Aun así, y al igual que se había observado anteriormente con los rAs, el formato directo resultó más apropiado sobre todo para los mAbs de KM, obteniéndose en la mayoría de casos ensayos con valores de IC_{50} inferiores a 2 nM.

Finalmente, a pesar de que en ambos formatos de ensayo la heterología no dio lugar a grandes mejoras en la sensibilidad, varios de los ensayos finalmente destacados están basados en el uso de conjugados competidores heterólogos, demostrándose de nuevo la eficacia de este tipo de estrategia en el desarrollo de inmunoensayos para haptenos.

3.6. Evaluación de la especificidad de los anticuerpos monoclonales

Una vez comprobado que los anticuerpos obtenidos eran capaces de reconocer a KM y TF, se procedió a evaluar su especificidad. Como ya se ha mencionado, la especificidad es un aspecto clave a la hora de seleccionar el anticuerpo con el que desarrollar el ensayo finalmente propuesto.

El estudio de la selectividad de los anticuerpos se realizó mediante experimentos de reactividad cruzada (RC), donde un conjunto de compuestos químicos seleccionados bien por su similitud estructural con el compuesto diana o bien por su potencial presencia en muestras de campo, fueron evaluados como competidores. Así pues, este estudio tuvo un doble objetivo; por una parte, intentar determinar qué partes de la molécula son más importantes en la interacción con cada anticuerpo, de forma que se pueda determinar los principales determinantes antigénicos o epítomos de los mismos. Así mismo, se prestó una especial atención a la relación entre el patrón de reconocimiento y la posición en la que se introdujo el brazo espaciador en el hapteno inmunizante, evaluando conceptos como el principio de Landsteiner. Por otra parte, comprobar si los anticuerpos son capaces de reconocer a los analitos de estudio sin interferencias motivadas por la presencia de otros compuestos relacionados que podrían estar presentes en las muestras, tales como otros plaguicidas, metabolitos o productos de degradación.

La RC de un anticuerpo para un determinado compuesto se define como el cociente entre la IC_{50} del analito y la IC_{50} del compuesto en cuestión, y suele

expresarse en tanto por cien ($RC = [IC_{50}(\text{analito})/IC_{50}(\text{análogo})]*100$). Cuanto mayor es la afinidad del anticuerpo hacia un análogo menor es su valor de IC_{50} y por tanto mayor el valor de RC.

Los experimentos de especificidad se llevaron a cabo para cada combinación de inmunorreactivos utilizando las concentraciones previamente identificadas como óptimas. De manera independiente, para cada analito se incluyó en una placa ELISA y en las mismas condiciones la curva patrón completa del compuesto a evaluar y la correspondiente curva de KM o TF, con el fin de efectuar los distintos ensayos en condiciones totalmente comparables que permitiesen calcular correctamente el cociente de valores de IC_{50} . Todos los anticuerpos se ensayaron frente los análogos en el formato homólogo indirecto.

3.6.1. Especificidad frente a análogos: análisis de agrupación mediante métodos jerárquicos aglomerativos

Uno de los objetivos de este trabajo ha sido evaluar la influencia de la posición del brazo espaciador en los haptenos sobre las propiedades de los anticuerpos generados a partir de ellos, fundamentalmente afinidad y especificidad. En cuanto a la afinidad, ya ha quedado demostrado que no todos los haptenos han resultado ser igualmente válidos para obtener anticuerpos de elevada afinidad, siendo las aproximaciones tipo 'b', 'e' y 'o' para los dos analitos de estudio las que mejores resultados proporcionaron (**Figuras 3.2 y 3.3**). Por lo tanto, no sería sorprendente que los anticuerpos también presentasen características de reconocimiento muy diversas en función de la posición del brazo espaciador en el hapteno. De hecho, según el principio de Landsteiner, los anticuerpos deberían interactuar en mayor medida con la zona de la molécula más alejada del brazo espaciador que ancla el hapteno a la proteína, o dicho de otra manera, deberían ser más específicos para esa parte del analito. Para realizar un estudio completo de reconocimiento que permita evaluar la especificidad de los anticuerpos, se preparó una batería de 16 análogos de KM con modificaciones en cada uno de los dos anillos que conforman la estructura del fungicida, y de 13 análogos de TF con modificaciones, además de en los dos anillos aromáticos, en el grupo

etilenaminoxilo que actúa como puente entre los anillos de la estructura de TF. En cada caso se introdujo exclusivamente un único tipo de modificación, manteniendo el resto de la estructura intacta, con el objetivo de asociar las variaciones en el reconocimiento únicamente a la posición alterada.

Puesto que la mayor parte de los análogos diseñados no estaban disponibles comercialmente, fue necesario sintetizarlos *ex profeso* para poder llevar a cabo los correspondientes experimentos de reactividad cruzada. Una vez disponible esta batería de análogos de ambos fungicidas, se procedió al análisis de los perfiles de unión de las inmunoglobulinas hacia estos competidores al objeto de esbozar un mapa de reconocimiento.

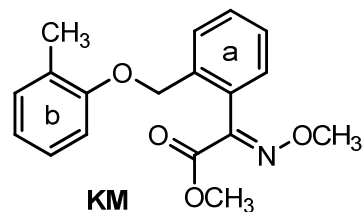
Cuando se dispone de un número relativamente elevado de combinaciones entre anticuerpos y análogos, como es el caso, resulta complicado establecer conclusiones a través del análisis directo y subjetivo de los valores de RC obtenidos en los experimentos competitivos. Para facilitar el estudio de especificidad de los anticuerpos aquí presentados, se decidió emplear una herramienta computacional previamente utilizada en nuestro grupo y que está basada en la implementación de metodologías de agrupación jerárquica que permita la clasificación de los anticuerpos en función de sus perfiles de unión a los competidores ensayados (Suárez–Pantaleón *et al.*, 2011).

La aplicación en los últimos años de este tipo de herramientas informáticas al estudio de las interacciones antígeno–anticuerpo ha abierto la puerta a prometedoras aplicaciones en biomedicina en los campos de diagnóstico, pronóstico y/o terapéutico, siendo algunos ejemplos la identificación de potenciales biomarcadores de distintos tipos de cáncer o desordenes autoinmunes (Ellmark *et al.*, 2008; Han *et al.*, 2009; Zhou *et al.*, 2010), o el desarrollo de vacunas frente a microorganismos infecciosos (Gray *et al.*, 2007; Pitarch *et al.*, 2009).

3.6.1.1. Especificidad de los anticuerpos anti-kresoxim-methyl frente a análogos estructurales

En primer lugar se evaluaron los análogos de KM (**Tabla 3.6.1**). Estos compuestos fueron divididos en dos grupos, dependiendo del tipo de modificación química considerada. Así, el **grupo I** englobó aquellos análogos con modificaciones en el anillo con la agrupación (*E*)-metoxi-(1-metoxiimino)-2-oxoetilo (anillo **a**) y en el **grupo II** se incluyeron compuestos con modificaciones en el anillo de tolilo (anillo **b**).

Los resultados del estudio de reactividad cruzada hacia KM fueron sometidos a análisis de **agrupación jerárquica (HCL)**. El **mapa de calor** mostrando los perfiles de unión de los anticuerpos a los análogos estructurales se muestra en la **Figura 3.16**. Dicha figura muestra también el correspondiente **dendograma** representando la clasificación de los anticuerpos en base a sus perfiles de especificidad, el cual fue obtenido mediante la aplicación del algoritmo aglomerativo **HCL** (Eisen *et al.*, 1998) empleando el programa **MeV v4.7.4** (Mar *et al.*, 2011). La explicación detallada de la metodología seguida para su obtención se recoge en el **apartado 5.7.3.2** de la parte experimental.

**Tabla 3.6.1.** Estructura química de los análogos de kresoxim-methyl empleados en los estudios de reactividad cruzada

Grupo I			Grupo II				
Estructura Química	R	Análogo	Estructura Química	R ¹	R ²	R ³	Análogo
	Br	KMa-Br		Br	H	H	KMb-Br
	CO ₂ H	KMa-Ac		I	H	H	KMb-I
	COCH ₃	KMa-MeCO		NO ₂	H	H	KMb-NO ₂
	COCO ₂ H	KMa-COAc		CH ₂ CH ₃	H	H	KMb-Et
	COCO ₂ CH ₃	KMa-COEs		CH ₃	H	I	KMb-mI
	CON(OCH ₃)CH ₃	KMa-COAm		CH ₃	H	CH ₃	KMb-mMe
	H ₃ C-CH=N-OCH ₃	KMa-OxMe		H	CF ₃	H	KMb-mCF ₃
	HO ₂ C-CH=N-OCH ₃	KM-Ac*					
	H ₃ COOC-CH=N-OCH ₃	KM-Z*					

* Los análogos KM-Ac y KM-Z son los principales metabolitos y productos de degradación de kresoxim-methyl en suelos y plantas.

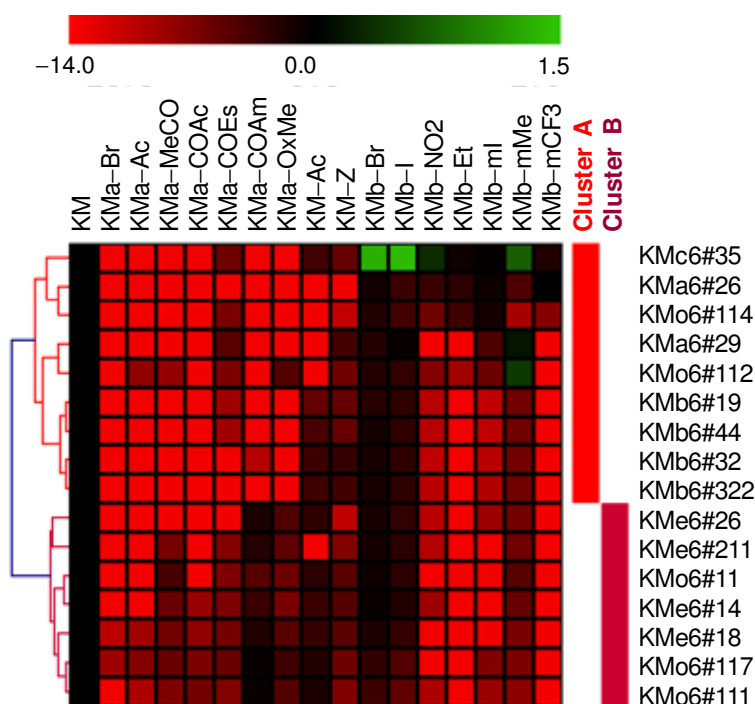


Figura 3.16. Análisis de la especificidad de los anticuerpos mediante clasificación jerárquica, basado en el estudio de RC evaluando como competidores una batería de compuestos análogos a KM. Visualización del *mapa de calor* de la matriz de datos de RC y dendrograma generado empleando la métrica de similitud Tau de Kendall y el algoritmo aglomerativo de encadenamiento completo. El valor de la transformación logarítmica en base 2 del valor de RC normalizado a la unidad se ha representado en una escala de -14.0 (mínimo reconocimiento) a 1.5 (máximo reconocimiento).

La matriz de datos empleada para construir el mapa de perfiles se generó a partir de los valores de RC, después de su normalización y transformación logarítmica. De esta manera, se asignó como valor central el 0 (negro), correspondiente a un valor de RC del 100%, mostrándose en verde aquellos análogos que generaron un valor de RC superior al 100 % y en rojo los que proporcionaron un valor inferior al 100%. La magnitud del incremento o descenso del reconocimiento hacia un análogo concreto está asociado a la intensidad del color. Las distancias entre los *cluster* (grupos de anticuerpos) del árbol está correlacionada con la similitud de sus perfiles de RC, de forma que los objetos más cercanos son matemáticamente más similares, y por lo tanto presentan propiedades de especificidad más semejantes entre sí.

Como ilustra el árbol de clasificación jerárquica, se generaron dos grupos bien diferenciados de anticuerpos a partir de los cinco inmunógenos derivados de KM. El primer *cluster*, llamado **A** (rojo), está compuesto por los anticuerpos

obtenidos a partir de los haptenos inmunizantes tipo ‘a’, ‘b’ y ‘c’, si bien dentro de este grupo también se encuentran los mAbs KMo6#114 y KMo6#112. El segundo *cluster*, designado como **B** (granate), contiene la mayoría de anticuerpos obtenidos a partir de las aproximaciones que incorporaban el brazo espaciador por el grupo toxóforo, tanto por el éster metílico (‘e’) como por la agrupación oxiimínica (‘o’), salvo las excepciones comentadas.

Analizando el *mapa de calor y los valores de RC* se observa que, en general, la especificidad de los anticuerpos es muy elevada, de tal forma que cualquier modificación en la estructura de KM afecta drásticamente al reconocimiento, si bien los anticuerpos del *cluster A* resultan “más permisivos” a cambios en la estructura de KM en el anillo **b** mientras que los del *cluster B* muestran mayor grado de reconocimiento hacia los análogos con modificaciones en el anillo **a** (**Figura 3.17**). Por lo tanto, la primera conclusión que podemos extraer del análisis de los datos de RC es que el comportamiento mostrado por la colección de mAbs se ajusta básicamente al principio de Landsteiner, ya que en general las modificaciones distales al sitio de unión con la proteína afectan en mayor medida a la interacción Ag–Ab que las modificaciones proximales. No obstante, existen algunas excepciones que se comentan más adelante.

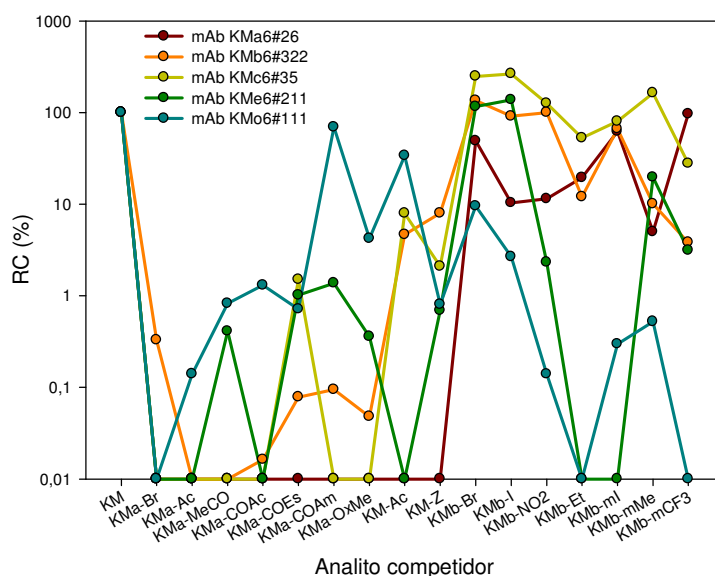


Figura 3.17. Perfil de reconocimiento de anticuerpos monoclonales hacia análogos de KM. Para destacar el comportamiento característico de cada grupo de anticuerpos se ha seleccionado como representativo un mAb de cada uno de ellos.

Analizados los resultados de los valores de RC con más detalle, se observa que, para los anticuerpos que constituyen el *cluster A*, los análogos con distintas modificaciones del grupo toxóforo (**grupo I**) prácticamente no son reconocidos, con valores de RC en el mejor de los casos inferiores al 0.1%. Este hecho sugiere que la agrupación (*E*)-metoxi-(1-metoxiimino)-2-oxoetilo desempeña un importante papel en la interacción con KM de los anticuerpos de la rama **A**, lo que podría estar asociado a la capacidad de este agrupación de establecer interacciones de tipo electrostático o formación de enlaces por puente de hidrógeno con el sitio de unión del anticuerpo. En contraposición, se observa una mayor permisividad a modificaciones del grupo toxóforo para los anticuerpos que constituyen el *cluster B*, pero aun así los valores de RC obtenidos resultan ser inferiores al 10%. Esto indica que, aunque en menor medida, la zona proximal también es importante en la interacción con este grupo de anticuerpos.

Por otra parte, la mayoría de anticuerpos interaccionaron con dificultad con aquellos compuestos que presentaban modificaciones en el anillo de toloilo (**grupo II**). Así, análogos en los que se sustituyó el grupo metilo del anillo **b** por grupos electroatrayentes (KMb-NO₂) o más voluminosos (KMb-Et) prácticamente no son reconocidos. Igualmente, la incorporación en *meta* al sustituyente metilo de grupos o átomos con propiedades químicas distintas (I, CH₃ y CF₃) conduce a los mismos resultados. Sin embargo, la sustitución del grupo metilo por un átomo de halógeno, como en KMb-Br y KMb-I, dio lugar a los resultados más interesantes, ya que para ambos compuestos se obtuvieron valores de RC en torno al 100%. A modo de ejemplo, el mAb KMc6#35 muestra sorprendentemente una reactividad cruzada del 200% hacia estos análogos, mientras que el resto de mAbs los reconocen con una afinidad equivalente a la mostrada hacia KM (**Figura 3.17**).

En cuanto a los principales metabolitos de kresoxim-methyl, KM-Ac, que carece del grupo metilo del éster, y KM-Z, que conserva la estructura completa con tan sólo una diferencia de isomería del doble enlace, la mayoría de anticuerpos muestran valores muy bajos de RC (<1%). El único mAb con cierta capacidad de reconocimiento de estos análogos de KM es KMo6#111(RC vs KM-Ac del 30%).

A través del análisis en detalle del *mapa de calor* se pueden extraer algunas conclusiones adicionales respecto a ciertos epítomos relevantes de la molécula. En primer lugar, KMb–Br y KMb–I son reconocidos por todos los anticuerpos independientemente de su origen. Es probable que, dada la similitud de los radios de van der Waals de estos sustituyentes (radio de van der Waals del metilo, bromo y yodo: 2.00, 1.95 y 2.15 Å, respectivamente), y la relativamente elevada polarizabilidad de los átomos de halógeno, puedan establecerse en estos casos importantes fuerzas hidrofóbicas que contribuyan a la estabilización de la interacción de estos compuestos con el hueco (paratopo) o sitio de unión de los anticuerpos. De hecho, este fenómeno, además de haber sido observado en nuestro grupo para análogos halogenados de otros fungicidas, ha sido descrito anteriormente por otros autores para otras familias de plaguicidas (Galve *et al.*, 2002 a y b; Ramón–Azcón *et al.*, 2009).

En base a los resultados comentados, se podría sugerir que la interacción entre los mAbs y KM estaría dirigida inicialmente por fuerzas hidrofóbicas. El complejo anticuerpo–analito podría ser estabilizado posteriormente mediante la formación de enlaces por puente de hidrógeno que bien podrían establecerse a través del nitrógeno oximínico o el oxígeno del grupo carbonilo de la agrupación (*E*)–metoxi–(1–metoxiimino)–2–oxoetilo con los residuos aminoacídicos del sitio de unión de los anticuerpos.

Mención especial merecen los anticuerpos producidos a partir del conjugado BSA–KMa6, ya que muestran un comportamiento curiosamente más parecido a los que incorporan la cadena en el anillo opuesto, *p.ej.* KMb6. Este resultado parece indicar que la exposición al sistema inmune de los conjugados inmunogénicos del hapteno KMa6 se produce a través de una conformación en la que el brazo espaciador situado sobre el anillo **a** se orienta espacialmente hacia el anillo de tolilo, resultando en una exposición de la parte proximal mayor de lo que sería esperable en función de la posición de derivatización (**Figura 3.18**). Esta circunstancia, aun siendo poco común, se ha observado en otros casos de moléculas con gran flexibilidad conformacional (Parra, 2011).

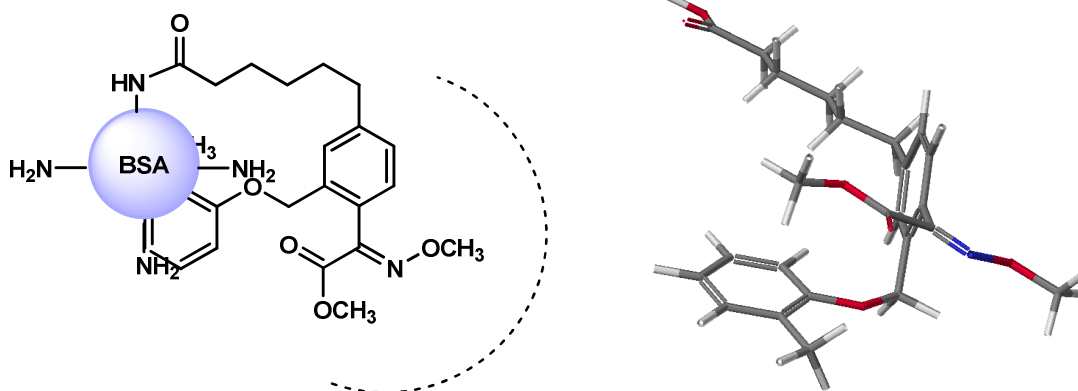


Figura 3.18. *Izquierda:* Propuesta de la exposición al sistema inmune del inmunógeno BSA–KMa6. La línea discontinua representa la zona de la molécula más expuesta. *Derecha:* Una de las potenciales conformaciones del hapteno KMa6 frente a la que podría dirigirse la respuesta inmune en el inmunógeno BSA–KMa6. Conformación obtenida a partir de la incorporación del brazo espaciador en la posición adecuada de la conformación más estable de KM y optimización de la geometría utilizando Mecánica Molecular (CACHe MM3 program).

3.6.1.2. Especificidad de los anticuerpos anti–trifloxystrobin frente a análogos estructurales

En segundo lugar, se evaluaron los análogos de TF. En este caso, los distintos compuestos fueron divididos en tres grupos; el **grupo I** englobó los compuestos con modificaciones en el anillo **a**; el **grupo II** incluyó aquellos analitos con modificaciones en el anillo trifluorometilado y, por último, los análogos con cambios en el grupo etilenaminoxilo puente integraron el **grupo III**.

Los resultados del estudio de reactividad cruzada hacia TF fueron sometidos al mismo tipo de análisis que los de KM (**HCL**). El **dendograma** completo representando la clasificación de los anticuerpos en base a sus perfiles de reconocimiento se muestra en la **Figura 3.19**, y las estructuras de los correspondientes análogos sintetizados para dicho estudio se presentan en la **Tabla 3.6.2**.

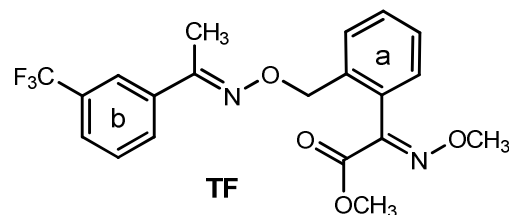


Tabla 3.6.2. Estructura química de los análogos de trifloxystrobin empleados en los estudios de reactividad cruzada

Grupo I				Grupo II			
Estructura Química	R ¹	R ²	Análogo	Estructura Química	R ¹	R ²	Análogo
	Br	H	TFa-Br		H	H	TFb-H
	H ₃ CO ₂ C	I	TFa-pI		NO ₂	H	TFb-NO ₂
	HO ₂ C	H	TF-Ac*		NH ₂	H	TFb-NH ₂
Grupo III					Br	H	TFb-Br
Estructura Química	R	Análogo			CH ₃	H	TFb-Me
	H	TFc-H			CF ₃	CF ₃	TFb-mCF ₃
	CH ₂ CH ₃	TFc-Et					
			KMb-mCF ₃ **				

* Principal metabolito de trifloxystrobin en suelos y plantas. ** La estructura del correspondiente análogo se encuentra en la **Tabla 3.6.1.**

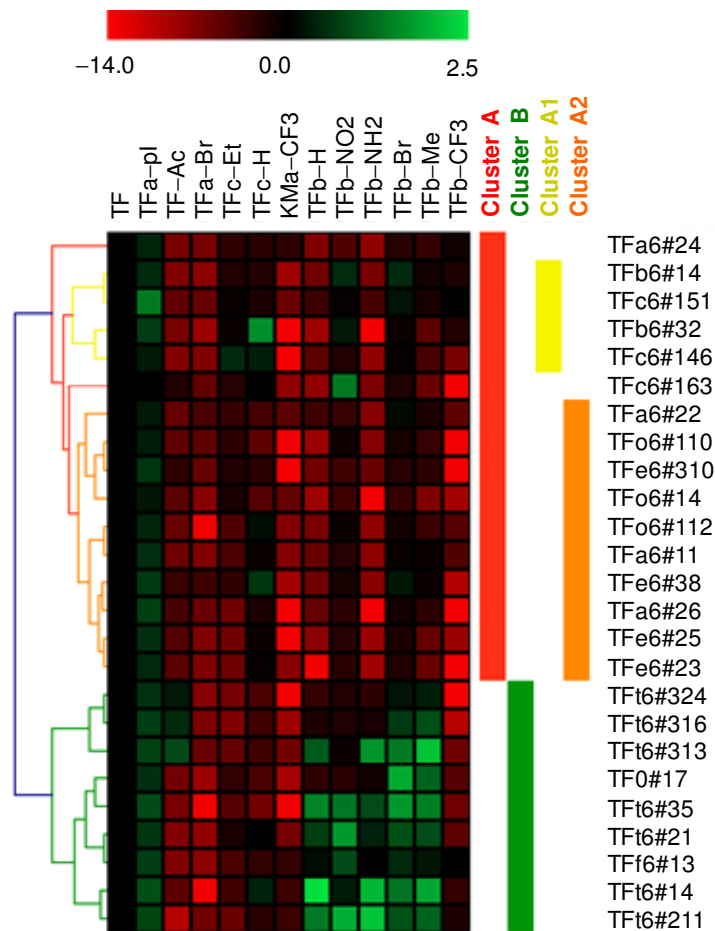


Figura 3.19. Análisis de la especificidad de los anticuerpos mediante clasificación jerárquica, basado en el estudio de RC evaluando como competidores una batería de compuestos análogos a TF. Visualización del *mapa de calor* de la matriz de datos de RC y dendograma generado empleando la métrica de similitud Tau de Kendall y el algoritmo aglomerativo de encadenamiento completo. El valor de la transformación logarítmica en base 2 del valor de RC normalizado a la unidad se ha representado en una escala de -14.0 (mínimo reconocimiento) a 2.5 (máximo reconocimiento).

Del mismo modo que para los mAbs de KM, el **dendograma** generó dos *clusters* diferentes a partir de la inmunización con los ocho haptenos derivados de TF. El primero de ellos, llamado **A** (rojo) está compuesto por los anticuerpos obtenidos a partir de los conjugados de cinco haptenos regioisoméricos, TFa6, TFb6, TFc6, TFe6 y TFO6, mientras que el *cluster B* (verde) incluye los anticuerpos obtenidos a partir de haptenos con el brazo espaciador en sustitución del grupo trifluorometilo (TFt6 y TFf6) más el mAb TF0#17. Además, en este caso la rama **A** se subdivide a su vez en dos *clusters*, llamados **A1** y **A2**. La principal diferencia entre los anticuerpos de los *clusters A1* (amarillo) y **A2** (naranja) se asocia al hapteno inmunizante de origen; así, los anticuerpos obtenidos a partir de los inmunógenos ‘b’ y ‘c’ quedan incluidos dentro de la

rama **A1** y los procedentes de los haptenos TFA6, TFe6 y TFO6 en la rama **A2**. Con respecto a los anticuerpos TFA6#24 y TFC6#163, tal y como se observa en la **Figura 3.19**, no forman parte de ningún subgrupo por presentar, según el algoritmo utilizado, propiedades de reconocimiento singulares.

El **mapa de calor** obtenido resulta más complejo que en el caso de KM, siendo las distintas respuestas obtenidas más heterogéneas. En general, todos los mAbs resultan ser bastante específicos hacia TF, sobre todo los incluidos en el **cluster A**, ya que pequeñas modificaciones en diferentes posiciones de la molécula conducen a disminuciones importantes en el reconocimiento (**Figura 3.20**). Como era de esperar, la primera conclusión derivada de este análisis es que la mayoría de mAbs muestran un comportamiento en concordancia con el principio de Landsteiner, aunque también en este caso se producen excepciones.

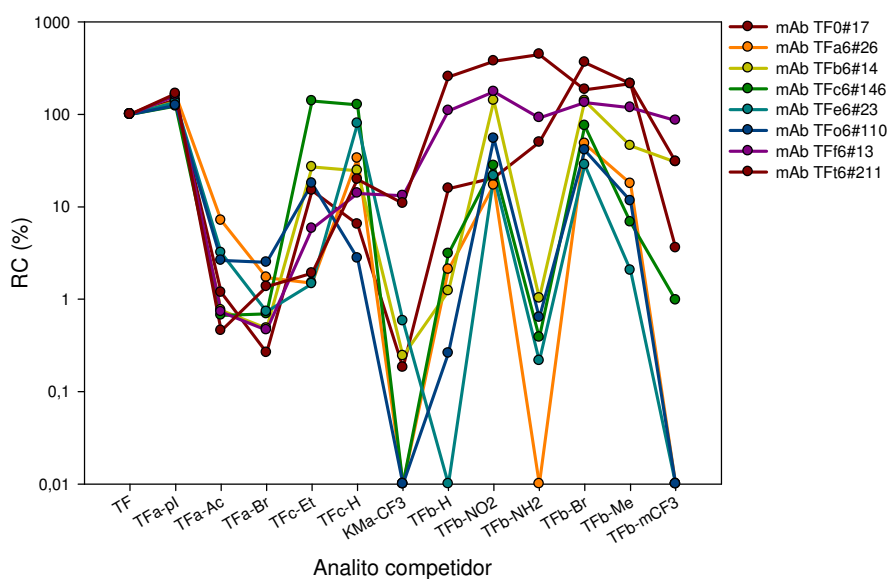


Figura 3.20. Perfil de reconocimiento de anticuerpos monoclonales hacia análogos de TF. Para destacar el comportamiento característico de cada grupo de anticuerpos se ha seleccionado como representativo un mAb de cada uno de ellos.

Analizando en detalle los resultados obtenidos se observa que los anticuerpos muestran patrones de reconocimiento muy diferentes hacia los tres análogos del **grupo I**. Así, el compuesto TFA-Br, en el que el grupo toxóforo ha sido reemplazado por un átomo de Br, muestra valores de RC por debajo del 2% con todos los mAbs. Este hecho, al igual que sucede con los anticuerpos

de KM, vuelve a remarcar la importancia que la contribución de la agrupación (*E*)-metoxi-(1-metoxiimino)-2-oxoetilo tiene en la interacción con los mAbs. Por su parte, TF-Ac (el ácido resultante de la hidrólisis de la agrupación éster metílico y principal metabolito de TF) tampoco es reconocido por ninguno de los mAbs, excepto por un subgrupo del *cluster B* constituido por los mAbs TFt6#324, TFt6#316 y TFt6#313, que muestran una respuesta en cierta medida peculiar y diferente al comportamiento más común del resto de anticuerpos. Por el contrario, todos los mAbs son capaces de reconocer a TFa-pl, con valores muy elevados de RC (>100%). Este tipo de comportamiento también se observa con el competidor TFb-Br, lo que de nuevo denota que el sitio activo de los anticuerpos es capaz de encajar, sin pérdida importante de afinidad, derivados con posiciones halogenadas, si bien es cierto que los mAbs contenidos en el *cluster B* muestran mayores valores de RC frente a este análogo.

La principal diferencia entre los mAbs de los *clusters A* y *B* se encuentra con los análogos del **grupo II**. Mientras que la mayoría de anticuerpos del *cluster B* muestran una elevada tolerancia a la sustitución del grupo trifluorometilo en el anillo **b**, reconociendo a estos compuestos con valores de RC superiores al 100%, los mAbs del *cluster A* son claramente más sensibles a estas modificaciones en la estructura de TF, lo que en principio parece sugerir que la rigidez que aporta el triple enlace al brazo espaciador en el inmunógeno BSA-TFt6 promueve una mayor exposición de la parte opuesta a la posición de derivatización, centrándose el reconocimiento en esta parte de la molécula, incluido el metilaminóxilo puente (**Figura 3.21**), ya que salvo algunas excepciones, los análogos del anillo distal y posición central prácticamente no son reconocidos. Por otra parte, el menor reconocimiento de los mAbs de rama **A** hacia los análogos TFb-H y TFb-NH₂, con respecto al mostrado por los compuestos TFb-NO₂ y TFb-Br, incide en la importancia que deben de tener las interacciones hidrofóbicas y, muy probablemente, Ph-Ph π -stacking, en la unión del anticuerpo con el analito, interacciones que se verían afectadas por el cambio de distribución electrónica que se produce sobre el anillo de benceno con la sustitución del grupo electroatrayente CF₃ por un átomo de hidrógeno o un grupo electrodador como el NH₂.

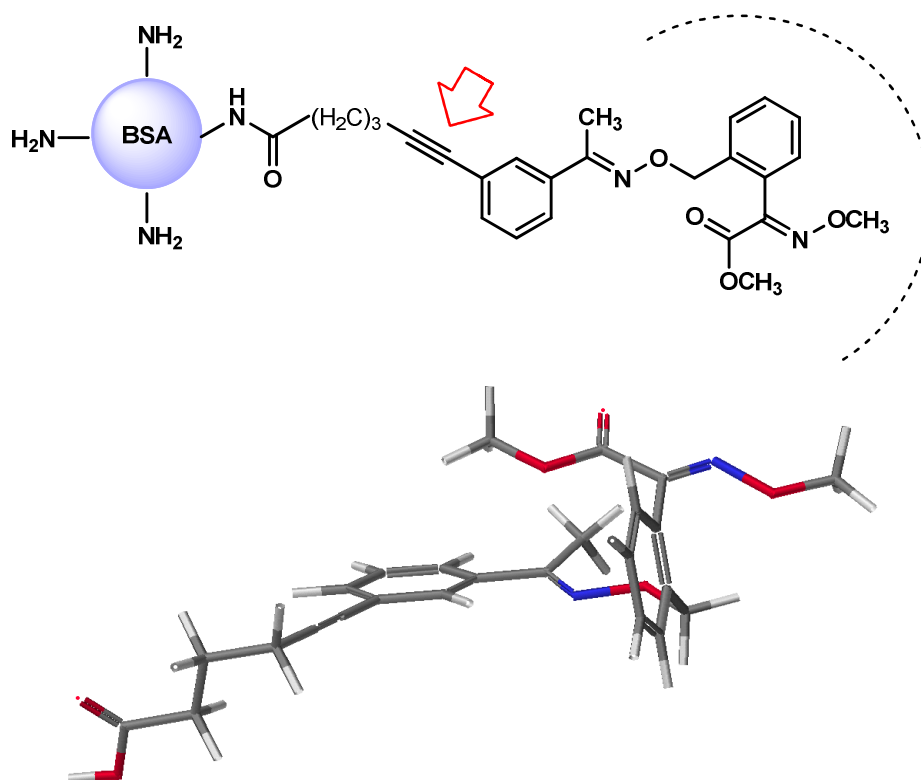


Figura 3.21. *Superior:* Propuesta de la exposición al sistema inmune del inmunógeno BSA-TFt6. La línea discontinua representa la zona de la molécula más expuesta. La flecha indica la posición del triple enlace. *Inferior:* Una de las potenciales conformaciones del hapteno TFt6 frente a la que podría dirigirse la respuesta inmune en el inmunógeno BSA-TFt6. Conformación obtenida a partir de la incorporación del brazo espaciador en la posición adecuada de la conformación más estable de TF y optimización de la geometría utilizando Mecánica Molecular (CACHé MM3 program).

En cuanto a los análogos del **grupo III**, el cambio de un grupo metilo por etilo (TFc-Et) o hidrógeno (TFc-H) produce una disminución de reconocimiento importante en todos los anticuerpos. Además, la presencia del grupo etilenaminoxilo puente entre los dos anillos que conforman la estructura de TF resulta también importante para la interacción con los anticuerpos, ya que la mayoría de los mAbs no muestra reconocimiento hacia el análogo KMa-CF₃ (**Tabla 3.6.1**) que no presenta dicho puente.

Por otra parte, los anticuerpos derivados del hapteno TFc6, con el brazo espaciador en una posición central de la molécula, presentan un comportamiento intermedio, ya que reconocen con dificultad análogos con modificaciones en los anillos mientras que son más permisivos al reconocimiento de análogos derivatizados por la misma posición en la que se encuentra el brazo espaciador. Este comportamiento intermedio es compatible

con la funcionalización central de la molécula, que hace que los epítomos **a** y **b** no se encuentren ni tan lejos ni tan cerca del sitio de acoplamiento con la proteína como en aquellos inmunógenos en los que derivatización del hapteno se produce por posiciones terminales del esqueleto de TF.

A la vista de los resultados obtenidos, se podría suponer que la interacción entre los anticuerpos y TF estaría dominada, al igual que en el caso de KM, principalmente por fuerzas hidrofóbicas, estabilizándose el complejo anticuerpo–analito por enlaces por puente de hidrógeno que podrían establecerse a través de cualquiera de los heteroátomos que forman parte de la estructura, y, en menor medida, por interacciones de tipo electrostático.

Finalmente, destacar que aunque existe una evidente relación entre el inmunógeno y el perfil de reconocimiento de los anticuerpos que genera, existen comportamientos llamativos. Así los mAbs obtenidos a partir del hapteno TFb6 presentan perfiles de reconocimiento similares a los generados por el hapteno que incorpora la cadena por la posición central de la molécula (TFc6). Este resultado parece indicar que la conformación que adopta el inmunógeno TFb6 es más parecida a la del TFc6 que a la de sus homólogos TFf6 y TFt6 (**Figura 3.22**). Igualmente, el comportamiento del anticuerpo TF0#17 resultó sorprendentemente más semejante a los mAbs obtenidos a partir de los haptenos con el brazo espaciador en sustitución del grupo CF₃. Este resultado sugiere, paradójicamente, que el hapteno en el inmunógeno TF0 (en el que el hapteno no presenta brazo espaciador y está directamente unido a la proteína a través de propio grupo carboxilato del toxóforo) se presentaría al sistema inmune de un modo análogo a como lo hacen los haptenos de los inmunógenos TFt6 y TFf6, de tal forma que la respuesta inmune que conduce a los correspondientes anticuerpos se habría dirigido en los tres casos hacia una zona más o menos común del esqueleto molecular de trifloxystrobin.

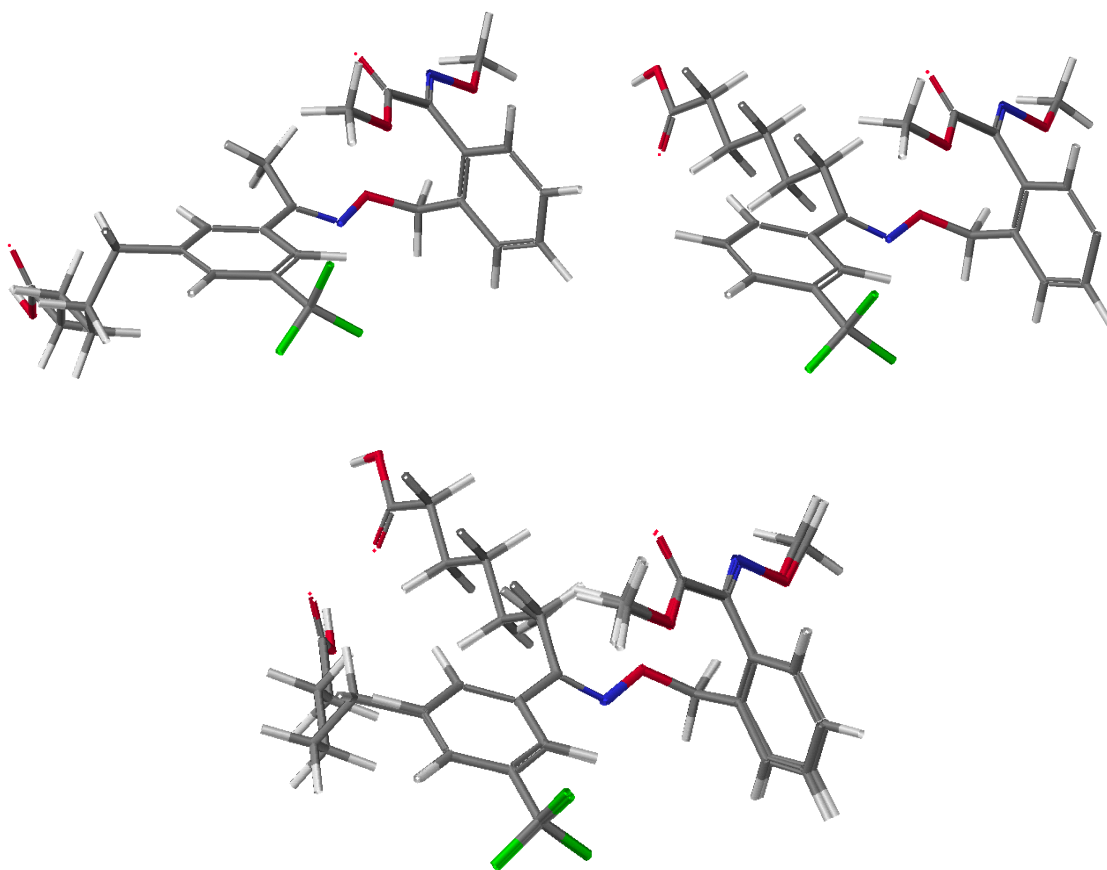


Figura 3.22. Conformaciones de los haptenos TFb6 (*superior izquierda*) y TFc6 (*superior derecha*) con la cadena hidrocarbonada que constituye el brazo espaciador orientada hacia la misma zona del espacio y que podrían potencialmente dar lugar a anticuerpos de similar especificidad. En la parte *inferior* se recoge la superposición de las dos conformaciones. Ambas conformaciones no son las conformaciones más estables obtenidas con cada uno de los haptenos en vacío, pero se encuentran entre el grupo de conformaciones menos energéticas de cada uno de ellos. Han sido obtenidas a partir de la incorporación del brazo espaciador en la posición adecuada de la conformación más estable de TF y optimización de la geometría utilizando Mecánica Molecular, seguido de la determinación del mapa correspondiente a la superficie de energía potencial (energy.map) representada por todas las conformaciones que resultan del giro de los dos primeros enlaces C–C de la cadena respecto de la posición de derivatización a través de la variación de los correspondientes ángulos diedros (search labels) en intervalos de 24° (CACHé MM3 program).

3.6.2. Especificidad frente a las principales estrobilurinas

Después de caracterizar la especificidad de todos los mAbs desde un punto de vista básico, y establecidas las principales propiedades de reconocimiento para cada uno de ellos, se procedió a evaluar la selectividad desde un punto de vista más analítico, con vistas al desarrollo de un inmunoensayo adecuado para la detección selectiva independiente de KM y TF en muestras hortofrutícolas. En este sentido, los fungicidas estrobilurínicos son compuestos

que por estar registrados en muchos casos para los mismos usos y en los mismos cultivos, podrían estar presentes en las mismas muestras, lo que unido a que se trata de compuestos de la misma familia hace que sea necesario comprobar su reactividad cruzada. Así pues, todos los mAbs se ensayaron frente a los principales miembros de la familia (kresoxim–methyl, trifloxystrobin, azoxystrobin, picoxystrobin, dimoxystrobin y metominostrobin) en el formato homólogo indirecto.

De los anticuerpos tipo ‘a’ tanto para KM como para TF, sólo se observó reactividad cruzada significativa con el mAb KMa6#29, el cual fue capaz de reconocer a dimoxystrobin (DM) con una RC del 10%.

Los anticuerpos procedentes del inmunógeno TFb6 no reconocieron a ninguna de las estrobilurinas ensayadas. Por el contrario, todos los anticuerpos originados a partir de KMb6 sí que mostraron una elevada reactividad cruzada hacia algunas estrobilurinas, especialmente hacia DM (**Figura 3.23**). En particular, con los mAbs KMb6#32 y KMb6#322 se obtuvieron valores de RC en torno al 300 y 100%, respectivamente, para este fungicida.

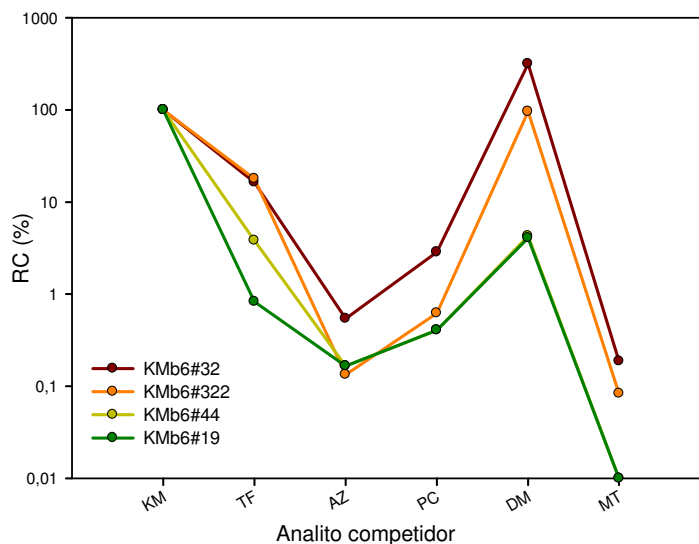


Figura 3.23. Perfil de reconocimiento de las estrobilurinas para los mAbs procedentes del inmunógeno BSA–KMb6.

Estos resultados no resultan muy sorprendentes debido a la similitud estructural de DM con KM (**Figura 3.24**). Estos dos anticuerpos también fueron capaces de reconocer a TF, aunque en menor medida, con valores de RC en torno al 20%. Este resultado resulta razonable ya que, como se ha mostrado en

la discusión de la especificidad de los mAbs frente a los diferentes análogos, estos anticuerpos interactúan preferentemente con el anillo en el que se encuentra el grupo toxóforo, el cual es común para KM y TF.

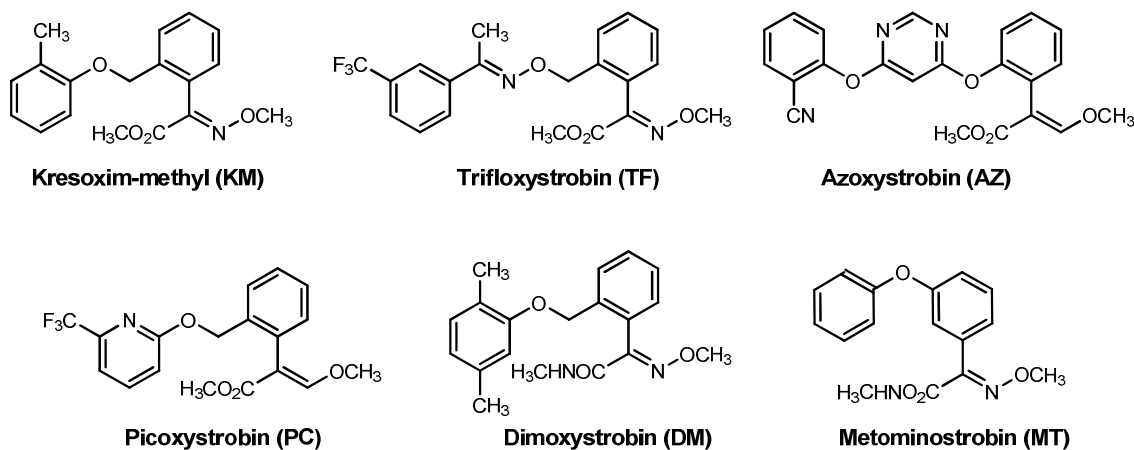


Figura 3.24. Fungicidas estrobilurínicos: evaluación de la especificidad.

El reconocimiento mostrado por los anticuerpos obtenidos a partir de las aproximaciones ‘c’, ‘e’ y ‘o’ para ambos fungicidas, así como por el mAb TF0#17, fue insignificante, con valores de RC inferiores al 1%. La única excepción a este comportamiento provino de los mAbs KMe6#26 y KMo6#114, para los que se obtuvieron valores de RC para DM del 67 y 33%, respectivamente. Además, KMo6#114 reconoció a metominostrobin (MT) con un valor de RC del 3% (**Figura 3.25**).

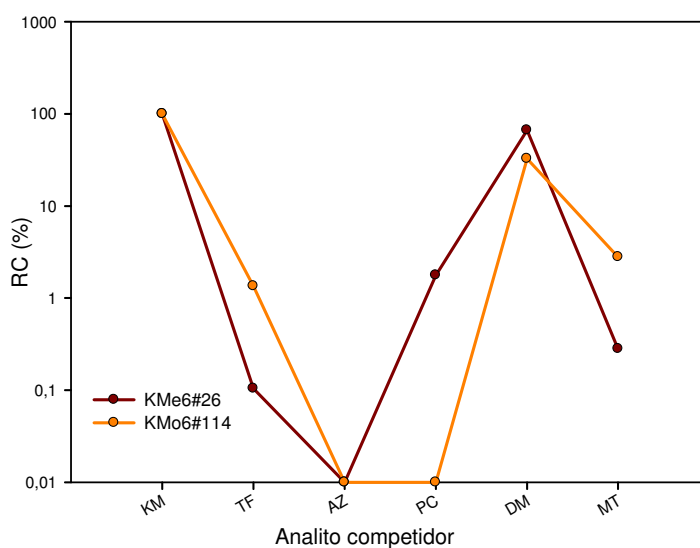


Figura 3.25. Perfil de reconocimiento de las estrobilurinas para los mAbs KMe6#26 y KMo6#114.

Finalmente, los anticuerpos procedentes del inmunógeno BSA-TF6 mostraron diferentes patrones de reconocimiento hacia las distintas estrobilurinas (**Figura 3.26**). En particular, el mAb TF6#14 fue capaz de reconocer a picoxystrobin (PC) con un valor de RC del 40% y a azoxystrobin (AZ) y KM con valores de RC por encima del 1%. El resto de anticuerpos de este grupo, incluyendo al mAb TF6#13, reconocieron a KM y DM con valores de RC que oscilaron entre el 1 y el 10% en función del anticuerpo. De nuevo queda patente que la especificidad de los anticuerpos va dirigida hacia la zona más alejada de la posición de funcionalización, ya que estos anticuerpos interaccionan preferentemente con el anillo **a** de las estrobilurinas, que generalmente presentan grupos toxóforos químicamente semejantes (**Figura 3.24**).

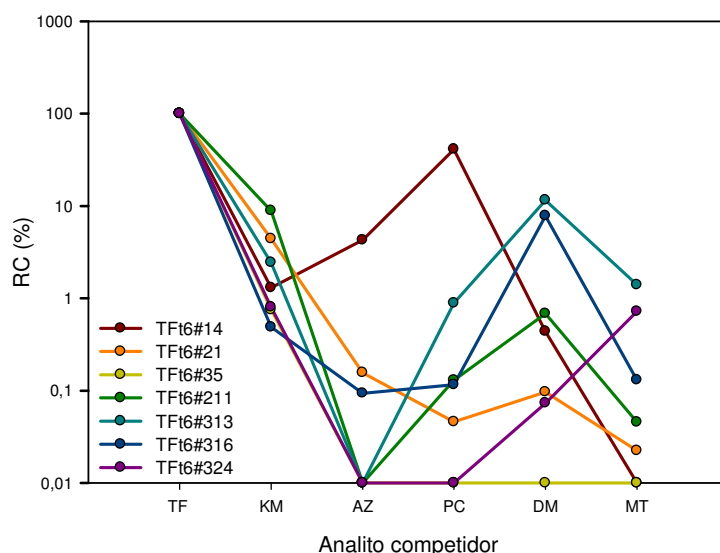


Figura 3.26. Perfil de reconocimiento de las estrobilurinas para los mAbs obtenidos a partir del inmunógeno BSA-TF6.

Una vez evaluada la afinidad y especificidad de toda la colección de anticuerpos, se decidió seleccionar los ensayos mostrados en la **Tabla 3.6.3** por ser a nuestro juicio los candidatos más idóneos para el desarrollo final de inmunoensayos. Así, para KM se seleccionaron dos ensayos directos y uno indirecto, mientras que para TF se seleccionaron dos indirectos y uno directo. La selección de ensayos para su posterior optimización y aplicación en muestras se realizó en primer lugar en base a su sensibilidad (IC_{50}) y rango de

análisis (pendiente), y en segundo lugar a su especificidad. De esta forma, se escogieron los mAbs KMo6#117 y TF0#17 en ambos formatos (directo e indirecto), ya que además de presentar una elevada afinidad hacia sus analitos no mostraron reconocimiento destacable hacia ninguna otra estrobilurina en los estudios de reactividad cruzada. En el caso del mAb KMo6#117, los dos ensayos escogidos fueron los que utilizan conjugados homólogos, mientras que para TF0#17 los dos ensayos hacen uso de conjugados heterólogos.

Adicionalmente se seleccionó el ensayo directo formado por el mAb KMb6#32 y el conjugado heterólogo HRP–KMe6. Este ensayo se seleccionó porque este anticuerpo fue el que mostró una mayor afinidad hacia KM, a pesar de que también mostró un reconocimiento significativo hacia TF (RC = 16%) y sobre todo hacia DM (RC = 300%). De hecho, aunque el perfil de reconocimiento de este mAb fue un suceso inesperado, no es menos cierto que podría utilizarse perfectamente para la determinación de dimoxystrobin, e incluso para la determinación cualitativa simultánea de DM, KM y TF.

Tabla 3.6.3. Selección final de ensayos para KM y TF

mAb	[mAb] ^a	Conjugado	[C] ^b	Parámetros ^c		
				A _{max}	pendiente	IC ₅₀ (nM)
KMb6#32	1000	HRP–KMe6	30	1.45 ± 0.24	−0.89 ± 0.09	0.68 ± 0.14
KMo6#117	300	HRP–KMo6	30	2.06 ± 0.19	−1.15 ± 0.15	1.40 ± 0.20
	100	OVA–KMo6	100	1.63 ± 0.18	−1.21 ± 0.15	1.56 ± 0.40
TF0#17	300	HRP–TFc6	30	0.92 ± 0.14	−1.19 ± 0.15	2.08 ± 0.49
	30	OVA–TFf6	1000	1.51 ± 0.24	−1.24 ± 0.15	1.84 ± 0.38
TFt6#316	30	OVA–TFt6	100	1.37 ± 0.14	−1.16 ± 0.28	4.33 ± 0.83

^a Concentración del anticuerpo en ng/mL. ^b Concentración del conjugado competidor en ng/mL.

^c Los valores son la media de diez experimentos independientes.

Por otra parte, los estudios de reactividad cruzada con análogos permitieron identificar tres anticuerpos, TFt6#313, TFt6#316 y TFt6#324, con valores de RC ligeramente superiores al 100% para el principal metabolito de trifloxystrobin, TF–Ac. Estos anticuerpos podrían considerarse adecuados para el desarrollo de ensayos capaces de medir el contenido global de trifloxystrobin, incluyendo su principal producto de degradación, por lo que se

decidió seleccionar la combinación mAb TFt6#316/OVA–TFt6 para estudios posteriores. Conviene señalar que la legislación canadiense establece como residuo de trifloxystrobin la suma del compuesto parental y su principal metabolito, sin que sea necesario diferenciar entre ellos y proporcionar valores individuales (PMRA, 2008), por lo que para este cometido resultaría muy adecuado el ensayo con el mAb TFt6#316.

3.6.3. Especificidad de los ensayos seleccionados

Normalmente las estrobilurinas se comercializan bajo distintos nombres registrados y mediante distintas formulaciones. En particular, KM y TF se comercializan individualmente o mezclados con otros fungicidas (**Tabla 3.6.4**). Por ello, una vez elegidos los ensayos, y previamente a su optimización, se decidió evaluar su especificidad frente a los compuestos con los que normalmente se formulan. Así mismo, se decidió incluir en este estudio otras estrobilurinas no ensayadas con anterioridad, como son pyraclostrobin, orysastrobin y fluoxastrobin (**Figura 3.27**).

Tabla 3.6.4. Distintas formulaciones que contienen KM y TF

Nombre comercial	Estrobilurina	Fungicida/s
Stroby Mix/Collis	Kresoxim–methyl	Boscalid
Allegro/Growell/Juwel/Ogam	Kresoxim–methyl	Epoxiconazole
Ensing/Mentor/Senso	Kresoxim–methyl	Fenpropimorph
Mantra/Juwel Top	Kresoxim–methyl	Epoxiconazole/ Fenpropimorph
Fint Star/Mistic	Trifloxystrobin	Pyrimethanil
Robus/Stratego	Trifloxystrobin	Propiconazole
Flint Max	Trifloxystrobin	Tebuconazole
Nativo	Trifloxystrobin	Tebuconazole

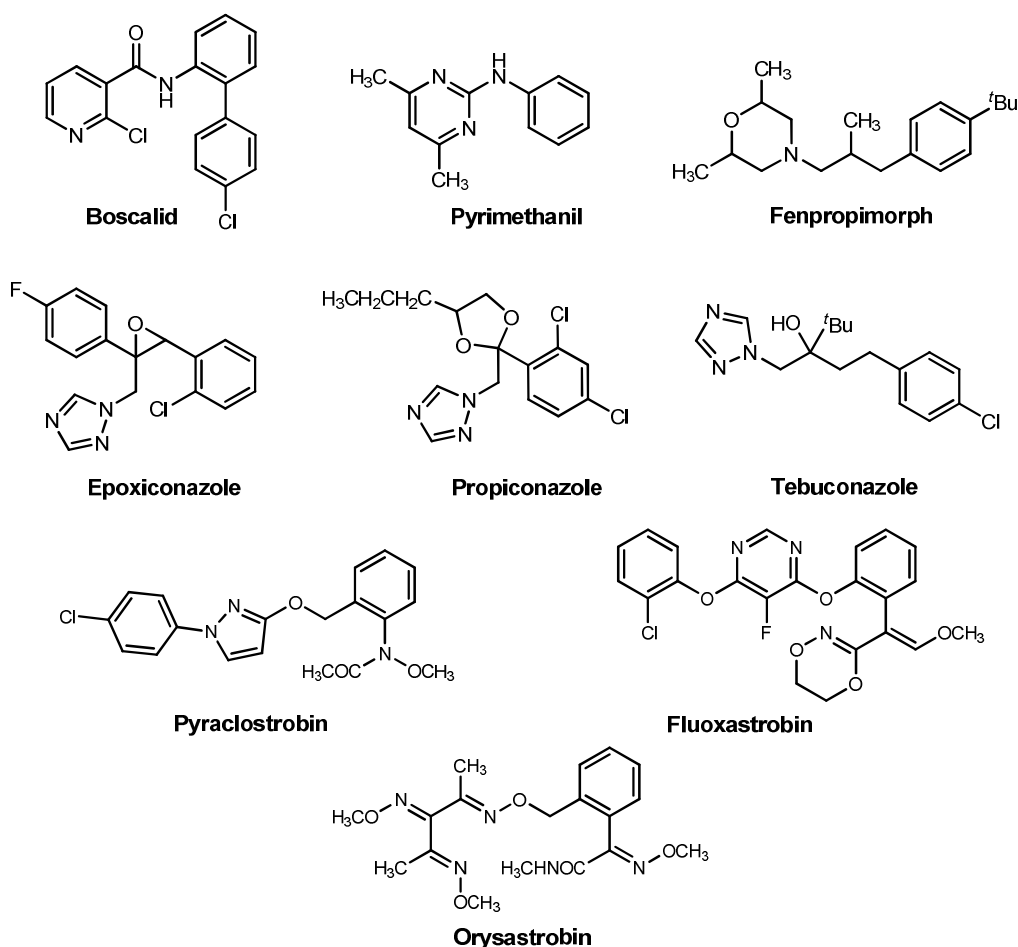


Figura 3.27. Estructuras de fungicidas que se formulan junto con KM y TF y otras estrobilurinas.

En general, no se observó reactividad cruzada en ninguno de los casos. Este hecho no resulta sorprendente porque estos compuestos (fungicidas y otras estrobilurinas) son estructuralmente muy diferentes y apenas comparten una mínima parte de la estructura con KM y TF. La única excepción la encontramos de nuevo con el ensayo directo del mAb KMb6#32 que fue capaz de reconocer bastante bien a orystrobin, mostrando valores significativos de RC (~ 30%).

3.7. Optimización y caracterización de los ensayos seleccionados

Las interacciones anticuerpo–analito y anticuerpo–conjugado pueden verse afectadas de forma muy significativa por las propiedades del medio en el que tienen lugar. Parámetros como el pH, la fuerza iónica, la concentración de detergente en el tampón de ensayo y la presencia de disolventes orgánicos, afectan habitualmente al funcionamiento de un inmunoensayo, incidiendo de

forma directa sobre la sensibilidad (IC_{50}) y la señal (A_{max}). Las muestras a analizar, ya sean ambientales o de alimentos, pueden presentar valores de pH y fuerza iónica muy diferentes a los del tampón en el que se preparan las disoluciones patrón, por lo general un tampón fosfato formulado en condiciones fisiológicas (pH 7.4 y fuerza iónica 162 mM). Además, en el caso de muestras vegetales, el procedimiento analítico más habitual implica la extracción con disolventes orgánicos, por lo que se hace necesario conocer cuál de ellos resulta más compatible con la interacción antígeno–anticuerpo. En consecuencia, el desarrollo de un inmunoensayo debe idealmente incluir un estudio en profundidad del efecto que los factores fisicoquímicos mencionados anteriormente pueden ejercer sobre su funcionamiento.

Por último, es importante destacar que el estudio de todos estos factores se debe entender como un proceso de optimización en el que, además de conocer las características del ensayo, se pueden encontrar condiciones más adecuadas para el mismo.

Todos los experimentos de optimización se realizaron exclusivamente con los ensayos finalmente seleccionados para su aplicación en muestras (**Tabla 3.6.3**; apartado anterior).

3.7.1. Influencia del pH y de la fuerza iónica

Con el objetivo de evaluar la influencia de la composición del tampón sobre los parámetros de ensayo se optó por una aproximación bi–paramétrica utilizando el programa Minitab (Minitab Inc., State College, PA, EEUU) en el que los factores considerados fueron el pH y la fuerza iónica.

Con este propósito se realizaron experimentos en los que la etapa competitiva tenía lugar en tampones de ensayo de diferente composición, de forma que se cubriera un rango relativamente amplio de valores de pH y fuerza iónica. La **Figura 3.28** muestra el efecto combinado de la fuerza iónica y del pH sobre la A_{max} (izquierda) y la IC_{50} (derecha) de los ensayos seleccionados para KM.

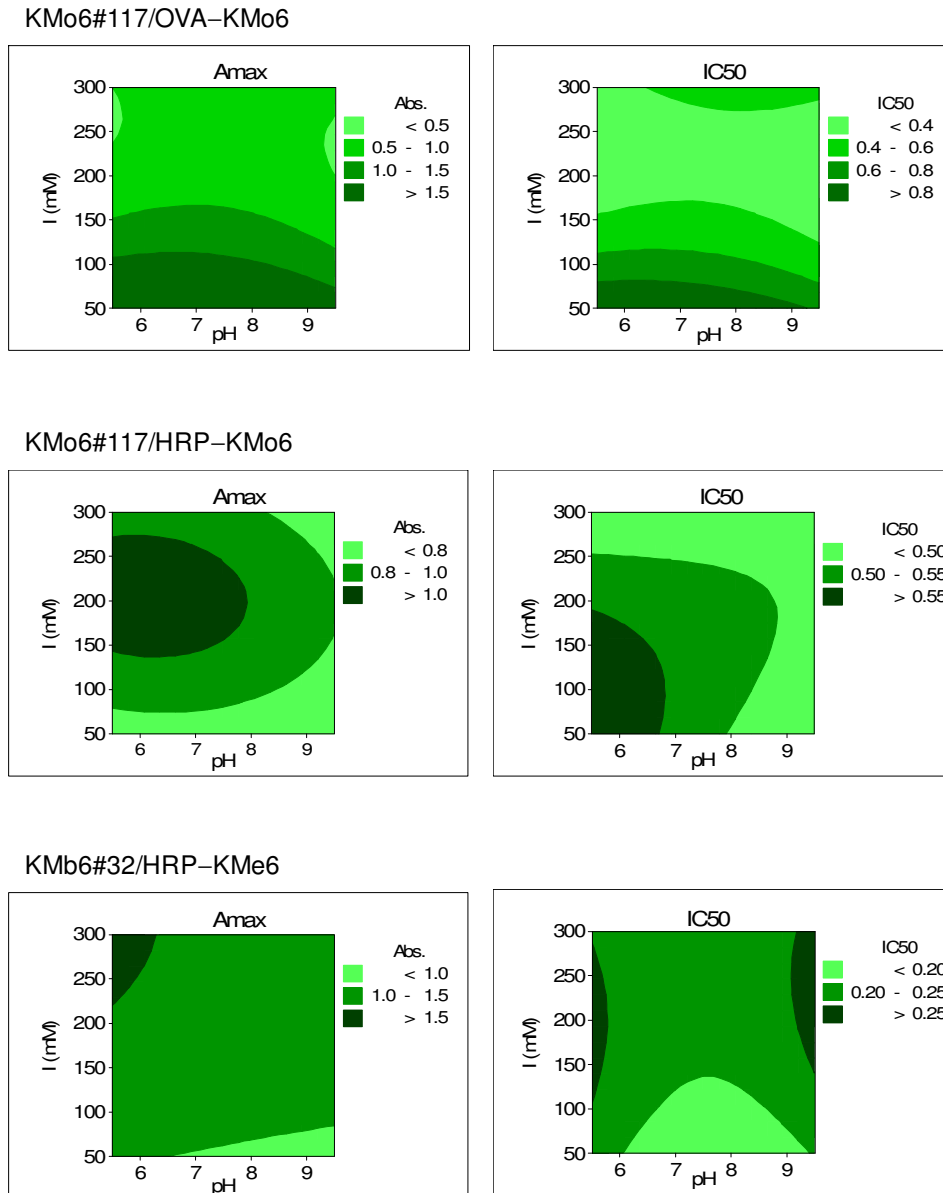


Figura 3.28. Influencia del pH y fuerza iónica (I) sobre la señal y la sensibilidad de los inmunoensayos seleccionados para kresoxim-methyl. Los valores son la media de dos experimentos independientes. Los valores de IC_{50} están en $\mu\text{g/L}$.

Para el ensayo indirecto con el mAb KMo6#117, se observa que tanto la señal como el valor de la IC_{50} sufren variaciones significativas dependiendo de los tampones utilizados, mostrando comportamientos totalmente opuestos. Por tanto, mientras valores elevados de fuerza iónica a cualquier rango de pH disminuyen considerablemente la señal del ensayo, el empleo de fuerzas iónicas por encima de 175 mM aumentan la sensibilidad del mismo.

En cuanto al ensayo directo con el mAb KMo6#117, tan sólo valores extremos de fuerza iónica y pH elevados consiguen disminuir el valor de A_{max} .

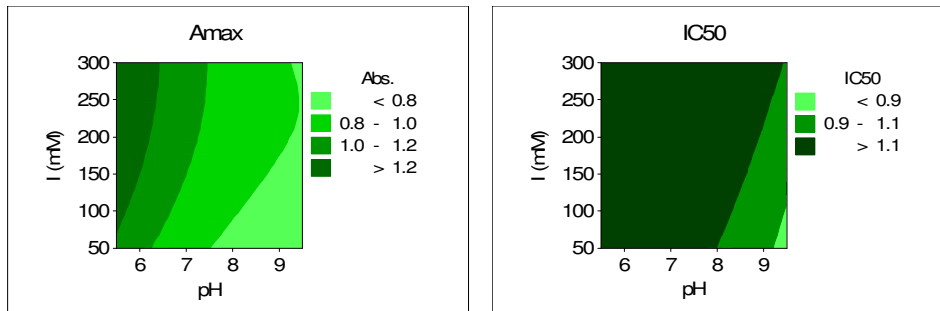
Sin embargo, la variación de estos dos factores fisicoquímicos no modifica significativamente el valor de IC_{50} dentro de un rango amplio, de forma que incluso tampones de muy diverso pH y fuerza iónica permiten mantener valores bajos de IC_{50} . Estos estudios revelan pues una baja dependencia de la sensibilidad de este ensayo con el pH y la concentración salina.

Finalmente, los estudios llevados a cabo con el mAb KMb6#32 en formato directo indican una clara tolerancia del mismo, siendo capaz de mantener invariables los valores de A_{max} e IC_{50} con respecto al ensayo original en PBS prácticamente en todo el intervalo de fuerza iónica y pH estudiados. Tan sólo el empleo de tampones básicos unidos a fuerzas iónicas muy bajas disminuye el valor de A_{max} , mientras que la sensibilidad sólo disminuye a valores extremos de pH.

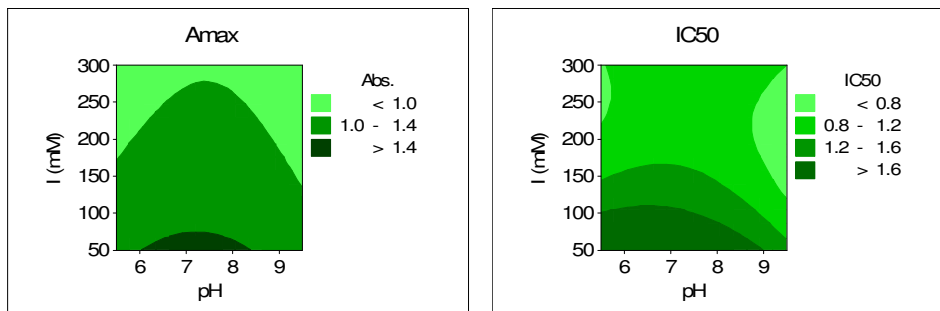
En resumen, se puede afirmar que para el ensayo indirecto, los valores de A_{max} y de IC_{50} muestran una clara dependencia en función de la fuerza iónica, mientras que los dos ensayos directos exhiben una mayor estabilidad frente a variaciones de pH y fuerza iónica.

En la **Figura 3.29** se muestra el efecto del pH y la fuerza iónica sobre los valores de A_{max} y de IC_{50} de los inmunoensayos seleccionados para TF.

TF0#17/HRP-TFc6



TF0#17/HRP-TFf6



TFf6#316/OVA-TFf6

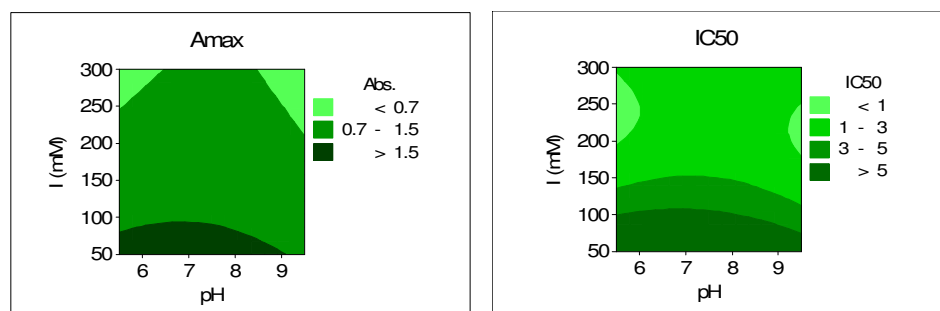


Figura 3.29. Influencia del pH y fuerza iónica (I) sobre la señal y la sensibilidad de los inmunoensayos seleccionados para trifloxystrobin. Los valores son la media de dos experimentos independientes. Los valores de IC_{50} están en $\mu\text{g/L}$.

Tal y como puede observarse en la **Figura 3.29**, mientras que para el ensayo directo con el mAb TF0#17 tanto la A_{max} como el valor de la IC_{50} dependen exclusivamente del pH, para los indirectos (ci-TF0#17 y ci-TFf6#316) los dos parámetros evaluados solo sufren variaciones destacables con la fuerza iónica. Aún así, para los tres ensayos se observan comportamientos opuestos en función del factor fisicoquímico del que dependen. Más concretamente, mientras que para el cd-TF0#17 tampones a $\text{pH} > 7$ disminuyen ligeramente el valor de la señal y la IC_{50} , con los otros dos

ensayos tampones con fuerzas iónicas menores de 150 nM aumentan ligeramente el valor de la A_{\max} pero provocan una importante pérdida de sensibilidad (más acusada en ci-TFt6#316).

A la vista de los resultados obtenidos podemos concluir que el pH y la fuerza iónica influyen sobre la sensibilidad de los inmunoensayos propuestos y por lo tanto hay que controlarlos. Por ello, y con el objetivo de poder ejercer un mayor control sobre el pH debido a la predecible variación de este factor en muestras vegetales, se decidió para todos los ensayos emplear un tampón común con una mayor capacidad tamponadora que el PBS. Más concretamente, el tampón seleccionado fue PB (tampón fosfato sódico 200 mM) que en ensayo proporciona un pH 7.4 y una fuerza iónica de 242 mM.

3.7.2. Influencia de la concentración de Tween 20

La utilización de ciertos detergentes en el tampón de ensayo para reducir las interacciones inespecíficas es una práctica muy habitual en las técnicas inmunoquímicas, siendo posiblemente el polisorbato 20, más conocido por su denominación comercial registrada Tween 20, el tensoactivo más empleado en este ámbito. Se trata de un surfactante no iónico basado en una estructura de polisorbato y monolaurato. En nuestro caso todos los ensayos fueron desarrollados siempre en presencia de una concentración fija de Tween 20 del 0.025% en ensayo. No obstante, existen algunas publicaciones en las que se ha descrito que su presencia puede ejercer una influencia negativa sobre la señal y/o la sensibilidad del ensayo (Mercader *et al.*, 2008a). Por ello, se decidió estudiar el efecto de dicho compuesto sobre los ELISAs seleccionados, para lo cual se llevaron a cabo estudios competitivos en presencia de diferentes concentraciones de Tween 20 (**Figura 3.30**).

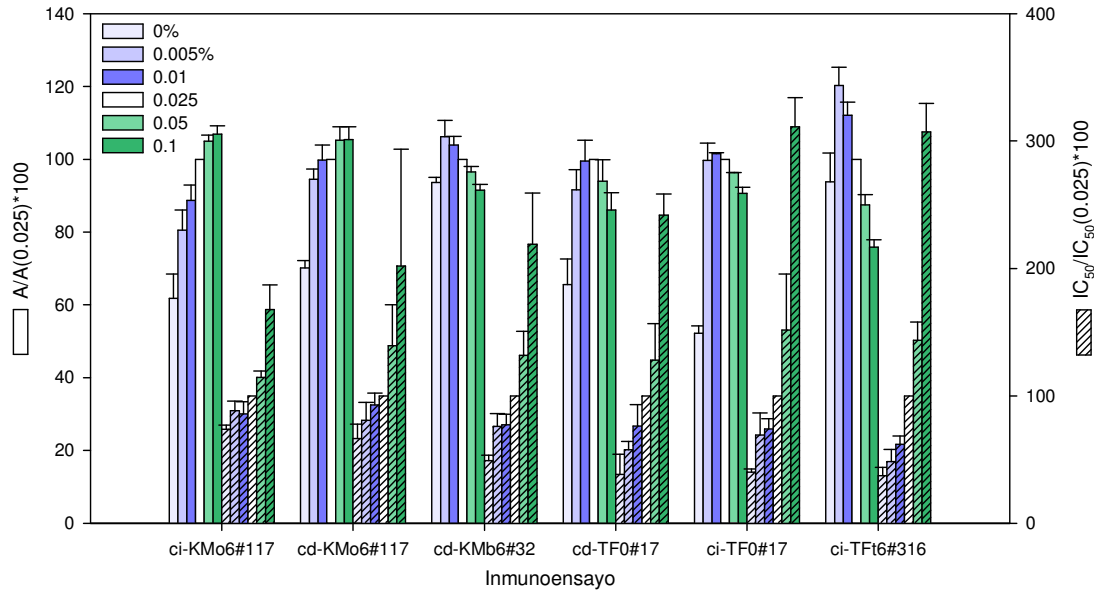


Figura 3.30. Influencia de la concentración de Tween 20 sobre los valores de A_{\max} y de IC_{50} de los ensayos seleccionados para kresoxim–methyl y trifloxystrobin. La señal de absorbancia y la IC_{50} han sido normalizadas frente al valor de A_{\max} y de IC_{50} correspondientes a la curva de inhibición obtenida en PBST (0.025%). Los valores son la media de tres experimentos independientes.

Para los ensayos indirecto y directo con el mAb KMo6#117 la señal aumenta considerablemente con la concentración de Tween 20. Sin embargo, para el resto de ensayos tanto de KM como de TF el valor de A_{\max} disminuye con concentraciones de detergente por encima de 0.025% (v/v). En general, para todos los mAbs la señal del ensayo es equivalente a concentraciones de Tween de 0.01% y de 0.025% (v/v) en ensayo, y para todos ellos en ausencia del tensoactivo la señal disminuye apreciablemente.

En todos los casos, el ensayo sin Tween 20 es el que proporciona los valores más elevados de sensibilidad, pero como va acompañado de un importante descenso de la A_{\max} y además la presencia de detergente contribuye a evitar interacciones inespecíficas, no se consideró adecuado llevar a cabo ningún ensayo en estas condiciones. En contraposición, el uso de una concentración de Tween 20 por encima de 0.025% provoca un importante aumento en el valor de la IC_{50} , por lo que se consideró que concentraciones comprendidas entre 0.01% y 0.025% podían ser adecuadas.

En definitiva, en base a los resultados obtenidos se consideró que la concentración habitual de Tween 20 (0.025%) resultaba óptima para los

ensayos directos e indirectos proporcionados por los mAbs KMo6#117 y TF0#17, mientras que para los ensayos con los mAbs KMb6#32 y TFt6#316 se decidió utilizar una concentración de Tween 20 ligeramente inferior. Más concretamente, se optó por cambiar la concentración de detergente de 0.025% a 0.01%, ya se observó una cierta mejora tanto en la sensibilidad como en la señal de ambos inmunoensayos.

3.7.3. Tolerancia a disolventes orgánicos

Para llevar a cabo la cuantificación de residuos agroquímicos en muestras de origen alimentario, especialmente cuando se trata de matrices sólidas, suele requerirse su extracción empleando disolvente orgánicos (Moreno *et al.*, 2001b; Brun *et al.*, 2005; Gabaldón *et al.*, 2007; Jiménez *et al.*, 2010; Esteve–Turrillas *et al.*, 2011a). En el caso de los inmunoensayos se emplean disolventes miscibles en agua, de forma que los extractos orgánicos se pueden diluir en el tampón en el que se realiza la curva patrón. De esta forma, la inmunorreacción tiene lugar en un medio acuoso tamponado con una baja concentración de disolvente. Sin embargo, como ya se ha comentado, la presencia incluso de pequeñas cantidades de disolvente orgánico en el tampón de ensayo puede interferir en la interacción entre el anticuerpo y el analito en disolución y/o el conjugado competidor (Watanabe *et al.*, 2005; Liang *et al.*, 2007), cambiando parámetros analíticos tales como la A_{max} y la IC_{50} . Por otro lado, la presencia de un cierto porcentaje de disolvente puede resultar beneficioso, ya que puede contribuir a incrementar la solubilidad y facilitar la detección de compuestos apolares (Estévez *et al.*, 2006), como en el caso de KM y sobre todo de TF. Por ello, se procedió a evaluar la influencia sobre los ensayos seleccionados de varios disolventes orgánicos comúnmente empleados para la extracción de residuos de plaguicidas, concretamente metanol, etanol y acetonitrilo.

Estos estudios se llevaron a cabo preparando curvas patrón de los analitos en PBS con diferentes concentraciones de los disolventes mencionados, mientras que las disoluciones de los anticuerpos y los trazadores enzimáticos se realizaron en PBST.

La **Figura 3.31** muestra el efecto de varias concentraciones [0.5, 1, 2, 5 y 10% (v/v) en ensayo] de metanol, etanol y acetonitrilo sobre las características

analíticas de los inmunoensayos seleccionados para la determinación de KM y TF. Como se puede observar, el aumento de la concentración de disolvente provoca una disminución, en algunos casos importante, tanto de la sensibilidad como de la señal máxima. El ensayo indirecto basado en el mAb TFi6#316 resulta ser el más susceptible, ya que conforme aumenta la proporción de disolvente se produce una caída brusca de la A_{\max} (sobre todo con etanol y acetonitrilo) y un aumento importante de la IC_{50} .

En general, de los tres disolventes evaluados, el metanol es el menos tolerado, ya que concentraciones superiores al 0.5% (v/v) en ensayo producen un aumento importante en el valor de IC_{50} de todos los ensayos, disminuyendo por tanto drásticamente la sensibilidad de los mismos. Sin embargo, con etanol y acetonitrilo los ensayos muestran, en general, una mayor tolerancia. Concentraciones de estos dos disolventes hasta el 2% (v/v) en ensayo no provoca cambios aparentemente importantes ni sobre la sensibilidad ni sobre la señal de los inmunoensayos seleccionados.

En base a los resultados obtenidos, el etanol y el acetonitrilo podrían ser adecuados para la extracción de KM y TF a partir de muestras vegetales, si bien estos extractos deberían ser convenientemente diluidos en tampón de ensayo antes de su análisis para obtener resultados fiables, o bien realizar la curva patrón con la misma cantidad de disolvente que va a tener la muestra.

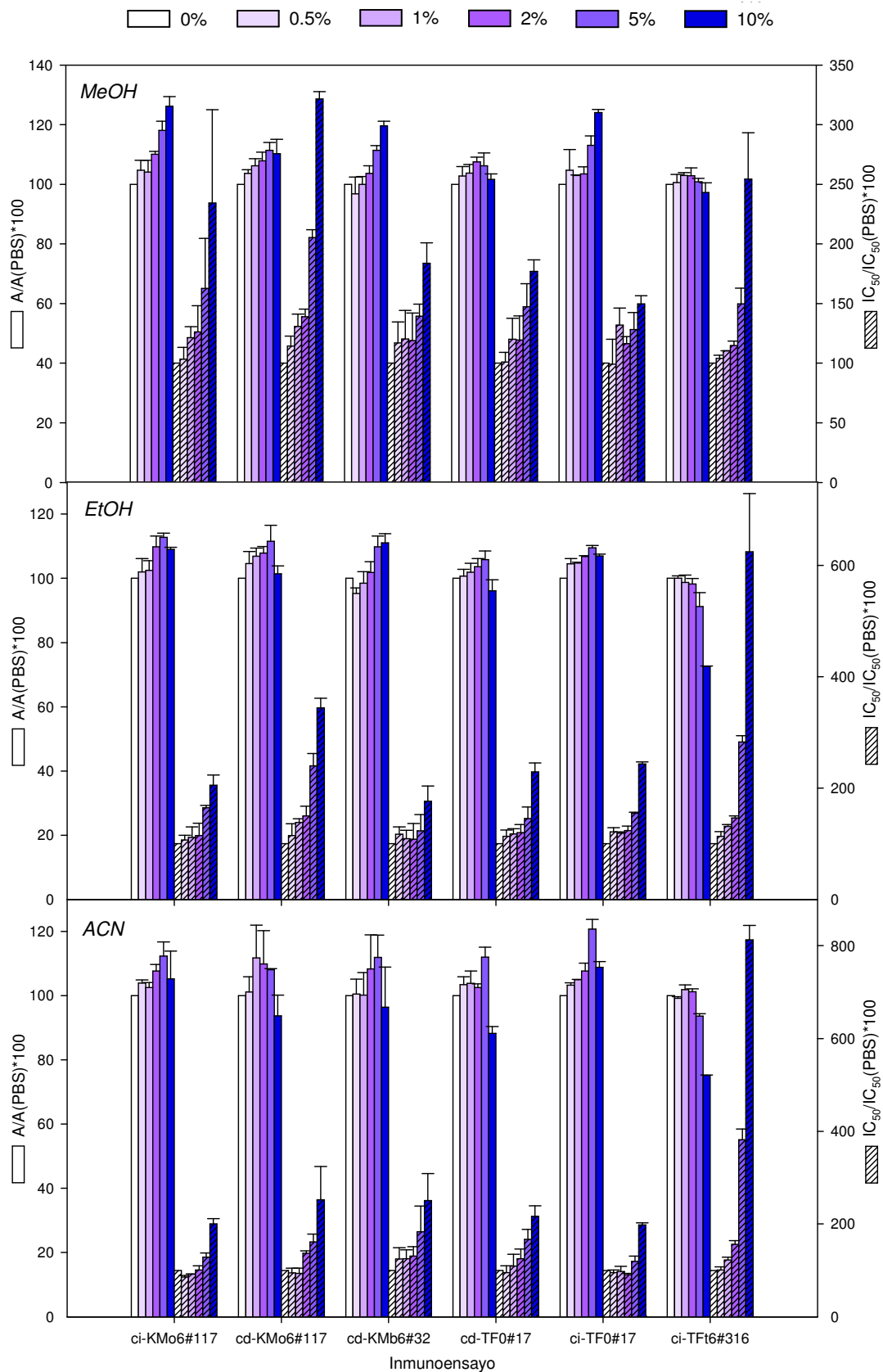


Figura 3.31. Influencia del uso de disolventes orgánicos durante la etapa competitiva en la señal y la sensibilidad de los inmunoensayos seleccionados. La A_{max} y la IC_{50} han sido normalizadas frente a la curva de inhibición obtenida en tampón de ensayo (PBS). Cada valor representa el promedio de tres experimentos independientes.

3.7.4. Características analíticas de los inmunoensayos propuestos

Las curvas patrón de los inmunoensayos seleccionados para KM resultantes de promediar 16 curvas de inhibición se muestran en la **Figura 3.32**. Para poder ser adecuadamente promediadas, las curvas individuales se normalizaron expresando la absorbancia como el porcentaje de la respuesta máxima.

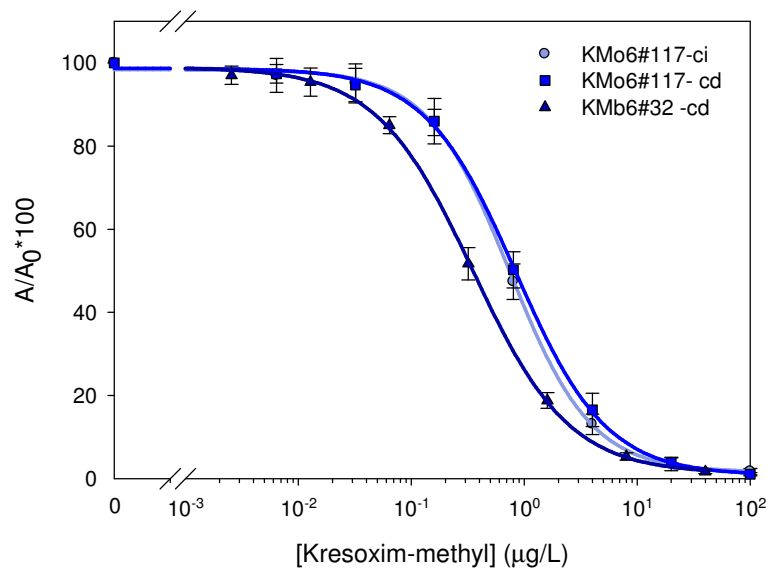


Figura 3.32. Curvas de inhibición para KM de los tres inmunoensayos desarrollados. Cada punto representa la media de 16 experimentos realizados en días diferentes.

En la **Tabla 3.7.1** se muestran las concentraciones de inmunorreactivos y las principales características analíticas de los inmunoensayos optimizados para KM. El ensayo basado en la utilización del mAb KMb6#32 fue el que alcanzó una mejor detectabilidad ($LOD = 0.036 \mu\text{g/L}$), si bien los dos ensayos que emplean el mAb KMo6#117 también alcanzaron un excelente LOD de $0.1 \mu\text{g/L}$. Teniendo en cuenta que los LMRs establecidos por la Unión Europea para KM en alimentos de origen vegetal oscilan entre 0.05 y 1 mg/kg (dependiendo del tipo de producto), podemos concluir que los ensayos desarrollados poseen en principio sensibilidad suficiente para analizar residuos de este fungicida dentro de los límites establecidos por el marco legal, ya que sus límites de detección se sitúan al menos tres órdenes de magnitud por debajo del menor valor establecido.

Tabla 3.7.1. Condiciones finales y parámetros analíticos de los inmunoensayos seleccionados para kresoxim–methyl (n=16)

	Inmunoensayos para la detección de kresoxim–methyl		
	ci–KMo6#117	cd–KMo6#117	cd–KMe6#32
[mAb]	100 ng/mL	300 ng/mL	1000 ng/mL
Conjugado	OVA–KMo6 (100 ng/mL)	HRP–KMo6 (30 ng/mL)	HRP–KMe6 (30 ng/mL)
A_{max}	2.390 ± 0.254	2.037 ± 0.208	1.288 ± 0.150
A_{min}	0.039 ± 0.015	0.021 ± 0.009	0.021 ± 0.006
Pendiente	-1.198 ± 0.059	-1.082 ± 0.056	-1.017 ± 0.042
IC ₅₀ (µg/L)	0.738 ± 0.032	0.838 ± 0.044	0.350 ± 0.016
LOD (µg/L) ^a	0.103	0.097	0.036
Intervalo de trabajo (µg/L) ^b	0.220 –2.470	0.220 –3.080	0.086 –1.440
Tampón	PBT (0.025% Tween)	PBT (0.025% Tween)	PBT (0.01% Tween)
Tiempo (h)	2.5	1.5	1.5

^a Límite de detección (IC₁₀). ^b Intervalo de trabajo (IC₂₀–IC₈₀).

En cuanto a trifloxystrobin, las curvas de inhibición obtenidas a partir de 14 experimentos competitivos en las condiciones finales de ensayo y los parámetros analíticos de los inmunoensayos propuestos se muestran en la **Figura 3.33** y en la **Tabla 3.7.2**, respectivamente.

El ensayo directo con el mAb TF0#17 y el indirecto con el mAb TFt6#316 proporcionaron sensibilidades prácticamente equivalentes, obteniéndose LODs de 0.085 µg/L (85 ppt). Por su parte, el ensayo indirecto con el mAb TF0#17 resultó incluso más sensible, con un LOD de 0.045 µg/L. Por lo tanto, los tres ensayos proporcionan una sensibilidad tres órdenes de magnitud por debajo del menor LMR europeo legislado para TF en diferentes muestras hortofrutícolas (0.02 mg/kg).

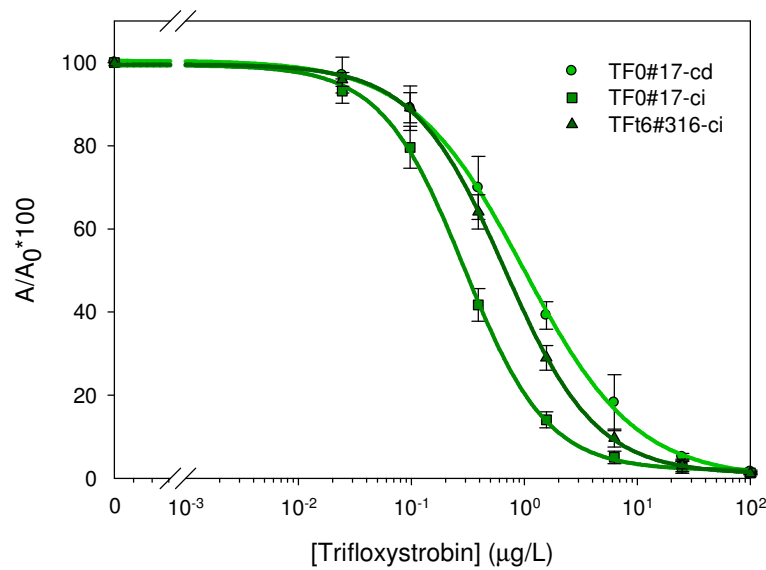


Figura 3.33. Curvas de inhibición para TF de los tres inmunoensayos desarrollados. Cada punto representa la media de 14 experimentos realizados en días diferentes.

Tabla 3.7.2. Condiciones finales y parámetros analíticos de los inmunoensayos seleccionados para trifloxystrobin (n=14)

	Inmunoensayos para la detección de trifloxystrobin		
	cd-TF0#17	ci-TFt6#316	ci-TF0#17
[mAb]	300 ng/mL	30 ng/mL	30 ng/mL
Conjugado	HRP-TFc6 (50 ng/mL)	OVA-TFt6 (100 ng/mL)	OVA-TFt6 (1000 ng/mL)
A_{\max}	1.760 ± 0.228	2.690 ± 0.196	2.131 ± 0.191
A_{\min}	0.027 ± 0.008	0.031 ± 0.008	0.028 ± 0.008
Pendiente	-0.878 ± 0.034	-1.075 ± 0.028	-1.184 ± 0.051
IC ₅₀ (µg/L)	0.986 ± 0.048	0.668 ± 0.018	0.292 ± 0.012
LOD (µg/L) ^a	0.085	0.084	0.045
Intervalo de trabajo (µg/L) ^b	0.211–4.860	0.178–2.460	0.085–1.057
Tampón	PBT (0.025% Tween)	PBT (0.01% Tween)	PBT (0.025% Tween)
Tiempo (h)	1.5	2.5	2.5

^a Límite de detección (IC₁₀). ^b Intervalo de trabajo (IC₂₀–IC₈₀).

Además, el ensayo con el anticuerpo TFt6#316 permitiría, en los casos en los que fuese necesario, ser empleado como herramienta de cuantificación global de trifloxystrobin y su principal metabolito (TF-Ac, **Tabla 3.6.2** del apartado anterior).

3.8. Aplicación de los inmunoensayos al análisis de muestras vegetales

La finalidad última de un inmunoensayo es poder ser utilizado como método analítico para la determinación del compuesto diana en muestras reales. Por ello, una vez desarrollado, caracterizado y optimizado, es necesario demostrar su aplicabilidad mediante el análisis de muestras en las que esté presente el plaguicida de interés.

En este sentido, en la presente Tesis Doctoral se ha abordado la validación de los ensayos seleccionados mediante dos aproximaciones complementarias. Por una parte, se ha evaluado la exactitud y la precisión mediante estudios de recuperación llevados a cabo en matrices fortificadas, y por otra parte, la exactitud del ensayo también se ha evaluado mediante el análisis de muestras de campo de cultivos de tomate, pepino y fresa tratados con los fungicidas de interés (Stroby, 50% KM; Flint, 50% TF) comparando los resultados obtenidos con un método de referencia basado en GC-MS.

Dado que actualmente la mayoría de los métodos cromatográficos descritos para la determinación de KM y TF utilizan el método QhEChERs para la extracción de ambos fungicidas de las matrices alimentarias (Hercegová *et al.*, 2006; Schurek *et al.*, 2008; Koesukwiwat *et al.*, 2010; Mastovska *et al.*, 2010; Smoker *et al.*, 2011), éste fue el método de extracción seleccionado.

3.8.1. Determinación de kresoxim-methyl y trifloxystrobin en muestras fortificadas

En primer lugar, se fortificó con KM y TF de manera independiente cada una de las matrices vegetales de estudio (tomate, pepino y fresa). Se seleccionaron estos tres cultivos porque tanto KM como TF se usan ampliamente para combatir el oídio y la sarna en tomates, pepinos y fresas (Navalón *et al.*, 2002). Además, KM se emplea para controlar la podredumbre gris (*Botrytis cinerea*) en fresas (Rabolle *et al.*, 2006) y la podredumbre negra (*Venturia inaequalis*) en pepinos (Wang *et al.*, 2007a), mientras que TF se utiliza para evitar la alternariosis (*Alternaria solana*) del tomate. El LMR actual establecido por la Unión Europea para KM en tomate, pepino y fresas es de 0.5, 0.05 y 1.0 mg/kg,

respectivamente, mientras que para TF los LMR permitidos son de 0.5 mg/kg para tomates y fresas y de 0.2 mg/kg para pepinos.

Previamente a la determinación de ambos fungicidas en muestras fortificadas mediante ELISA, se determinó la posible interferencia de la matriz sobre las curvas de inhibición de los ensayos seleccionados.

3.8.2. Determinación del efecto matriz

A menudo, la propia matriz a analizar provoca interferencias en los inmunoensayos debido tanto a parámetros fisicoquímicos (pH, fuerza iónica, viscosidad, etc.), como a la presencia de determinados compuestos propios del alimento.

En el caso de muestras líquidas como pueden ser aguas y zumos, el efecto matriz generalmente suele minimizarse o incluso eliminarse simplemente diluyendo la muestra o el extracto, ya que con frecuencia el pH suele ser responsable de gran parte de los efectos observados, por lo que una adecuada tamponación resulta suficiente (Abad y Montoya, 1995; Abad *et al.*, 1999; Abad *et al.*, 2001; Ramón–Azcón *et al.*, 2009; Mercader y Abad–Fuentes, 2009), pudiendo o no incluir un sencillo paso de filtración para eliminar partículas en suspensión (Jiménez *et al.*, 2010). Sin embargo, la mayoría de matrices sólidas o líquidas más complejas requieren la aplicación de tratamientos más laboriosos de purificación o limpieza, como la extracción en fase sólida (SPE) empleando adsorbentes de diferente tipo (Bravo *et al.*, 2009; Argarate *et al.*, 2010; Salvador *et al.*, 2010).

Por ello, es conveniente determinar en cada caso en qué medida afecta la matriz de la muestra al ELISA, con el objetivo de establecer la mínima dilución necesaria para evitar las interferencias generadas por la misma y llevar a cabo la cuantificación de manera correcta. El estudio del efecto matriz se llevó a cabo comparando las curvas de inhibición obtenidas en diferentes diluciones de los extractos QuEChERS de tomate, pepino y fresas, con una curva control preparada en el tampón final de ensayo (**Figuras 3.34, 3.35 y 3.36**).

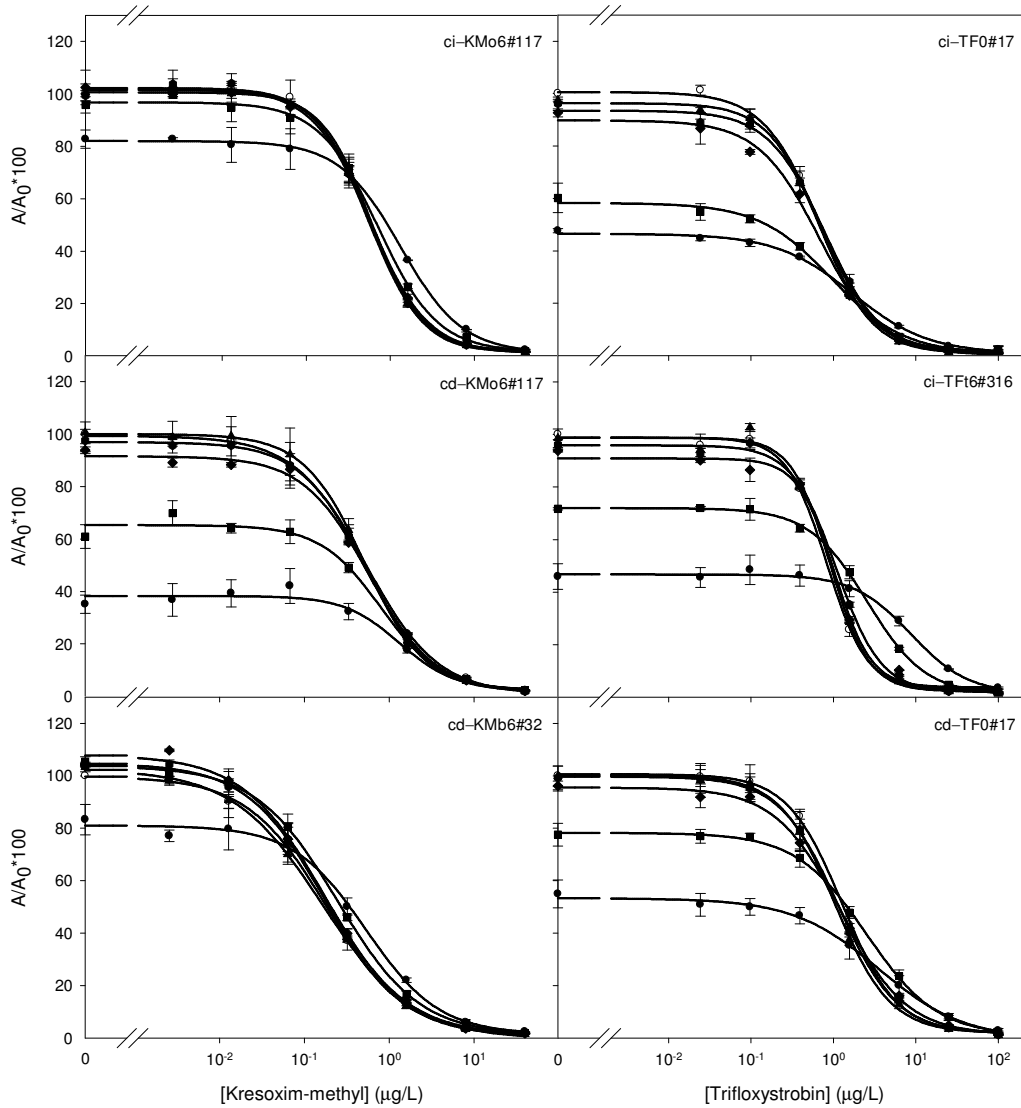


Figura 3.34. Influencia del efecto matriz de extractos de tomate sobre los inmunoensayos desarrollados para kresoxim-methyl y trifloxystrobin. (o) Tampón, (●) 1/10, (■) 1/30, (◆) 1/100, (▼) 1/300 y (▲) 1/1000. Las diluciones indicadas se refieren a la dilución final de la matriz en ensayo. La señal ha sido normalizada frente al valor de absorbancia obtenido en ausencia de analito en tampón de ensayo. Cada valor representa el promedio de tres experimentos independientes.

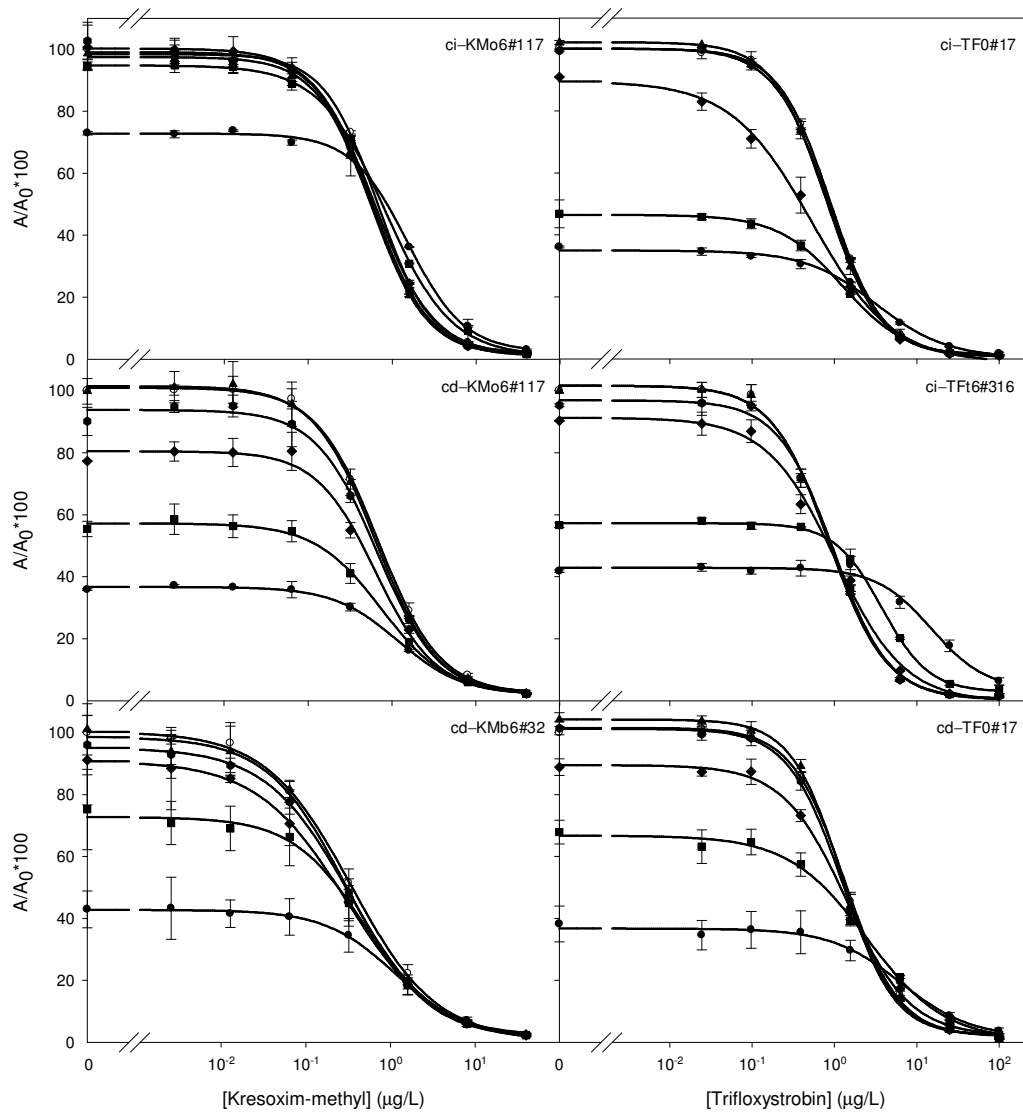


Figura 3.35. Influencia del efecto matriz de extractos pepino sobre los inmunoensayos desarrollados para kresoxim-methyl y trifloxystrobin. (o) Tampón, (●) 1/10, (■) 1/30, (◆) 1/100, (▼) 1/300 y (▲) 1/1000. Las diluciones indicadas se refieren a la dilución final de la matriz en ensayo. La señal ha sido normalizada frente al valor de absorbancia obtenido en ausencia de analito en tampón de ensayo. Cada valor representa el promedio de tres experimentos independientes.

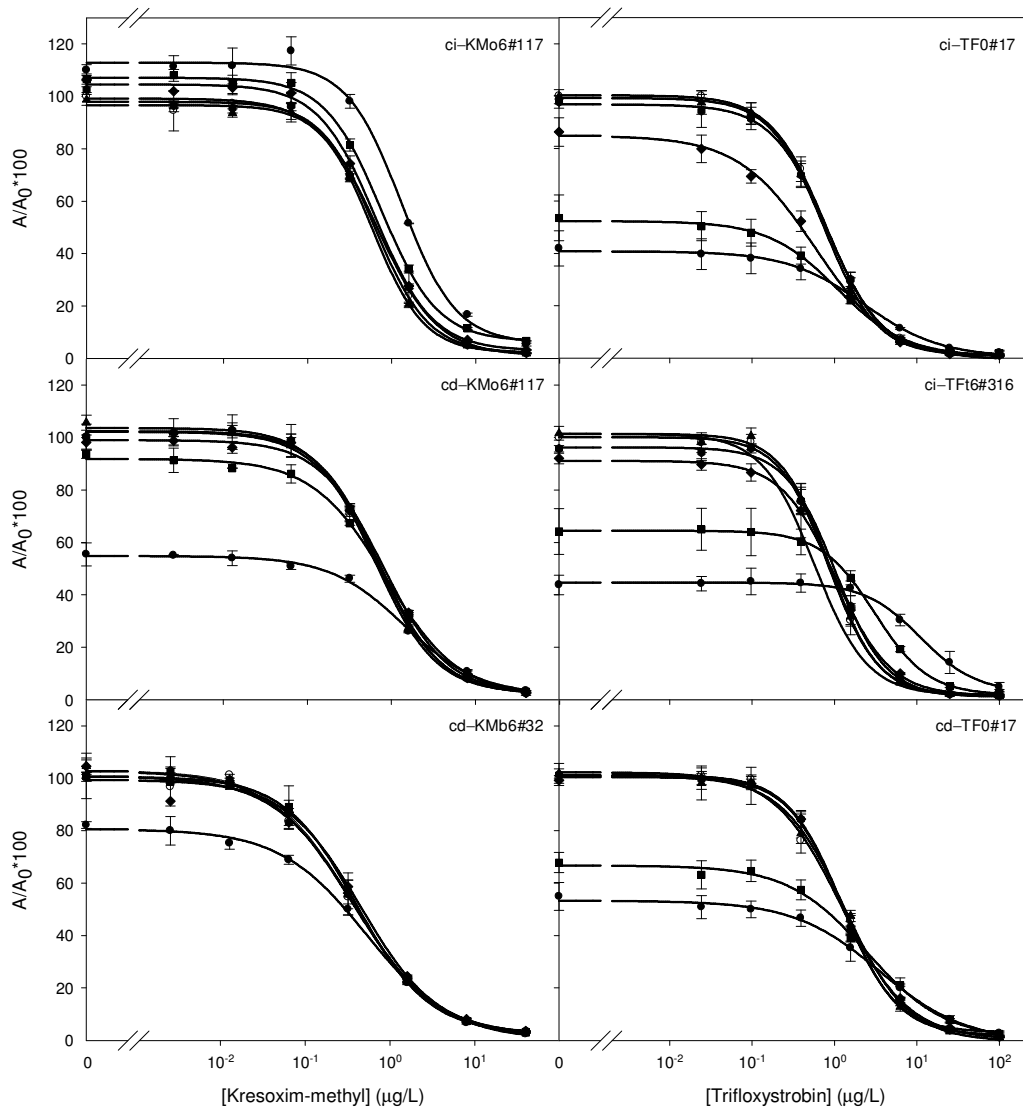


Figura 3.36. Influencia del efecto matriz de extractos de fresa sobre los inmunoensayos desarrollados para kresoxim-methyl y trifloxystrobin. (o) Tampón, (●) 1/10, (■) 1/30, (◆) 1/100, (▼) 1/300 y (▲) 1/1000. Las diluciones indicadas se refieren a la dilución final de la matriz en ensayo. La señal ha sido normalizada frente al valor de absorbancia obtenido en ausencia de analito en tampón de ensayo. Cada valor representa el promedio de tres experimentos independientes.

Los resultados indican que claramente es necesario diluir los extractos de las tres matrices, tanto para los ensayos desarrollados para KM como para los ensayos de TF. Se observa un intenso efecto matriz en los tres ensayos para TF y en el ensayo cd-KMo6#117, mientras que para los inmunoensayos ci-KMo6#117 y cd-KMb6#32, el efecto de la matriz es mucho menor. Merece la pena destacar que los extractos de pepino muestran un efecto matriz más acusado que en el caso de tomates y fresas. En resumen, para evitar un

posible efecto matriz sobre los ELISAs desarrollados, parece recomendable una dilución mínima del extracto de 1/100 o 1/300, dependiendo del ensayo.

3.8.3. Estudios de recuperación

La estimación de la exactitud y precisión de los inmunoensayos desarrollados para la cuantificación de KM y TF se llevó a cabo mediante estudios de recuperación en muestras fortificadas de tomate, pepino y fresa. En este sentido, una vez estudiados los efectos matriz y determinadas las diluciones mínimas necesarias para cada matriz en los diferentes ensayos, los extractos de las tres matrices se fortificaron con distintas cantidades de KM (10, 30, 100 y 300 $\mu\text{g}/\text{kg}$) y de TF (10, 30, 50, 100, 300 y 500 $\mu\text{g}/\text{kg}$) y se midieron después de una simple dilución directa en tampón PB. Las fortificaciones se realizaron a niveles por debajo de los LMRs permitidos por la Unión Europea para asegurar la capacidad analítica de los ensayos propuestos sometiénolos a condiciones más restrictivas que las marcadas por la legislación. Con el objetivo de que las concentraciones de las muestras coincidieran con el rango de medida de los inmunoensayos, se realizaron los análisis empleando tres diluciones, 1/100, 1/300 y 1/1000, y se compararon los resultados obtenidos.

En la **Tabla 3.8.1** se muestran los valores de recuperación obtenidos para las muestras de tomate, pepino y fresa fortificadas con KM. En general, con los tres ensayos propuestos se obtuvieron recuperaciones cuantitativas para las diferentes concentraciones fortificadas en las tres matrices estudiadas, mostrando desviaciones aceptables. Merece la pena destacar que con la dilución más baja (1/100) fue posible determinar todos los niveles de fortificación. Es más, con la dilución 1/100 las muestras con 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de KM estarían teóricamente muy próximas al LOD de los ensayos indirecto y directo del mAb KMo6#117, pero aun así se obtuvieron valores de recuperación aceptables. También empleando este factor de dilución las muestras con 300 $\mu\text{g}/\text{L}$ estarían fuera del rango teórico de medida, pero en este caso por estar demasiado concentradas (3 $\mu\text{g}/\text{L}$). No obstante, todos los ensayos mostraron una adecuada capacidad para medir en la zona muy próxima a la inhibición total y permitieron la cuantificación correcta de dicha concentración.

Tabla 3.8.1. Valores de recuperación (%) para las muestras fortificadas con kresoxim-methyl y determinadas por ELISA^a

Muestra	[KM] ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	ci-ELISA KMo6#117			cd-ELISA KMo6#117			cd-ELISA KMb6#32		
		Factor de dilución			Factor de dilución			Factor de dilución		
		1/100	1/300	1/1000	1/100	1/300	1/1000	1/100	1/300	1/1000
Tomate	10	91 \pm 8	^b		116 \pm 14			101 \pm 16	104 \pm 9	
	30	97 \pm 13	104 \pm 17		109 \pm 16	104 \pm 14		93 \pm 4	104 \pm 16	105 \pm 12
	100	103 \pm 8	99 \pm 11	95 \pm 10	111 \pm 4	106 \pm 10	99 \pm 15	108 \pm 8	112 \pm 12	109 \pm 6
	300	104 \pm 10	111 \pm 6	116 \pm 10	120 \pm 3	113 \pm 8	113 \pm 8	102 \pm 12	112 \pm 13	115 \pm 5
Pepino	10	81 \pm 9			75 \pm 21			112 \pm 16	135 \pm 22	
	30	101 \pm 18	100 \pm 12		98 \pm 11	92 \pm 8		113 \pm 7	110 \pm 5	101 \pm 5
	100	104 \pm 6	104 \pm 14	111 \pm 7	116 \pm 4	113 \pm 13	106 \pm 7	104 \pm 9	119 \pm 4	112 \pm 12
	300	102 \pm 4	115 \pm 8	117 \pm 4	112 \pm 9	118 \pm 5	111 \pm 6	101 \pm 14	104 \pm 10	114 \pm 11
Fresa	10	97 \pm 19			115 \pm 16			111 \pm 5	87 \pm 14	
	30	97 \pm 18	39 \pm 15		115 \pm 25	110 \pm 18		120 \pm 4	109 \pm 5	147 \pm 50
	100	100 \pm 19	96 \pm 19	103 \pm 17	123 \pm 8	118 \pm 7	115 \pm 12	116 \pm 11	116 \pm 5	113 \pm 15
	300	103 \pm 20	101 \pm 6	106 \pm 15	120 \pm 4	118 \pm 5	118 \pm 2	107 \pm 17	115 \pm 4	106 \pm 11

^a Cada valor representa el promedio y la desviación estándar de cuatro experimentos independientes llevados a cabo en días diferentes. ^b Determinaciones no realizadas por quedar la concentración teórica en ensayo por debajo del LOD.

En cuanto a los resultados obtenidos de los estudios de recuperación llevados a cabo con los ensayos propuestos para TF, éstos se muestran en la **Tabla 3.8.2**.

Los primeros experimentos de fortificación con los inmunoensayos seleccionados para la detección de TF fueron infructuosos, obteniéndose valores de recuperación muy bajos, incluso en fortificaciones en tampón que se incluyeron como control. Estos resultados nos hicieron sospechar que quizás TF podría tener problemas de adsorción sobre alguna de las superficies de los materiales empleados en los ensayos ELISA.

Es bien sabido que la presencia de grupos fluorados en las moléculas puede producir un incremento de su lipofilia (Arnone *et al.*, 1998), reduciendo su solubilidad en agua y la consiguiente capacidad de adsorción a materiales hidrofóbicos, como algunos plásticos. De hecho, trifloxystrobin, que presenta en su estructura el grupo trifluorometilo (uno de los sustituyentes más lipofílicos que se conocen; Baran, 1992), es la estrobilurina con menor solubilidad en agua (0.61 mg/L). Además, existen numerosas evidencias de que otros plaguicidas liposolubles se adsorben a diferentes superficies de plástico (Pekas, 1972; Sharom y Solomon, 1981; Vuik *et al.*, 1990; Hill *et al.*, 1994; Nerín *et al.*, 1996; Maclús *et al.*, 1996; Rice *et al.*, 2001). A la vista de estas evidencias y para evitar problemas de adsorción, las curvas patrón de los analitos (KM o TF) siempre se prepararon en tubos de vidrio. Sin embargo, observamos con sorpresa que TF parecía tener una cierta avidez hacia el vidrio (hidrofílico), quedándose retenido e imposibilitando por lo tanto su correcta cuantificación. Tras una serie de experimentos utilizando diferentes tamaños de tubos de vidrio pyrex y distintos volúmenes de tampón, se corroboró no sólo que TF se quedaba adherido al mismo, sino que además a mayor superficie de contacto se producía una mayor adsorción. En la **Figura 3.37** se muestra un ejemplo con el ensayo indirecto basado en el mAb TF0#17 de los experimentos llevados a cabo para determinar el grado de adsorción de TF al vidrio.

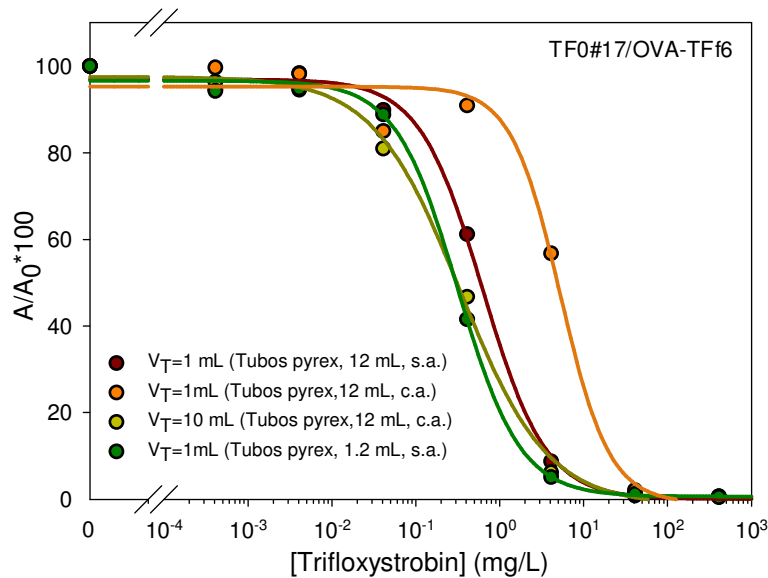


Figura 3.37. Adsorción de TF al vidrio en función del tamaño de los tubos utilizados, del volumen de tampón y de la agitación (sin agitación (s.a.); agitación con vortex o por inversión (c.a.)). La señal ha sido normalizada frente al valor de absorbancia obtenido en ausencia de analito en tampón de ensayo.

Este tipo de comportamiento ya había sido observado anteriormente en herbicidas como la trifluralina (Strachan y Hess, 1982) o el paraquat y el diquat (Takino *et al.*, 2000; Muhamad *et al.*, 2011), así como con algunos insecticidas piretroides (Sharom y Solomon, 1981; Lee *et al.*, 2002b; Wheelock *et al.*, 2005) e incluso en fármacos como el taxol, cuya solubilidad en agua es de 0.3 mg/L (Song *et al.*, 1996). Algunos autores (Strachan y Hess, 1982) han sugerido que este comportamiento puede deberse a la capacidad de los anillos aromáticos para formar complejos π con los metales de transición de la superficie del vidrio a través de interacciones electrónicas y electrostáticas (Cotton y Wilkinson, 1972). Pensamos que la posible explicación a por qué el altamente hidrofóbico TF es capaz de adherirse en soluciones acuosas a este tipo de materiales podría estar basada en este mismo tipo de interacciones.

Tabla 3.8.2. Valores de recuperación (%) para las muestras fortificadas con trifloxystrobin y determinadas por ELISA^a

Muestra	[TF] (µg/kg)	cd-ELISA TF0#17			ci-ELISA TF0#17			ci-ELISA TFt6#316		
		Factor de dilución			Factor de dilución			Factor de dilución		
		1/100	1/300	1/1000	1/100	1/300	1/1000	1/100	1/300	1/1000
Tomate	10	106 ± 19	^b		97 ± 5			167 ± 38		
	30	104 ± 13	112 ± 20		106 ± 17	137 ± 30		109 ± 21	122 ± 2	
	50	109 ± 14	111 ± 21		101 ± 17	116 ± 13		109 ± 15	116 ± 8	
	100	96 ± 7	111 ± 11	109 ± 20	105 ± 16	107 ± 14	114 ± 21	101 ± 10	117 ± 11	108 ± 6
	300	97 ± 9	107 ± 14	100 ± 12	97 ± 9	99 ± 4	100 ± 10	94 ± 19	109 ± 14	113 ± 16
	500	94 ± 12	92 ± 5	100 ± 16	94 ± 11	93 ± 6	103 ± 11	100 ± 15	112 ± 16	115 ± 16
Pepino	10	108 ± 14			116 ± 8			245 ± 38		
	30	98 ± 17	138 ± 40		110 ± 11	119 ± 17		153 ± 18	209 ± 10	
	50	109 ± 19	147 ± 35		109 ± 9	113 ± 12		124 ± 14	155 ± 8	
	100	112 ± 11	114 ± 8	133 ± 13	103 ± 14	112 ± 16	115 ± 12	112 ± 10	122 ± 4	147 ± 41
	300	98 ± 5	111 ± 5	102 ± 11	104 ± 20	109 ± 9	106 ± 14	109 ± 9	112 ± 4	118 ± 14
	500	92 ± 17	100 ± 11	102 ± 13	109 ± 6	110 ± 11	107 ± 9	100 ± 8	111 ± 6	117 ± 15
Fresa	10	86 ± 15			113 ± 2			93 ± 4		
	30	109 ± 19	92 ± 6		108 ± 8	121 ± 14		104 ± 6	103 ± 23	
	50	95 ± 3	99 ± 9		103 ± 5	100 ± 10		96 ± 3	106 ± 19	
	100	92 ± 12	97 ± 11	85 ± 3	102 ± 14	102 ± 9	111 ± 3	102 ± 5	98 ± 17	106 ± 2
	300	91 ± 6	103 ± 2	92 ± 19	102 ± 17	101 ± 5	95 ± 3	98 ± 12	98 ± 13	100 ± 14
	500	86 ± 10	91 ± 6	107 ± 12	93 ± 14	88 ± 6	87 ± 7	101 ± 19	100 ± 18	104 ± 12

^a Cada valor representa el promedio y la desviación estándar de cuatro experimentos independientes llevados a cabo en días diferentes. ^b Determinaciones no realizadas por quedar la concentración teórica en ensayo por debajo del LOD.

Para minimizar el problema de adsorción se decidió realizar la curva patrón en un disolvente orgánico, en el cual el fungicida muestra una solubilidad mayor que en agua, concretamente acetonitrilo, y luego realizar una dilución 1/100 de cada punto de la curva en tampón de ensayo. De esta forma, las muestras a la dilución más baja estarían en las mismas condiciones que la curva de analito. Además, se utilizaron siempre tubos de vidrio del tamaño adecuado en función del volumen a preparar. Después de poner en práctica esta aproximación se consiguió cuantificar adecuadamente trifloxystrobin a diferentes concentraciones en las distintas matrices.

Como se puede observar en la **Tabla 3.8.2**, los ensayos desarrollados con el mAb TF0#17 fueron capaces de cuantificar los diferentes niveles de fortificación con exactitud y precisión adecuadas. En el caso del ensayo indirecto basado en el mAb TF6#316 también se cuantificó adecuadamente las muestras fortificadas a todos los niveles de concentración en fresa, mientras que no fue posible medir con exactitud concentraciones por debajo 30 µg/kg, en las muestras de tomate ni por debajo de 50 µg/kg en la matriz de pepino.

En vista de los resultados obtenidos, se puede concluir que la exactitud en la determinación de KM y TF en todas las matrices analizadas resultó satisfactoria para los seis ensayos a lo largo de un amplio rango de concentraciones de fortificación. Respecto a la precisión de los inmunoensayos, se obtuvieron valores de desviación estándar relativa inferiores al 20% en casi todos los casos, demostrándose así la repetibilidad de los métodos desarrollados.

Finalmente, el límite de cuantificación (LOQ) se estableció como la mínima concentración ensayada de KM o TF que proporcionó un valor de recuperación comprendido entre el 80 y el 120%. Así, el LOQ resultante para KM y TF fue de 10 µg/kg para todos los ensayos en todas las matrices, a excepción del inmunoensayo indirecto con el mAb TF6#316 en tomate y en pepino para el cual el LOQ se estableció en 30 y 50 µg/kg, respectivamente.

3.8.4. Análisis de muestras de campo

Si bien los estudios descritos hasta ahora (efectos matriz y recuperaciones) dan una idea de la validez de los ensayos, la verdadera “prueba de fuego” es aplicarlos a muestras de campo de concentración desconocida y comparar los resultados con los obtenidos mediante un método ampliamente aceptado. En este sentido, se pudo tener acceso a cultivos de tomates, pepinos y fresas en producción. Las tres matrices vegetales fueron tratadas con KM, mientras que con TF solamente se pudieron tratar cultivos de tomates y pepinos. En todos los casos se emplearon las dosis recomendadas por el fabricante, recogiendo posteriormente los frutos a diferentes tiempos con el objetivo de disponer de muestras con distintos niveles de ambos fungicidas.

Tras la aplicación de KM, el plazo de seguridad para la recogida de tomates y pepinos es de 3 días, mientras que para fresas es de 7 días. En el caso de TF, el plazo de seguridad entre el último tratamiento y la recolección es de sólo 1 día para fresas y tomates, y de 3 días para pepinos.

Los cultivos de tomates y pepinos recibieron un solo tratamiento (T1) aplicando independientemente KM (Stroby) y TF (Flint) en diferentes sectores de los campos, y recogiendo las muestras en distintos días (D1, D3, D6, D10 y D15). En cuanto a las fresas, debido principalmente a que el periodo productivo es más largo, fue posible llevar cabo tres tratamientos diferentes. En el primer tratamiento (T1), simulando una práctica normal, se aplicó Stroby y se recogieron muestras los días D1, D4 y D8. En el segundo tratamiento (T2), intentando simular una mala práctica agrícola, se aplicó KM al doble de la concentración recomendada, y se recogieron muestras en distintos días (D1, D2, D4, D8 y D16). Por último, en el tercer tratamiento (T3) se trataron las fresas a la concentración recomendada y todas las muestras se recogieron al día siguiente, almacenándose en frío (4 °C) simulando así la conservación típica doméstica. Dichas muestras se sacaron del refrigerador en distintos días para su análisis (D1, D2, D4, D6, D8 y D10). En todos los tratamientos, tanto de los tomates y pepinos como en las fresas, se dejaron muestras sin tratar como control y se recogieron en las mismas condiciones. Una vez obtenidas las muestras de tomates, pepinos y fresas tratadas, se trituraron y

homogeneizaron para su posterior análisis. La comparación con GC–MS se llevó a cabo con todos los ensayos propuestos para la detección de KM y TF.

3.8.4.1. Estudio comparativo con GC–MS

El objetivo principal de esta parte del trabajo es el de llegar a desarrollar un método inmunoquímico que, midiendo de forma equivalente a un método de referencia, pueda aportar ventajas en cuanto a rapidez, coste, sencillez, portabilidad y capacidad de muestreo.

En total se analizaron 24 muestras con KM (5 de tomate, 5 de pepino y 14 de fresa) y 10 muestras con TF (5 de tomate y 5 de pepino). En una primera aproximación todas las muestras se procesaron según el método QuEChERS y el extracto final se analizó en paralelo por GC–MS y por los distintos ELISAs, comparándose los resultados obtenidos por ambos métodos. En la **Tabla 3.8.3** y en la **Tabla 3.8.4** se muestran los resultados obtenidos con los ensayos seleccionados para la detección de KM y TF, respectivamente. Para asegurar que todas las muestras entraban dentro del rango de medida de los ensayos, cada una de ellas se midió simultáneamente empleando tres diluciones, 1/100, 1/300 y 1/1000, y se seleccionó la más adecuada en cada caso.

Como se puede apreciar en las tablas anteriormente mencionadas, los niveles de KM y TF encontrados en las distintas matrices con cada método (GC–MS y ELISAs) son prácticamente equivalentes y claramente indican que ambos plaguicidas se disipan adecuadamente con el tiempo en condiciones de campo. En este sentido, como era de esperar, se observa que todas las muestras tratadas según los procedimientos recomendados (T1) y recogidas en el plazo de seguridad presentan concentraciones de KM y TF por debajo de los LMR.

Tabla 3.8.3. Análisis por GC–MS y ELISA de los extractos QuEChERS para KM^a

Muestra	Trat. ^b	Concentración de Kresoxim–methyl (mg/kg ± s)			
		GC–MS	ci–KMo6#117	cd–KMo6#117	cd–KMb6#32
Tomate	T1D1	0.061 ± 0.009	0.065 ± 0.007	0.069 ± 0.004	0.069 ± 0.004
	T1D3	0.056 ± 0.008	0.041 ± 0.006	0.043 ± 0.001	0.041 ± 0.003
	T1D6	0.032 ± 0.005	0.024 ± 0.001	0.020 ± 0.003	0.025 ± 0.004
	T1D10	0.015 ± 0.002	0.012 ± 0.002	0.012 ± 0.001	0.013 ± 0.001
	T1D15	< LOQ	< LOQ	< LOQ	0.015 ± 0.002
Pepino	T1D1	0.109 ± 0.016	0.041 ± 0.003	0.049 ± 0.001	0.048 ± 0.003
	T1D3	0.039 ± 0.006	0.025 ± 0.005	0.027 ± 0.003	0.027 ± 0.002
	T1D6	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
	T1D10	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
	T1D15	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
Fresa	T1D1	0.60 ± 0.09	0.57 ± 0.06	0.61 ± 0.10	0.55 ± 0.06
	T1D4	0.21 ± 0.03	0.25 ± 0.02	0.28 ± 0.05	0.25 ± 0.01
	T1D8	0.49 ± 0.07	0.47 ± 0.03	0.52 ± 0.07	0.49 ± 0.04
	T2D1	1.79 ± 0.27	1.80 ± 0.13	1.95 ± 0.21	1.84 ± 0.06
	T2D2	2.16 ± 0.32	2.13 ± 0.17	2.26 ± 0.31	2.04 ± 0.29
	T2D4	1.62 ± 0.24	1.54 ± 0.06	1.65 ± 0.14	1.35 ± 0.10
	T2D8	1.72 ± 0.26	1.56 ± 0.11	1.65 ± 0.12	1.43 ± 0.13
	T2D16	0.71 ± 0.11	0.67 ± 0.04	0.77 ± 0.10	0.66 ± 0.07
	T3D1	2.00 ± 0.30	2.33 ± 0.15	2.21 ± 0.14	1.84 ± 0.29
	T3D2	2.96 ± 0.44	3.04 ± 0.31	2.89 ± 0.47	2.49 ± 0.16
	T3D4	0.84 ± 0.13	0.97 ± 0.06	0.86 ± 0.11	0.81 ± 0.06
	T3D6	1.46 ± 0.22	1.41 ± 0.10	1.20 ± 0.16	1.14 ± 0.15
	T3D8	1.84 ± 0.28	2.17 ± 0.07	2.02 ± 0.16	1.94 ± 0.31
	T3D10	1.15 ± 0.17	1.34 ± 0.09	1.17 ± 0.13	1.00 ± 0.09

^a Los valores obtenidos por GC–MS corresponden con la media de dos experimentos independientes. Los valores obtenidos en ELISA son la media de tres experimentos independientes ^b T= Tratamiento, D = Día de recogida. El LMR actual establecido por la Unión Europea para KM en tomate, pepino y fresas es de 0.5, 0.05 y 1.0 mg/kg, respectivamente.

Tabla 3.8.4. Análisis por GC-MS y ELISA de los extractos QuEChERS para TF^a

Muestra	Trat. ^b	Concentración de Trifloxystrobin (mg/kg \pm s)			
		GC-MS	cd-TF0#17	ci-TF0#17	ci-TFt6#316
Tomate	T1D1	0.116 \pm 0.017	0.156 \pm 0.016	0.148 \pm 0.014	0.181 \pm 0.015
	T1D3	0.072 \pm 0.011	0.091 \pm 0.011	0.106 \pm 0.011	0.116 \pm 0.009
	T1D6	0.081 \pm 0.012	0.098 \pm 0.009	0.116 \pm 0.014	0.149 \pm 0.027
	T1D10	0.119 \pm 0.017	0.119 \pm 0.013	0.138 \pm 0.019	0.155 \pm 0.025
	T1D15	0.062 \pm 0.009	0.039 \pm 0.004	0.057 \pm 0.004	0.073 \pm 0.011
Pepino	T1D1	0.136 \pm 0.020	0.107 \pm 0.009	0.108 \pm 0.013	0.176 \pm 0.011
	T1D3	0.115 \pm 0.017	0.091 \pm 0.002	0.086 \pm 0.011	0.126 \pm 0.008
	T1D6	< LOQ	0.031 \pm 0.002	0.036 \pm 0.006	0.058 \pm 0.008
	T1D10	< LOQ	< LOQ	0.011 \pm 0.002	< LOQ
	T1D15	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ

^a Los valores obtenidos por GC-MS corresponden con la media de dos experimentos independientes. Los valores obtenidos en ELISA son la media de tres experimentos independientes. ^b T= Tratamiento, D= Día de recogida. El LMR actual establecido por la Unión Europea para TF en tomate y pepino es de 0.5 y 0.2 mg/kg, respectivamente.

En el caso particular de KM y las muestras de fresas, para las cuales se llevaron a cabo dos tratamientos adicionales (T2 y T3), se observa que las muestras tratadas al doble de concentración (T2) presentan concentraciones de KM realmente elevadas, del orden del doble del LMR o incluso más. Solamente para las muestras recogidas a los 16 días (T2D16) la concentración se encuentra ligeramente por debajo del LMR (0.71 mg/kg). Esto demuestra que si no se respetan las normas de aplicación y las buenas prácticas agrícolas, la disipación del plaguicida a niveles aceptables puede tardar varias semanas. Por último, todas las muestras procedentes del tratamiento 3 (T3) mostraron concentraciones de KM similares y superiores a la normativa vigente. Estos resultados revelan que bajo condiciones de almacenamiento doméstico los niveles de KM son equivalentes a los de la muestra en campo, confirmándose, por lo tanto, que la refrigeración interrumpe el proceso de disipación o degradación del plaguicida.

En vista de las bajas concentraciones encontradas en las muestras de pepino y tomate tratadas con KM y TF, en principio esperables debido a la baja relación superficie/volumen que presentan estos frutos en comparación con las fresas, y con el objetivo último de disponer de un número estadísticamente significativo de muestras para poder comparar correctamente los resultados

obtenidos por los ELISAs seleccionados para cada fungicida con los de GC-MS, se decidió fortificar muestras control (no tratadas). También para TF se decidió fortificar muestras control de fresas ya que no se disponía de muestras de campo de esta matriz. En total se fortificaron ocho muestras de tomate y pepino independientemente con KM y TF, y dieciséis muestras de fresa con TF. Las diferentes fortificaciones fueron llevadas a cabo por una persona ajena al analista, sin que éste tuviese conocimiento alguno de la cantidad de fungicida añadida a cada muestra. Las muestras ciegas fueron analizadas tanto por GC-MS como por ELISA y los resultados obtenidos se muestran en la **Tabla 3.8.5** (resultados para los ensayos de KM) y en la **Tabla 3.8.6** (resultados para los ensayos de TF).

Tabla 3.8.5. Análisis por GC-MS y ELISA de los extractos QuEChERS de muestras ciegas fortificadas para KM^a

Muestra	Nº	Concentración de Kresoxim-methyl (mg/kg \pm s)			
		GC-MS	ci-KMo6#117	cd-KMo6#117	cd-KMb6#32
Tomate	M#1	0.44 \pm 0.07	0.62 \pm 0.13	0.60 \pm 0.05	0.60 \pm 0.07
	M#2	0.17 \pm 0.03	0.19 \pm 0.01	0.20 \pm 0.01	0.21 \pm 0.02
	M#3	1.51 \pm 0.23	1.58 \pm 0.08	1.95 \pm 0.13	1.87 \pm 0.11
	M#4	0.63 \pm 0.09	0.79 \pm 0.09	0.87 \pm 0.10	0.76 \pm 0.04
	M#5	0.92 \pm 0.14	1.14 \pm 0.08	1.22 \pm 0.19	1.09 \pm 0.07
	M#6	0.37 \pm 0.06	0.36 \pm 0.01	0.41 \pm 0.03	0.38 \pm 0.02
	M#7	1.20 \pm 0.18	1.34 \pm 0.06	1.44 \pm 0.17	1.48 \pm 0.04
	M#8	0.78 \pm 0.12	0.87 \pm 0.01	0.87 \pm 0.06	0.88 \pm 0.06
Pepino	M#1	0.48 \pm 0.07	0.50 \pm 0.07	0.46 \pm 0.03	0.51 \pm 0.07
	M#2	1.38 \pm 0.21	1.92 \pm 0.32	1.65 \pm 0.01	1.73 \pm 0.23
	M#3	0.27 \pm 0.04	0.24 \pm 0.03	0.26 \pm 0.03	0.28 \pm 0.04
	M#4	1.07 \pm 0.16	1.46 \pm 0.18	1.31 \pm 0.18	1.31 \pm 0.09
	M#5	0.67 \pm 0.10	0.81 \pm 0.07	0.87 \pm 0.13	0.81 \pm 0.06
	M#6	0.77 \pm 0.12	0.92 \pm 0.10	0.91 \pm 0.07	0.90 \pm 0.07
	M#7	0.90 \pm 0.14	1.11 \pm 0.14	1.02 \pm 0.05	1.00 \pm 0.06
	M#8	0.93 \pm 0.14	1.28 \pm 0.22	1.15 \pm 0.12	1.13 \pm 0.08

^a Los valores obtenidos por GC-MS corresponden con la media de dos experimentos independientes. Los valores obtenidos en ELISA son la media de tres experimentos independientes.

Tabla 3.8.6. Análisis por GC-MS y ELISA de los extractos QuEChERS de muestras ciegas fortificadas para TF^a

Muestra	N°	Concentración de Trifloxystrobin (mg/kg ± s)			
		GC-MS	cd-TF0#17	ci-TF0#17	ci-TFt6#316
Tomate	M#1	0.62 ± 0.09	0.67 ± 0.06	0.66 ± 0.07	0.61 ± 0.01
	M#2	0.27 ± 0.04	0.26 ± 0.03	0.28 ± 0.03	0.23 ± 0.05
	M#3	1.89 ± 0.28	2.24 ± 0.30	2.11 ± 0.13	2.17 ± 0.14
	M#4	0.83 ± 0.12	1.07 ± 0.13	0.99 ± 0.13	0.97 ± 0.10
	M#5	1.10 ± 0.16	1.29 ± 0.11	1.23 ± 0.07	1.35 ± 0.10
	M#6	0.40 ± 0.06	0.42 ± 0.05	0.51 ± 0.06	0.40 ± 0.05
	M#7	1.34 ± 0.20	1.56 ± 0.03	1.22 ± 0.23	1.55 ± 0.31
	M#8	0.88 ± 0.13	0.98 ± 0.08	0.86 ± 0.23	0.93 ± 0.15
Pepino	M#1	0.54 ± 0.08	0.53 ± 0.06	0.55 ± 0.02	0.68 ± 0.02
	M#2	1.92 ± 0.29	2.07 ± 0.16	2.02 ± 0.31	2.15 ± 0.34
	M#3	0.31 ± 0.05	0.31 ± 0.04	0.29 ± 0.02	0.34 ± 0.03
	M#4	1.63 ± 0.24	1.68 ± 0.28	1.62 ± 0.09	1.77 ± 0.39
	M#5	1.04 ± 0.13	1.06 ± 0.25	0.93 ± 0.07	1.05 ± 0.15
	M#6	1.18 ± 0.18	1.09 ± 0.05	1.00 ± 0.04	1.16 ± 0.20
	M#7	1.41 ± 0.21	1.25 ± 0.08	1.11 ± 0.01	1.40 ± 0.25
	M#8	1.24 ± 0.18	1.33 ± 0.12	1.29 ± 0.21	1.26 ± 0.20
Fresa	M#1	0.38 ± 0.05	0.32 ± 0.03	0.36 ± 0.07	0.41 ± 0.03
	M#2	0.91 ± 0.13	0.86 ± 0.15	0.96 ± 0.14	0.93 ± 0.16
	M#3	0.56 ± 0.08	0.51 ± 0.02	0.49 ± 0.07	0.46 ± 0.03
	M#4	1.08 ± 0.16	1.26 ± 0.21	1.26 ± 0.01	1.19 ± 0.10
	M#5	0.66 ± 0.09	0.69 ± 0.13	0.74 ± 0.14	0.70 ± 0.05
	M#6	0.14 ± 0.02	0.06 ± 0.01	0.10 ± 0.01	0.10 ± 0.02
	M#7	0.94 ± 0.14	1.11 ± 0.19	1.17 ± 0.16	1.05 ± 0.11
	M#8	1.43 ± 0.21	1.53 ± 0.11	1.73 ± 0.35	1.72 ± 0.19
	M#9	0.16 ± 0.02	0.10 ± 0.02	0.16 ± 0.01	0.14 ± 0.03
	M#10	1.71 ± 0.25	1.77 ± 0.03	1.65 ± 0.31	1.81 ± 0.18
	M#11	1.12 ± 0.16	1.18 ± 0.16	0.97 ± 0.02	1.09 ± 0.02
	M#12	0.12 ± 0.02	0.12 ± 0.01	0.06 ± 0.00	0.06 ± 0.01
	M#13	0.29 ± 0.04	0.25 ± 0.05	0.29 ± 0.00	0.27 ± 0.06
	M#14	0.30 ± 0.04	0.25 ± 0.07	0.25 ± 0.05	0.28 ± 0.07
	M#15	1.98 ± 0.30	1.96 ± 0.05	1.89 ± 0.01	2.13 ± 0.01
	M#16	1.65 ± 0.25	1.65 ± 0.13	1.84 ± 0.42	1.72 ± 0.09

^a Los valores obtenidos por GC-MS corresponden con la media de dos experimentos independientes. Los valores obtenidos en ELISA son la media de tres experimentos independientes.

Tal y como se puede observar en la **Tabla 3.8.5** y en la **Tabla 3.8.6**, también en los extractos de las muestras fortificadas se pudo cuantificar correctamente diferentes concentraciones de KM y TF, con valores muy similares a los obtenidos por GC–MS.

La exactitud de los inmunoensayos seleccionados para cada fungicida se evaluó a través de la comparación de los resultados obtenidos por ELISA y por el método de referencia (GC–MS) en las distintas muestras analizadas. Para ello se utilizó la regresión de Deming por considerarse un procedimiento más adecuado para comparar diferentes métodos que la regresión lineal ordinaria, ya que tiene en cuenta la desviación estándar obtenida para cada muestra en cada una de las metodologías que se están comparando. Estos estudios de regresión Deming se realizaron con el software SigmaPlot (versión 12.0) de Systat Software Inc. (Chicago, IL, EEUU). A partir de este momento, los resultados obtenidos para cada fungicida se discutirán de manera independiente.

Al representar los valores de concentración obtenidos por los tres ELISAs desarrollados para KM frente a los valores obtenidos por GC–MS para los mismos extractos purificados se observa una excelente correlación entre ambos métodos de medida (**Figura 3.38**, izquierda). No obstante, al realizar el estudio estadístico de las rectas de regresión obtenidas, se observa que sólo el ensayo directo basado en el mAb KMb6#32 proporciona resultados estadísticamente comparables con los proporcionados por GC–MS. Como se muestra en la **Tabla 3.8.7**, los intervalos de confianza de la ordenada en el origen y de la pendiente de la recta de regresión Deming para el ensayo cd–KMb6#32, incluyen los valores 0 y 1, respectivamente. En el caso de los ensayos indirecto y directo con el mAb KMo6#117 se obtienen pendientes significativamente distintas a la unidad (**Tabla 3.8.7**), indicando así una ligera estimación por exceso de la concentración de KM.

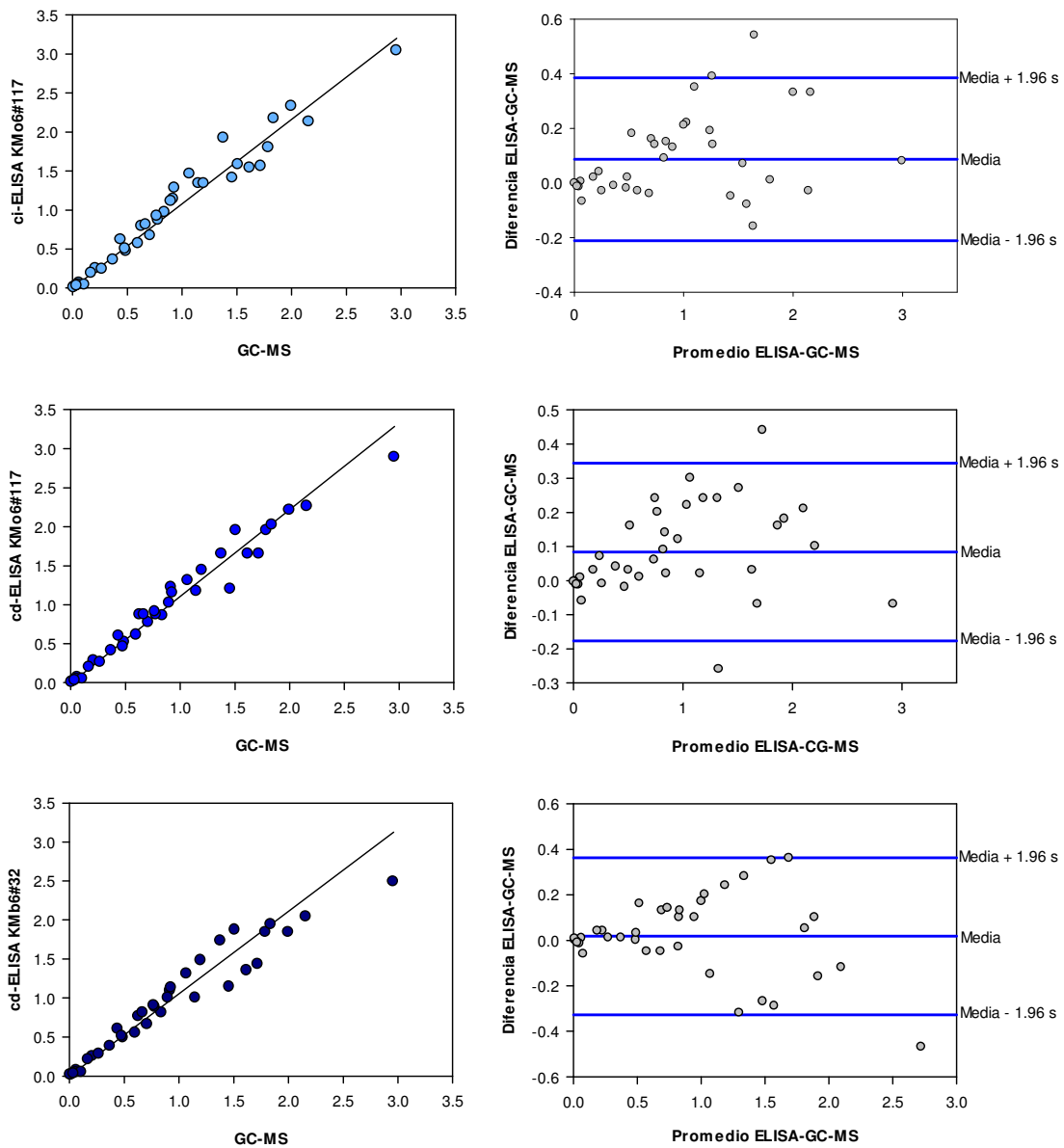


Figura 3.38. *Izquierda:* Análisis de regresión Deming entre los resultados obtenidos por ELISA y por GC-MS para los extractos QuEChERS de las muestras de campo de fresa y las muestras de campo y fortificadas de tomate y pepino. (●) **ci-ELISA mAb KM06#117**, (●) **cd-ELISA mAb KM06#117**, (●) **cd-ELISA mAb KMb6#32**. *Derecha:* Gráfico de dispersión Bland-Altman.

Tabla 3.8.7. Correlación de los resultados obtenidos del análisis de KM llevados a cabo por ELISA y GC–MS, de los extractos QuEChERS, mediante análisis de regresión Deming

Ensayo	a ^a	IC 95% (a) ^b	b ^c	IC 95% (b) ^d	r ^e	n ^f
ci–KMo6#117	–0.005	[–0.008; –0.002]	1.08	[1.01; 1.15]	0.982	37
cd–KMo6#117	–0.006	[–0.009; –0.003]	1.11	[1.04; 1.19]	0.985	37
cd–KMb6#32	0.000	[–0.005; 0.004]	1.06	[0.97; 1.14]	0.970	37

^a Ordenada en el origen. ^b Intervalo de confianza al 95% de la ordenada en el origen. ^c Pendiente de la recta. ^d Intervalo de confianza de la pendiente. ^e Coeficiente de correlación. ^f Número de muestras.

El gráfico de dispersión de Bland–Altman (**Figura 3.38**, derecha) indica que los puntos se distribuyen aleatoriamente por encima y por debajo de la recta correspondiente a la media de las diferencias entre ambos métodos, por lo que no se observan tendencias y las posibles desviaciones existentes con el método de referencia son estrictamente aleatorias.

En cuanto a TF, las rectas de regresión de Deming obtenidas por comparación de los resultados obtenidos por los tres inmunoensayos seleccionados con GC–MS se muestran en la **Figura 3.39**. En la **Tabla 3.8.8** se muestran los correspondientes coeficientes de correlación, así como los intervalos de confianza de la ordenada en el origen y de la pendiente de las rectas de regresión.

Tabla 3.8.8. Correlación de los resultados obtenidos del análisis de TF llevados a cabo por ELISA y GC–MS, de los extractos QuEChERS, mediante análisis de regresión Deming

Ensayo	a ^a	IC 95% (a) ^b	b ^c	IC 95% (b) ^d	r ^e	n ^f
cd–TF0#17	–0.018	[–0.033; –0.003]	1.07	[0.99; 1.16]	0.990	39
ci–TF0#17	–0.005	[–0.020; 0.010]	1.03	[0.94; 1.12]	0.983	39
ci–TFt6#316	0.009	[–0.009; 0.026]	1.07	[0.99; 1.16]	0.994	39

^a Ordenada en el origen. ^b Intervalo de confianza al 95% de la ordenada en el origen. ^c Pendiente de la recta de regresión Deming. ^d Intervalo de confianza de la pendiente. ^e Coeficiente de correlación. ^f Número de muestras.

Como se puede observar en la tabla adjunta, los resultados obtenidos con los tres inmunoensayos de TF también están estrechamente correlacionados

con los obtenidos con GC-MS. En este caso los inmunoensayos indirectos basados en el uso de los mAbs TF0#17 y TFt6#316 proporcionaron resultados estadísticamente comparables a GC-MS. De la misma forma, el gráfico de Bland-Altman (**Figura 3.39**, derecha) muestra que los datos obtenidos presentan una adecuada distribución, por lo que las diferencias observadas se pueden considerar aleatorias.

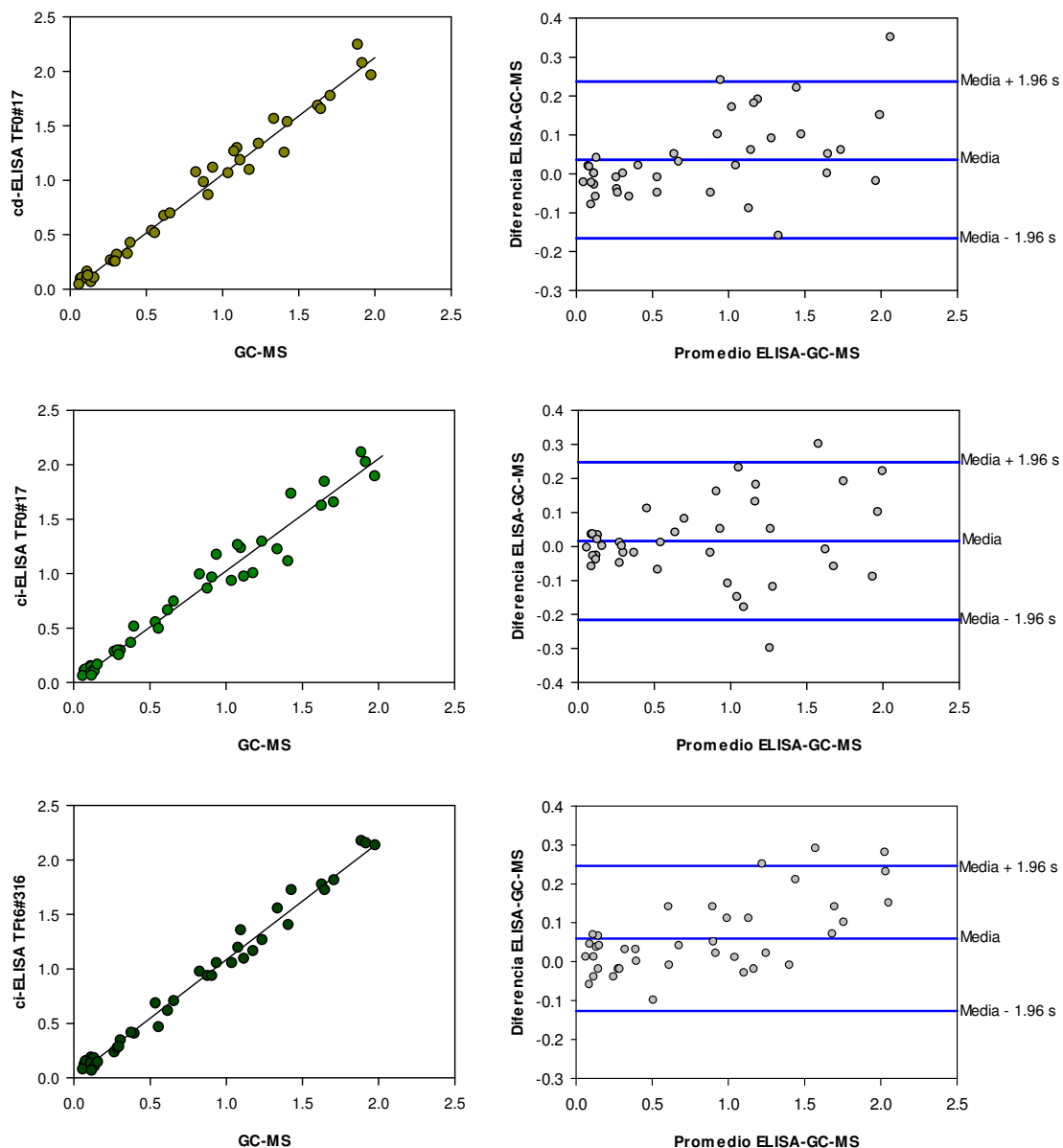


Figura 3.39. *Izquierda:* Análisis de regresión Deming entre los resultados obtenidos por ELISA y por GC-MS para los extractos QuEChERS de las muestras de campo de fresa y las muestras de campo y fortificadas de tomate y pepino. (●) **cd-ELISA mAb TF0#17**, (●) **ci-ELISA mAb TF0#17**, (●) **ci-ELISA mAb TFt6#316**. *Derecha:* Gráfico de dispersión Bland-Altman.

Unas de las posibilidades que nos ofrece el empleo de métodos ELISA, es la simplificación del tratamiento de la muestra, reduciendo tiempos de extracción, recursos, reactivos y residuos generados. Teniendo en cuenta el elevado número de muestras que se analizan al día en laboratorios de análisis rutinario de alimentos, esto supone una considerable reducción en costes. Para ello, se intentó suprimir del método QuEChERS la etapa de purificación del extracto con PSA, paso que en principio no es necesario en ELISA, debido a su elevada especificidad. Para ello, se emplearon las mismas muestras de tomate, pepino y fresa (tratadas y fortificadas), de las cuales se reservó previamente el extracto crudo en acetonitrilo sin purificar y se analizaron por los ELISAs desarrollados a tres diluciones, 1/100, 1/300 y 1/1000.

Los resultados obtenidos por los inmunoensayos seleccionados para KM y su comparación con GC-MS se muestran en las **Tablas 3.8.9** (muestras tratadas) y **3.8.10** (muestras fortificadas). En general, las concentraciones de KM medidas por los tres ensayos en los extractos crudos sin tratar con PSA también son muy similares a las medidas por GC-MS con QuEChERS. De nuevo, para determinar la equivalencia entre la cuantificación de KM por ELISA y GC-MS se empleó el análisis de regresión Deming (**Figura 3.40**).

Tabla 3.8.9. Análisis por ELISA de los extractos crudos sin tratar con PSA de muestras tratadas con KM y comparación con el análisis por GC-MS de los extractos QuEChERS^a

Muestra	Trat. ^b	Concentración de Kresoxim-methyl (mg/kg \pm s)			
		GC-MS	ci-KMo6#117	cd-KMo6#117	cd-KMb6#32
Tomate	T1D1	0.061 \pm 0.009	0.004 \pm 0.001	0.014 \pm 0.002	0.013 \pm 0.002
	T1D3	0.056 \pm 0.008	0.066 \pm 0.004	0.065 \pm 0.008	0.064 \pm 0.005
	T1D6	0.032 \pm 0.005	0.061 \pm 0.003	0.056 \pm 0.009	0.055 \pm 0.004
	T1D10	0.015 \pm 0.002	0.035 \pm 0.005	0.033 \pm 0.007	0.037 \pm 0.003
	T1D15	0.008 \pm 0.001	0.017 \pm 0.006	0.015 \pm 0.004	0.016 \pm 0.001
Pepino	T1D1	0.109 \pm 0.016	0.050 \pm 0.004	0.045 \pm 0.002	0.052 \pm 0.004
	T1D3	0.039 \pm 0.006	0.025 \pm 0.005	0.025 \pm 0.002	0.027 \pm 0.001
Fresa	T1D1	0.60 \pm 0.09	0.47 \pm 0.02	0.66 \pm 0.03	0.56 \pm 0.07
	T1D4	0.21 \pm 0.03	0.22 \pm 0.01	0.27 \pm 0.02	0.25 \pm 0.02
	T1D8	0.49 \pm 0.07	0.29 \pm 0.01	0.51 \pm 0.02	0.48 \pm 0.01
	T2D1	1.79 \pm 0.27	1.71 \pm 0.23	2.14 \pm 0.06	1.78 \pm 0.09
	T2D2	2.16 \pm 0.32	1.95 \pm 0.14	2.20 \pm 0.05	1.74 \pm 0.07
	T2D4	1.62 \pm 0.24	1.57 \pm 0.05	1.66 \pm 0.04	1.32 \pm 0.02
	T2D8	1.72 \pm 0.26	1.51 \pm 0.16	1.84 \pm 0.03	1.45 \pm 0.05
	T2D16	0.71 \pm 0.11	0.62 \pm 0.02	0.83 \pm 0.02	0.63 \pm 0.01
	T3D1	2.00 \pm 0.30	2.04 \pm 0.01	2.71 \pm 0.26	1.91 \pm 0.15
	T3D2	2.96 \pm 0.44	2.64 \pm 0.11	3.34 \pm 0.21	2.64 \pm 0.03
	T3D4	0.84 \pm 0.13	0.94 \pm 0.03	0.91 \pm 0.10	0.78 \pm 0.07
	T3D6	1.46 \pm 0.22	1.39 \pm 0.07	1.35 \pm 0.14	1.04 \pm 0.05
	T3D8	1.84 \pm 0.28	1.95 \pm 0.10	2.60 \pm 0.31	2.05 \pm 0.31
T3D10	1.15 \pm 0.17	1.22 \pm 0.03	1.32 \pm 0.04	0.96 \pm 0.05	

^a Los valores obtenidos por GC-MS corresponden con la media de dos experimentos independientes. Los valores obtenidos en ELISA son la media de tres experimentos independientes ^b T= Tratamiento, D= Día de recogida.

Tabla 3.8.10. Análisis por ELISA de los extractos crudos sin tratar con PSA de muestras ciegas fortificadas con KM y comparación con el análisis por GC-MS de los extractos QuEChERS^a

Muestra	Nº	Concentración de Kresoxim-methyl (mg/kg ± s)			
		GC-MS	ci-KMo6#117	cd-KMo6#117	cd-KMb6#32
Tomate	M#1	0.44 ± 0.07	0.90 ± 0.03	1.04 ± 0.04	0.57 ± 0.07
	M#2	0.17 ± 0.03	0.19 ± 0.01	0.20 ± 0.01	0.20 ± 0.02
	M#3	1.51 ± 0.23	2.10 ± 0.23	2.10 ± 0.17	1.85 ± 0.06
	M#4	0.63 ± 0.09	0.87 ± 0.03	0.86 ± 0.03	0.74 ± 0.07
	M#5	0.92 ± 0.14	1.25 ± 0.08	1.26 ± 0.09	1.06 ± 0.06
	M#6	0.37 ± 0.06	0.42 ± 0.03	0.43 ± 0.03	0.40 ± 0.05
	M#7	1.20 ± 0.18	1.58 ± 0.15	1.48 ± 0.12	1.35 ± 0.07
	M#8	0.78 ± 0.12	1.08 ± 0.07	0.98 ± 0.08	0.85 ± 0.08
Pepino	M#1	0.48 ± 0.07	0.52 ± 0.03	0.48 ± 0.08	0.46 ± 0.05
	M#2	1.38 ± 0.21	1.83 ± 0.13	1.57 ± 0.16	1.68 ± 0.12
	M#3	0.27 ± 0.04	0.27 ± 0.04	0.24 ± 0.01	0.25 ± 0.03
	M#4	1.07 ± 0.16	1.48 ± 0.16	1.32 ± 0.07	1.29 ± 0.03
	M#5	0.67 ± 0.10	0.85 ± 0.08	0.78 ± 0.05	0.74 ± 0.05
	M#6	0.77 ± 0.12	0.98 ± 0.02	0.88 ± 0.07	0.83 ± 0.06
	M#7	0.90 ± 0.14	1.21 ± 0.11	0.95 ± 0.09	0.99 ± 0.06
	M#8	0.93 ± 0.14	1.16 ± 0.26	1.07 ± 0.14	1.04 ± 0.06

^a Los valores obtenidos por GC-MS corresponden con la media de dos experimentos independientes. Los valores obtenidos en ELISA son la media de tres experimentos independientes.

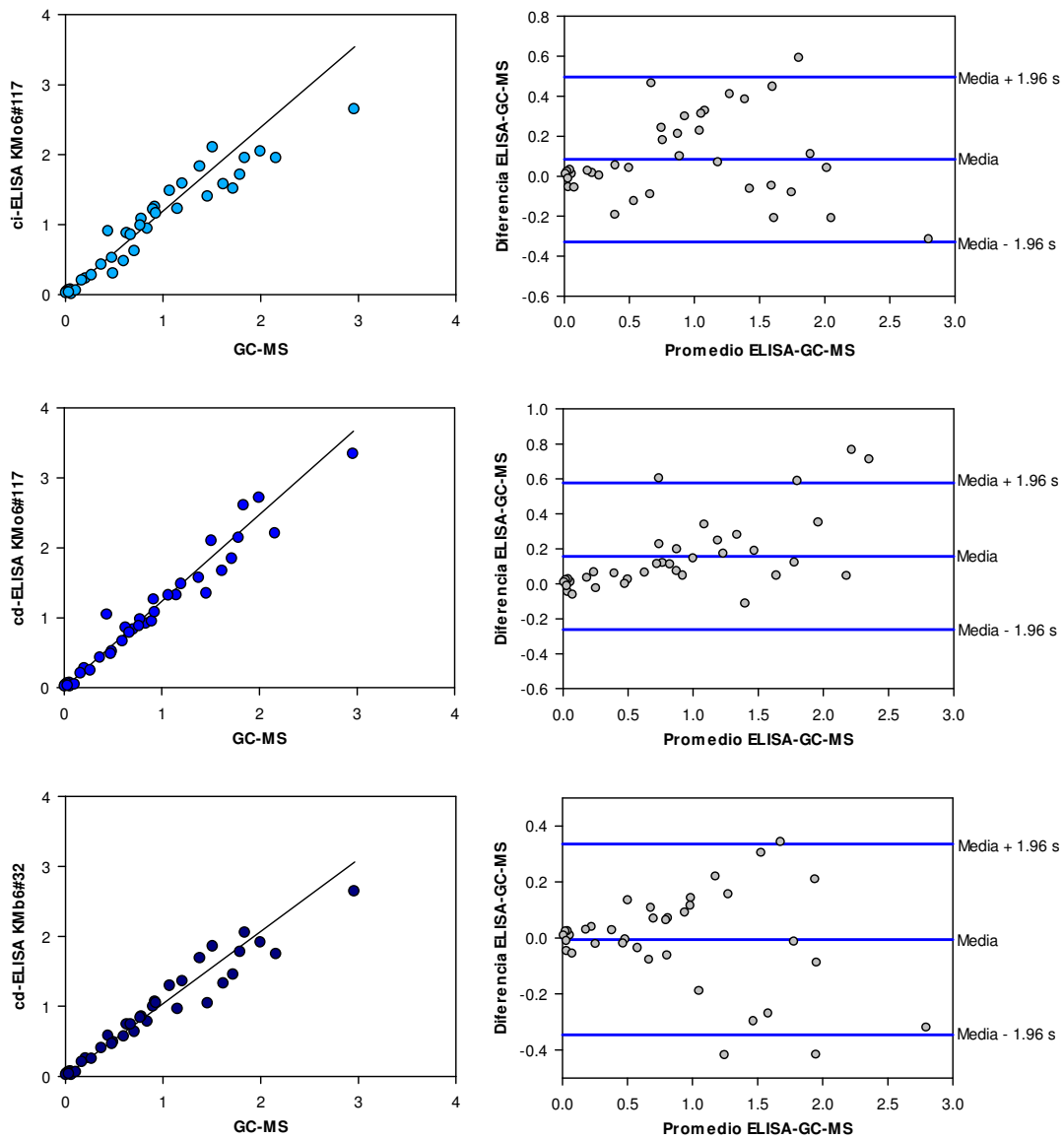


Figura 3.40. *Izquierda:* Análisis de regresión Deming entre los resultados obtenidos por ELISA de los extractos crudos sin tratar con PSA y por GC-MS de los extractos QuEChERS. (●) **ci-ELISA mAb KMo6#117**, (●) **cd-ELISA mAb KMo6#117**, (●) **cd-ELISA mAb KMb6#32**. *Derecha:* Gráfico de dispersión Bland-Altman.

El análisis de regresión Deming entre la concentración de KM encontrada por ELISA en los extractos crudos sin tratar con PSA y la determinada por GC-MS de los extractos purificados presenta una adecuada reciprocidad. En base a los intervalos de confianza del 95% obtenidos para la ordenada en el origen y la pendiente de las rectas de regresión (**Tabla 3.8.11**), de nuevo solamente el ensayo directo con el mAb KMb6#32 es estadísticamente comparable a GC-MS. Igualmente, los otros dos ensayos mostraron una ligera

sobreestimación (aproximadamente del 20%) de la concentración de KM (más acusada en los extractos crudos que en los extractos QuEChERS), tal y como se puede apreciar también en los valores de las **Tablas 3.8.9 y 3.8.10**.

Tabla 3.8.11. Correlación de los resultados obtenidos del análisis de KM llevados a cabo por ELISA de los extractos crudos sin tratar con PSA y GC-MS de los extractos QuEChERS mediante análisis de regresión Deming

Ensayo	a ^a	IC 95% (a) ^b	b ^c	IC 95% (b) ^d	r ^e	n ^f
ci-KMo6#117	0.001	[-0.004; 0.008]	1.20	[1.12; 1.28]	0.956	37
cd-KMo6#117	-0.005	[-0.011; -0.002]	1.24	[1.16; 1.32]	0.978	37
cd-KMb6#32	-0.007	[-0.005; 0.010]	1.03	[0.97; 1.10]	0.971	37

^a Ordenada en el origen. ^b Intervalo de confianza al 95% de la ordenada en el origen. ^c Pendiente de la recta de regresión Deming. ^d Intervalo de confianza de la pendiente. ^e Coeficiente de correlación. ^f Número de muestras.

En cuanto a TF, en la **Tabla 3.8.12** se recogen los valores de concentración encontrados mediante análisis de los extractos crudos sin tratar con PSA con los tres inmunoensayos, de nuevo comparados con los valores proporcionados por GC-MS. En la **Figura 3.41** se representan las rectas de regresión de Deming y en la **Tabla 3.8.13** se muestran los correspondientes coeficientes de correlación, así como los intervalos de confianza de la ordenada en el origen y de la pendiente de las rectas obtenidas.

Tabla 3.8.12. Análisis por ELISA de los extractos crudos de muestras tratadas y fortificadas con TF y comparación con el análisis por GC-MS de los extractos QuEChERS^a

Muestra	Trat. ^b	Concentración de Trifloxystrobin (mg/kg ± s)			
		GC-MS	cd-TF0#17	ci-TF0#17	ci-TFt6#316
Tomate	T1D1	0.116 ± 0.017	0.177 ± 0.012	0.151 ± 0.019	0.195 ± 0.013
	T1D3	0.072 ± 0.011	0.105 ± 0.007	0.099 ± 0.005	0.110 ± 0.006
	T1D6	0.081 ± 0.012	0.126 ± 0.004	0.127 ± 0.005	0.153 ± 0.008
	T1D10	0.119 ± 0.017	0.134 ± 0.011	0.156 ± 0.013	0.183 ± 0.010
	T1D15	0.062 ± 0.009	0.061 ± 0.007	0.066 ± 0.003	0.078 ± 0.003
Pepino	T1D1	0.136 ± 0.020	0.150 ± 0.010	0.153 ± 0.006	0.151 ± 0.003
	T1D3	0.115 ± 0.017	0.112 ± 0.001	0.127 ± 0.006	0.108 ± 0.012
Tomate	M#1	0.62 ± 0.09	0.70 ± 0.01	0.61 ± 0.01	0.69 ± 0.02
	M#2	0.27 ± 0.04	0.24 ± 0.02	0.22 ± 0.01	0.25 ± 0.01
	M#3	1.89 ± 0.28	2.49 ± 0.10	2.19 ± 0.03	2.18 ± 0.25
	M#4	0.83 ± 0.12	0.92 ± 0.08	0.82 ± 0.02	0.93 ± 0.05
	M#5	1.10 ± 0.16	1.42 ± 0.15	1.36 ± 0.30	1.29 ± 0.05
	M#6	0.40 ± 0.06	0.47 ± 0.03	0.45 ± 0.01	0.47 ± 0.01
	M#7	1.34 ± 0.20	1.72 ± 0.09	1.36 ± 0.07	1.33 ± 0.07
	M#8	0.88 ± 0.13	0.99 ± 0.10	0.97 ± 0.13	1.10 ± 0.02
Pepino	M#1	0.54 ± 0.08	0.68 ± 0.12	0.66 ± 0.01	0.74 ± 0.05
	M#2	1.92 ± 0.29	2.28 ± 0.16	1.80 ± 0.08	2.03 ± 0.24
	M#3	0.31 ± 0.05	0.35 ± 0.04	0.28 ± 0.01	0.38 ± 0.01
	M#4	1.63 ± 0.24	1.92 ± 0.15	1.85 ± 0.11	1.88 ± 0.27
	M#5	1.04 ± 0.13	1.08 ± 0.12	0.93 ± 0.09	1.26 ± 0.01
	M#6	1.18 ± 0.18	1.22 ± 0.13	1.06 ± 0.12	1.48 ± 0.03
	M#7	1.41 ± 0.21	1.46 ± 0.18	1.07 ± 0.01	1.53 ± 0.21
	M#8	1.24 ± 0.18	1.41 ± 0.14	1.12 ± 0.05	1.71 ± 0.15
Fresa	M#1	0.38 ± 0.05	0.28 ± 0.05	0.26 ± 0.01	0.34 ± 0.05
	M#2	0.91 ± 0.13	0.91 ± 0.04	0.66 ± 0.07	0.68 ± 0.15
	M#3	0.56 ± 0.08	0.43 ± 0.08	0.37 ± 0.03	0.38 ± 0.07
	M#4	1.08 ± 0.16	1.26 ± 0.19	1.10 ± 0.22	0.92 ± 0.16
	M#5	0.66 ± 0.09	0.66 ± 0.06	0.68 ± 0.14	0.53 ± 0.03
	M#6	0.14 ± 0.02	0.13 ± 0.05	0.10 ± 0.01	0.08 ± 0.02
	M#7	0.94 ± 0.14	0.91 ± 0.11	1.15 ± 0.12	0.83 ± 0.16
	M#8	1.43 ± 0.21	1.48 ± 0.06	1.33 ± 0.02	1.33 ± 0.21
	M#9	0.16 ± 0.02	0.14 ± 0.03	0.12 ± 0.02	0.10 ± 0.01
	M#10	1.71 ± 0.25	1.91 ± 0.12	2.04 ± 0.21	1.87 ± 0.41
	M#11	1.12 ± 0.16	0.98 ± 0.04	0.96 ± 0.08	0.95 ± 0.12
	M#12	0.12 ± 0.02	0.02 ± 0.01	0.05 ± 0.01	0.07 ± 0.01
	M#13	0.29 ± 0.04	0.21 ± 0.02	0.24 ± 0.02	0.26 ± 0.01
	M#14	0.30 ± 0.04	0.22 ± 0.02	0.23 ± 0.02	0.25 ± 0.02
	M#15	1.98 ± 0.30	1.69 ± 0.03	2.15 ± 0.15	2.10 ± 0.10
	M#16	1.65 ± 0.25	1.60 ± 0.09	1.95 ± 0.25	1.92 ± 0.27

^a Los valores obtenidos GC-MS corresponden con la media de dos experimentos independientes. Los valores obtenidos en ELISA son la media de tres experimentos independientes. ^b T= Tratamiento, D= Día de recogida.

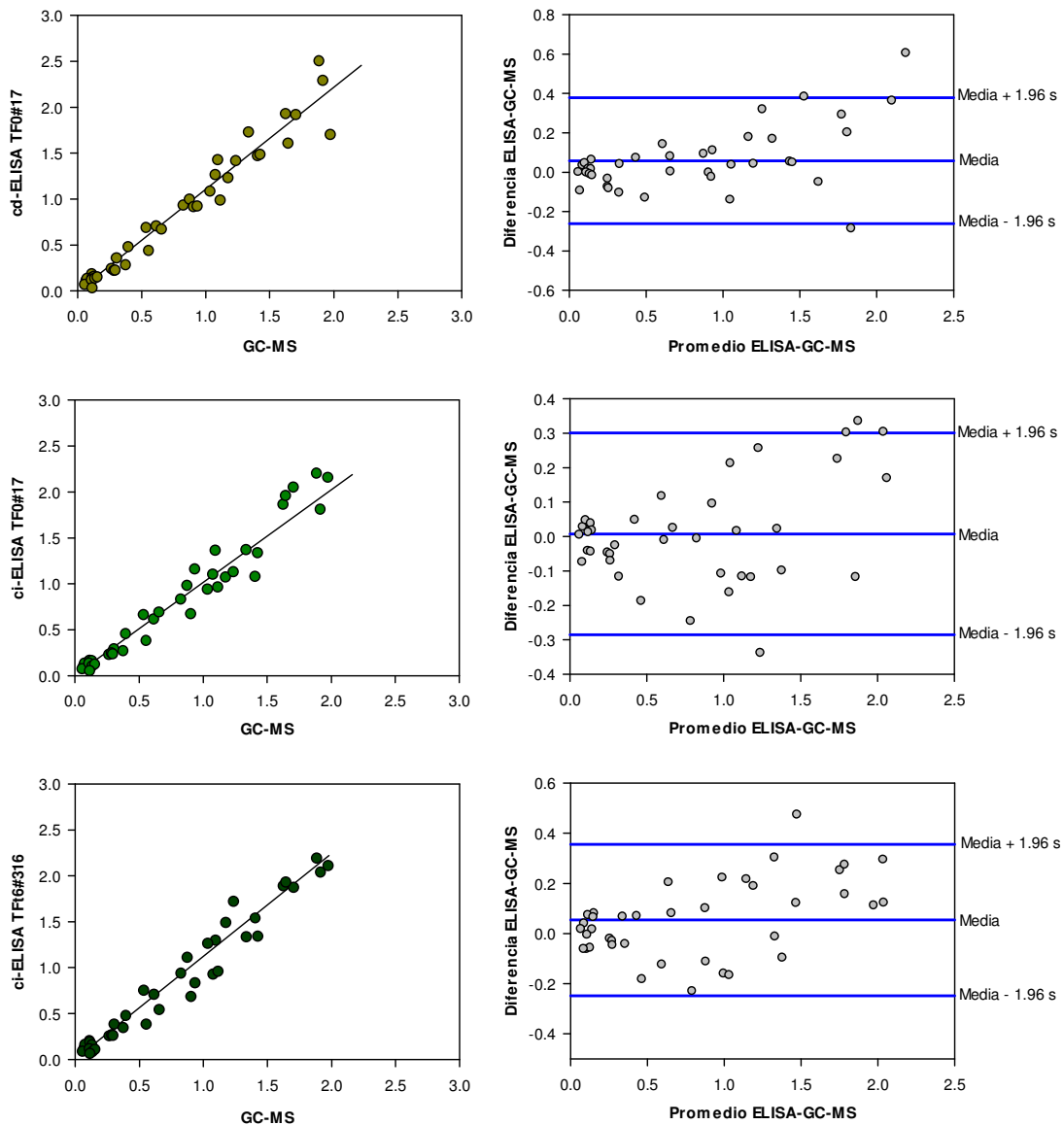


Figura 3.41. *Izquierda:* Análisis de regresión Deming entre los resultados obtenidos por ELISA de los extractos crudos sin tratar con PSA y por GC-MS de los extractos QuEChERS. (●) **cd-ELISA mAb TF0#17**, (●) **ci-ELISA mAb TF0#17**, (●) **ci-ELISA mAb TFt6#316**. *Derecha:* Gráfico de dispersión Bland-Altman.

Tal y como se puede observar en la **Figura 3.41** y corroborar en la **Tabla 3.8.13** la eliminación de la etapa de limpieza del extracto también afecta a los ensayos directo con el mAb TF0#17 e indirecto con el mAb TFt6#316, proporcionando una cuantificación por exceso de aproximadamente un 10%. Mención especial merece la elevada robustez del ensayo ci-TF0#17 que aun eliminando la etapa de purificación con PSA continúa proporcionando resultados estadísticamente comparables a GC-MS.

Tabla 3.8.13. Correlación de los resultados obtenidos del análisis de TF llevados a cabo por ELISA de los extractos crudos sin tratar con PSA y por GC-MS de los extractos purificados con PSA mediante análisis de regresión Deming

Ensayo	a ^a	IC 95% (a) ^b	b ^c	IC 95% (b) ^d	r ^e	n ^f
cd-TF0#17	-0.004	[-0.019; 0.012]	1.11	[1.02; 1.20]	0.977	39
ci-TF0#17	0.005	[-0.009; 0.019]	1.01	[0.93; 1.09]	0.976	39
ci-TFt6#316	0.006	[-0.010; 0.021]	1.12	[1.03; 1.21]	0.979	39

^a Ordenada en el origen. ^b Intervalo de confianza al 95% de la ordenada en el origen.

^c Pendiente de la recta de regresión Deming. ^d Intervalo de confianza de la pendiente. ^e Coeficiente de correlación. ^f Número de muestras.

Finalmente destacar que el ensayo directo con el mAb KMb6#32 para KM y el indirecto con el mAb TF0#17 proporcionaron resultados equivalentes a los obtenidos con el método de referencia, tanto para extractos QuEChERS como para extractos crudos sin purificar con PSA, por lo que se proponen definitivamente ambos ensayos como los más adecuados para la cuantificación exacta y precisa de kresoxim-methyl y trifloxystrobin en muestras agroalimentarias.

Para concluir, se han desarrollado, caracterizado y validado inmunoensayos tipo ELISA para la determinación de residuos de KM y TF en distintas muestras hortofrutícolas. Las principales ventajas que ofrece el empleo de ELISAs frente a métodos cromatográficos son la simplificación del tratamiento de la muestra y la reducción de tiempo de análisis. Por ejemplo un cromatograma se obtiene en 15–20 minutos aproximadamente, mientras que por ELISA se pueden medir 96 muestras en 70–130 min (según el formato de ensayo), por lo que la frecuencia de muestreo se reduce considerablemente, de 3–4 muestras/hora por cromatografía, a 44–82 muestras/hora por ELISA. Además el empleo de inmunoensayos tipo ELISA presenta otras importantes ventajas como: sensibilidad y selectividad muy elevadas, simplicidad, portabilidad del método (abre la posibilidad de medir muestras directamente en el campo), no requiere personal cualificado, etc.

4. Conclusiones

Se han desarrollado, caracterizado y validado una serie de inmunoensayos, basados en anticuerpos monoclonales, capaces de determinar la presencia de dos fungicidas de la familia de las estrobilurinas, kresoxim–methyl y trifloxystrobin, en muestras agroalimentarias con una sensibilidad varios órdenes de magnitud por debajo de los LMRs establecidos por la Unión Europea. De esta forma, queda cumplido el objetivo principal de la presente Tesis Doctoral.

Los resultados obtenidos durante el desarrollo de este trabajo permiten también establecer las siguientes conclusiones particulares:

1. Se ha sintetizado con éxito un conjunto de haptenos funcionalizados para kresoxim–methyl y trifloxystrobin que cubren diferentes posiciones de la molécula de ambos fungicidas y que además los mimetizan, ya que han sido diseñados para que el brazo espaciador que incorporan introduzca las mínimas modificaciones estereoelectrónicas en lo que constituye la estructura básica de ambos fungicidas. Además, todos los haptenos han sido preparados a través de estrategias sintéticas similares, simples y muy eficientes.

2. Con todos los inmunógenos preparados se ha conseguido obtener anticuerpos policlonales y monoclonales capaces de reconocer a cada uno de los dos fungicidas de estudio. Por una parte se ha demostrado que el uso de anticuerpos monoclonales ha permitido mejorar la afinidad en varios órdenes de magnitud, con respecto a los antisueros de conejo, y por otra parte, que la posición en la que se introduce el brazo espaciador en el hapteno inmunizante resulta crítica y de gran importancia para generar anticuerpos con elevada afinidad. En consecuencia, se ha confirmado la utilidad de disponer de diversos haptenos para la producción de anticuerpos.

3. La heterología de posición del espaciador ha resultado ser una aproximación muy efectiva para mejorar en muchas ocasiones la sensibilidad de los ensayos, aunque el grado de mejora depende tanto del tipo de inmunorreactivo como de los conjugados competidores utilizados y del formato.

4. A partir de un conjunto de análogos de kresoxim–methyl y trifloxystrobin, sintetizados exclusivamente para evaluar la especificidad de los anticuerpos monoclonales, se ha demostrado mediante la implementación de métodos de agrupación jerárquica que, al igual que ocurría con la afinidad, la selectividad también depende de la posición de funcionalización en el hapteno y ha sido posible establecer cuáles son los determinantes antigénicos más importantes en la interacción con cada anticuerpo. En este sentido, también se ha confirmado que la mayoría de anticuerpos muestran un perfil de unión al antígeno en concordancia con el principio de Landsteiner.

5. Disponer de varios anticuerpos y de diferentes ensayos ha permitido realizar un estudio objetivo sobre cuál o cuáles poseen mejores prestaciones y en consecuencia se han podido seleccionar inmunoensayos realmente útiles.

6. Los inmunoensayos finalmente propuestos y previamente optimizados han permitido la detección y cuantificación exacta y precisa de kresoxim–methyl y trifloxystrobin en muestras fortificadas. Asimismo, se ha demostrado la capacidad de estos ELISAs para determinar con exactitud ambos fungicidas en extractos crudos de muestras de tomate, pepino y fresa, proporcionando resultados estadísticamente comparables a los obtenidos con GC–MS, por lo que podrían utilizarse con el mismo fin en otros alimentos, dado que son herramientas inmunoquímicas rápidas, sencillas y fiables que permiten reducir el tiempo y el coste de los análisis.

5. Materiales y métodos

5.1 Reactivos, aparatos y técnicas generales

5.1.1. Síntesis de haptenos y análogos de KM y TF

Los puntos de fusión (Pf) se determinaron utilizando un aparato Reichter Kofler de tipo plato-caliente o un aparato de fusión Büchi y no están corregidos.

Los espectros de infrarrojo (IR) se midieron como pastilla de KBr para los compuestos sólidos y como película líquida entre placas de NaCl para los compuestos líquidos, empleando un espectrómetro Nicolet Avatar Mod. 320 FT-IR. La intensidad de los picos se define como fuerte (f), media (m) o débil (d).

Los espectros de resonancia magnética nuclear (RMN) fueron registrados a 25 °C en un espectrómetro Bruker Avance DRX-300MHz (300 MHz para ^1H y 75 MHz para ^{13}C) empleado como disolvente deuterado CDCl_3 , excepto en los casos en los que se indique lo contrario. Los desplazamientos químicos (δ) se expresan en partes por millón (ppm) relativos a tetrametilsilano y están referenciados respecto a la señal característica del disolvente empleado. El grado de sustitución sobre los átomos de carbono se estableció usando una secuencia de pulsos 135° DEPT. La asignación completa de los desplazamientos químicos de los hidrógenos y carbonos de los distintos compuestos en las secuencias sintéticas se realizó en la mayoría de los casos mediante una combinación de experimentos COSY y HSQC.

Los espectros de masas (EM) y los espectros de masas de alta resolución (EMAR) se obtuvieron empleando un espectrómetro Micromass Instruments Mod. VG Autospec. Las técnicas de ionización empleadas fueron: impacto electrónico a 70 eV (IE) o bombardeo de átomos rápidos empleando Cs^+ como fuente primaria de iones (FAB). También en algunos casos se determinaron por electrospray (ES) en un espectrómetro de masas Q-TOF premier con una fuente de electrospray (Waters, Manchester, UK). Los datos obtenidos están

expresados en unidades de relación masa/carga (m/z), y los valores entre paréntesis corresponden a las intensidades relativas de cada pico respecto del pico base (100%).

Los disolventes orgánicos se secaron y destilaron antes de su uso según las técnicas habituales (Armarego y Perrin, 1996). Éter etílico, tetrahidrofurano, dioxano, tolueno y benceno se destilaron sobre Na y benzofenona bajo atmósfera inerte justo antes de ser empleados. Diclorometano y acetonitrilo fueron destilados de CaH_2 bajo nitrógeno del mismo modo. Trietilamina y diisopropilamina se refluyeron con CaH_2 durante 2 horas, siendo entonces destiladas y almacenadas en seco. El metanol se secó y almacenó sobre tamiz molecular de 3 Å. La dimetilformamida se destiló de CaH_2 a 7 mmHg y se almacenó en congelador sobre tamiz molecular de 4 Å. El resto de disolventes se usaron sin previa purificación.

Los reactivos disponibles comerciales se emplearon sin tratamiento previo, excepto en aquellos casos en los que se menciona. Cuando se empleó el hidruro de sodio (NaH, dispersión 60% en aceite mineral), se lavó varias veces con pentano seco bajo atmósfera inerte, y se secó con una corriente de nitrógeno seco antes de emplearse. Las disoluciones de BuLi comercial utilizadas se valoraron frente al alcohol 2,5-dimetoxibencílico en tolueno a 0 °C hasta viraje de la disolución incolora a color rojo intenso (Winkle *et al.*, 1980). El isobuteno se obtuvo por destilación de una mezcla a reflujo de *tert*-butanol y ácido fosfórico concentrado y se conservó licuado sobre MgSO_4 a -20 °C (Wright *et al.*, 1997).

Las operaciones en las que estuvieron implicados reactivos sensibles al aire y/o humedad se llevaron a cabo bajo atmósfera inerte de nitrógeno o argón, empleando jeringas y/o cánulas, material de vidrio secado en estufa a 120 °C y disolventes recién destilados y secados.

La monitorización de las reacciones se llevó a cabo mediante cromatografía de capa fina empleando placas de gel de sílice Merck 60 F254 0.25 mm con indicador fluorescente. La visualización de los productos se llevó a cabo empleando luz UV de onda corta (254 nm). Generalmente también se emplearon distintos reveladores para permitir la visualización de los productos,

en concreto: disolución de molibdato cérico amónico, disolución de ácido fosfomolibdico en etanol o ácido sulfúrico acuoso al 50% (v/v) seguido de calentamiento del soporte cromatográfico con un secador industrial.

La purificación de los compuestos sintetizados se realizó por cromatografía flash en columna sobre gel de sílice Merck 60 (230–400 *mesh*), empleado como fase móvil la mezcla de disolventes que se indica en cada caso.

Mientras no se indique lo contrario, las mezclas de reacción se procesaron mediante la adición de agua o alguna determinada disolución salina y extracción con el disolvente orgánico indicado. Las fases orgánicas reunidas se lavaron con salmuera. En caso necesario se emplearon disoluciones ácidas, básicas, complejantes, reductoras y /u oxidantes para eliminar subproductos o excesos de reactivos. Los extractos obtenidos se secaron sobre Na_2SO_4 ó MgSO_4 anhidros, y posteriormente se filtraron por gravedad. El disolvente se eliminó bajo presión reducida empleando un rotavapor y finalmente se aplicó alto vacío para secar los productos, salvo en aquellos casos que eran volátiles.

Modelización molecular: la búsqueda de la conformación más estable para KM y TF se realizó usando el método de mecánica molecular MM3 disponible en el programa CAChe (CAChe Work System Pro, Version 7.5.0.85, Fujitsu Ltd: Tokyo, Japan, 2000–2006). Para determinar la conformación más estable todos los enlaces rotables se hicieron girar en pasos de 24° .

5.1.2. Preparación de conjugados proteicos

Los reactivos de activación de haptenos (NHS, DCC y DSC) se obtuvieron de Sigma–Aldrich. La seroalbúmina bovina (BSA, Fracción V) fue suministrada por Roche Applied Science. La ovoalbúmina (OVA, Grado V) y la peroxidasa de rábano picante (HRP, Tipo VI–A; actividad específica ~1000 unidades/mg) se obtuvieron de Sigma–Aldrich. Las columnas HiTrap Desalting Columns Sephadex G–25 Superfine empleadas para la purificación de los conjugados proteína–hapteno fueron adquiridas de General Electric Healthcare. Los espectros ultravioleta–visible (UV–Vis) de los conjugados se monitorizaron empleando un lector PowerWave HT de BioTek Instruments.

5.1.3. Cultivos celulares y producción de anticuerpos

Los adyuvantes incompleto y completo de Freund, el suero bovino fetal (SBF, F-7524), el medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM, alto contenido en glucosa), el tampón de lisis de eritrocitos Hybri-Max, la disolución de L-Alanina-L-Glutamina (200 mM), la disolución de aminoácidos no esenciales (100×) y el polietilenglicol (PEG 1500) fueron suministrados por Sigma-Aldrich. El suplemento de fusión y clonación para hibridomas (HFCS, 50×) se obtuvo de Roche Applied Science. La gentamicina (50 mg/mL), el suplemento HT (hipoxantina 5 mM, timidina 0.8 mM; 50×) y el suplemento HAT (hipoxantina 5 mM; aminopterina 20 μM; timidina 0.8 mM; 50×) se obtuvieron de Gibco BRL. El dimetilsulfóxido (DMSO) fue adquirido de Scharlau. La purificación de anticuerpos monoclonales se llevó a cabo en columnas HiTrap Protein G HP, obtenidas de General Electric Heathcare. En dicha purificación se empleó tampón fosfato sódico 20 mM, pH 7.4, para equilibrar y cargar la columna; tampón citrato sódico 100 mM, pH 2.5, como tampón de elución y Tris-HCl, pH 9.5, como tampón de neutralización. El isotipo de los anticuerpos se determinó con el Kit ImmunoPure Monoclonal Antibody Isotyping Kit I (HRP/ABTS), de Pierce. Las hembras de ratón BALB/c (BALB/cAnNCrl) y de conejo blanco de New Zealand [Crlc:KBL(NWZ)] fueron suministradas por Charles River Laboratories International y estabuladas en el animalario de la Universidad de Valencia. La línea celular de plasmacitoma de ratón P3-X63-Ag8.653 fue obtenida a partir de la European Collection of Cell Cultures (ECACC). Las células se mantuvieron a 37 °C en una atmósfera con un 5% de CO₂ y un 90% de humedad en un incubador ThermoElectron. Todos los materiales de plástico utilizados para cultivos celulares fueron de Corning.

5.1.4. Análisis por ELISA

Las placas Costar de poliestireno *high-binding* de 96 pocillos fueron suministradas por Corning (ref. 3590). Para lavar las placas de ELISA se utilizó un lavador automático modelo ELx405, adquirido de BioTek Instruments y para medir las absorbancias un espectrofotómetro de microplacas modelo PowerWave HT (BioTek). El antisuero policlonal de cabra

anti-inmunoglobulinas de conejo marcado con HRP (GAR-HRP) fue suministrado por Bio-Rad. El antisuero policlonal de conejo anti-inmunoglobulinas de ratón marcado con HRP (RAM-HRP) se obtuvo de Dako. La *o*-fenilendiamina (OPD) y el Tween 20 se obtuvieron de Sigma-Aldrich. Los tampones y disoluciones empleadas en las diversas etapas de los ELISAs fueron:

Tampón de tapizado: tampón carbonato-bicarbonato sódico 50 mM, pH 9.6.

PBS: tampón fosfato sódico 10 mM, pH 7.4, 140 mM NaCl.

PBST: PBS, Tween 20 0.05% (v/v).

PB: tampón fosfato sódico 200 mM, pH 7.4.

PBT: PB, Tween 20 0.05% o 0.02% (v/v).

Disolución de revelado: tampón de revelado (25 mM citrato sódico y 62 mM fosfato sódico, pH 5.4) con 2 mg/mL de OPD y H₂O₂ 0.012% (v/v).

Disolución de parada de la reacción enzimática: H₂SO₄ 2.5 mM.

Disolución de lavado: 0.15 mM NaCl, Tween 20 0.05% (v/v).

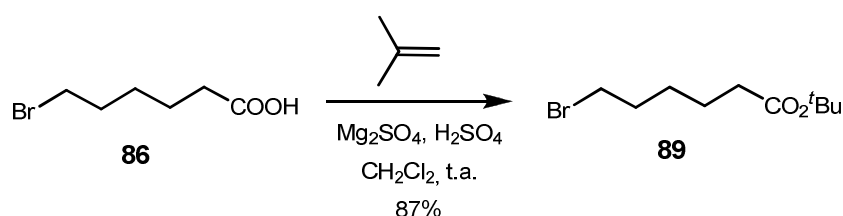
El patrón analítico de kresoxim-methyl fue generosamente proporcionado por la empresa BASF (Limburgerhof, Alemania). Trifloxystrobin, también de grado estándar analítico, se obtuvo de Bayer CropScience (Frankfurt, Alemania). Por su parte, los patrones analíticos de pyraclostrobin, dimoxystrobin, orysastrobin, fluoxastrobin, metominostrobin, pirimetanil, boscalid, epoxiconazol, propiconazol, tebuconazol y fenpropimorph grado Pestanal, fueron comprados de Fluka/Riedel de Haën (Seelze, Germany). Finalmente, los patrones de azoxystrobin y picoxystrobin fueron amablemente proporcionados por Syngenta (Basel, Switzerland). Se prepararon disoluciones concentradas (100 mM) de todos los patrones en *N,N*-dimetilformamida anhidra y se almacenaron a -20 °C en viales ámbar.

5.1.5. Análisis de muestras por GC–MS

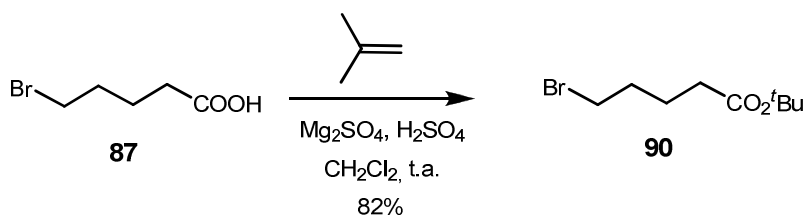
La homogenización de los frutos se llevó a cabo empleando una licuadora DeLonghi. La determinación de kresoxim–methyl y trifloxystrobin por GC–MS se realizó en un cromatógrafo de gases Agilent 6890N equipado con un detector de espectrometría de masas de cuadrupolo de Agilent 5973N y una columna capilar HP–5MS (30 m × 0.25 mm × 0.25 μm) de Agilent. La purificación por extracción en fase sólida se llevó a cabo empleando amina primaria/secundaria (PSA), suministrada por Varian.

5.2. Síntesis de haptenos

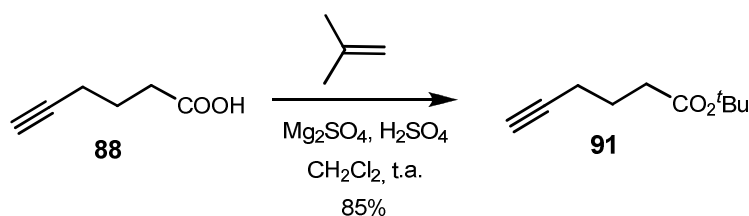
5.2.1. Síntesis de los brazos espaciadores



6-Bromohexanoato de *tert*-butilo (89). A una suspensión agitada que contenía 1 g (5.127 mmol) del ácido **86** y 637 mg de MgSO₄ anhidro (1.451 mmol) en 3.3 mL de CH₂Cl₂ seco, se añadieron 4 gotas de H₂SO₄ concentrado y la mezcla de reacción se enfrió a –20 °C. También a –20 °C se recogió el isobuteno líquido (1.43 mL, 15.803 mmol) y se añadió *vía* jeringa a la mezcla de reacción. Seguidamente, el matraz de presión se selló y la mezcla se mantuvo bajo agitación a temperatura ambiente durante 12 h. Transcurrido este tiempo, se volvió a enfriar la mezcla a –15 °C para abrir el matraz, se dejó evaporar el exceso de isobuteno y después se filtró a vacío, lavando el MgSO₄ con acetato de etilo. La fase orgánica filtrada se lavó con una disolución de NaHCO₃ al 5% y salmuera y se secó sobre Na₂SO₄ anhidro, para proporcionar el éster *tert*-butílico **89** como un aceite incoloro (1.112 g, 87%). Este producto ha sido previamente descrito (CAS 65868–63–5). Las propiedades espectroscópicas del producto obtenido son coincidentes con las descritas anteriormente (Pilkington–Miksa *et al.*, 2007).



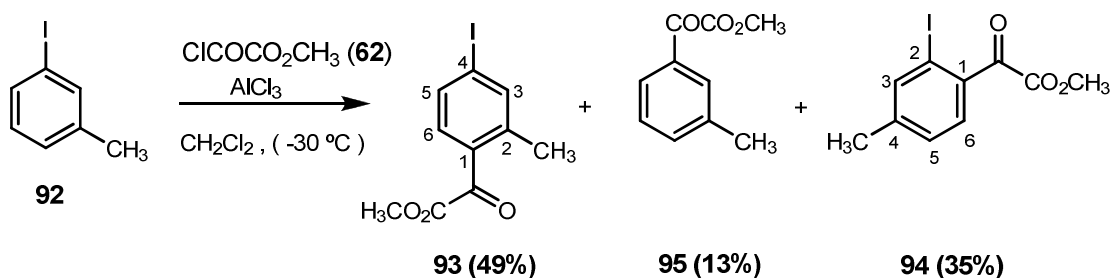
5-Bromopentanoato de *tert*-butilo (90). Mediante un procedimiento análogo al descrito para la preparación del compuesto **89** se obtuvieron 1.40 g del 5-bromopentanoato de *tert*-butilo **90** partiendo de 1.37 g del ácido **87** (82%). Este producto ha sido previamente descrito (CAS 88987-42-2). Las propiedades físicas y espectroscópicas del producto obtenido coinciden con las descritas anteriormente (Devadas *et al.*, 1991).



Hex-5-inoato de *tert*-butilo (91). Siguiendo el procedimiento descrito para la preparación del 6-bromohexanoato de *tert*-butilo (**89**) se obtuvieron 3.089 g (85%) del éster *tert*-butílico **91** a partir de 2.489 g del ácido **88**. Este producto ha sido previamente descrito (CAS 73448-14-3). Las propiedades espectroscópicas del producto **91** coinciden con las anteriormente descritas (Sakamoto *et al.*, 2007).

5.2.2. Síntesis de haptenos para kresoxim-methyl

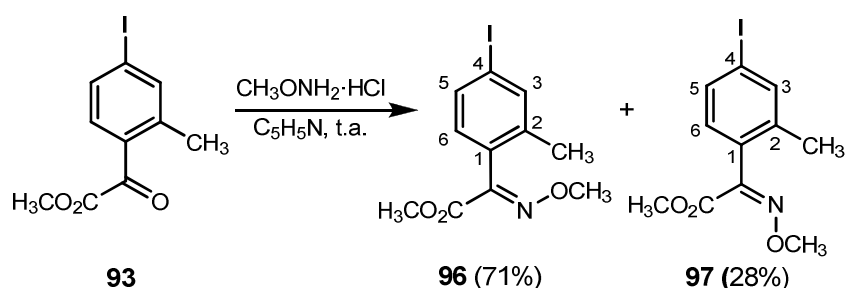
5.2.2.1. Síntesis del hapteno KMa6



2-(4-Iodo-2-metilfenil)-2-oxoacetato de metilo (93). Una disolución que contenía 300 μL (511.2 mg, 2.340 mmol) de 3-iodotolueno (**92**) y 323 μL (3.510 mmol) del cloruro de ácido **62** en 5 mL de CH_2Cl_2 seco, fue enfriada a $-30\text{ }^\circ\text{C}$. Después de que la mezcla fuera agitada durante 10 min, se añadieron 1.2 g (9.015 mmol) de AlCl_3 en pequeñas porciones durante 10 min. La mezcla de reacción se dejó a $-30\text{ }^\circ\text{C}$ durante 90 min, durante los cuales se observa que la disolución se vuelve de color rojo oscuro. Pasado el tiempo, la mezcla de reacción se vertió sobre una mezcla de hielo/HCl concentrado y se extrajo con CH_2Cl_2 . Las fases orgánicas reunidas se lavaron con una disolución de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$, una disolución 0.1M de NaOH y salmuera, se secaron sobre Na_2SO_4 y se filtraron. Una vez eliminado el disolvente a vacío, el residuo se purificó por cromatografía de columna, usando como eluyente hexano-éter etílico (de 95:5 a 9:1), obteniéndose, en orden de elución, el ceto-éster **93** como un sólido blanco (348,6 mg, 49%), seguido de **95** como un aceite incoloro (92.4 mg, 13%) y finalmente **94** como un aceite amarillo (248.5 mg, 35%). El compuesto **95** ha sido previamente descrito (CAS 34966-53-5). Las propiedades espectroscópicas del producto **95** coinciden con las anteriormente descritas (Wu *et al.*, 2008).

Datos físicos y espectroscópicos de 93: Pf. $86-88\text{ }^\circ\text{C}$ (Hexano); IR (NaCl) ν_{max} (cm^{-1}) 2954d, 2925d, 1734m, 1680f, 1585m, 1547m, 1429m, 1377d, 1320m, 1289d, 1275d, 1203f, 1147d, 1088d, 922f, 912m, 845d, 815d, 735m; **^1H -RMN** (300 MHz) δ 7.22 (1H, sa, H-3), 7.68 (1H, dd, $J = 8.2, 1.5\text{ Hz}$, H-5), 7.38 (1H, d, $J = 8.2\text{ Hz}$, H-6), 3.95 (3H, s, CO_2CH_3), 2.53 (3H, s, CH_3); **^{13}C -RMN** (75 MHz) δ 187.65 (CO), 164.22 (CO_2CH_3), 142.78 (C-2), 141.30 (C-3), 135.21 (C-5), 133.04 (C-6), 130.67 (C-1), 102.23 (C-4), 52.90 (CO_2CH_3), 20.95 (CH_3); **EM** (IE) m/z (%) 304 (M^+ , 7), 246 (9), 245 (100), 217 (12), 118 (5), 90 (17), 63 (5); **EMAR** m/z calculada para $\text{C}_{10}\text{H}_9\text{IO}_3$ 303.9596, encontrada 303.9595.

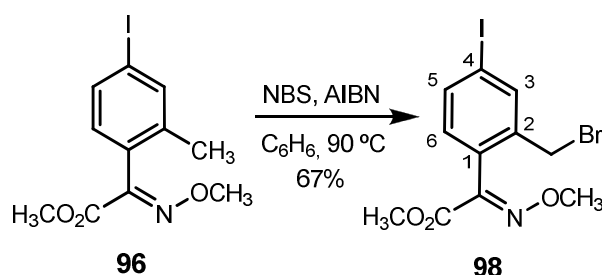
Datos espectroscópicos de 94: IR (NaCl) ν_{\max} (cm^{-1}) 3033d, 2953d, 2847d, 1736f, 1692f, 1593f, 1549d, 1476d, 1435m, 1379d, 1314m, 1262m, 1217f, 1200f, 1179f, 1156d, 1048f, 1001f, 914d, 842d, 781d; $^1\text{H-RMN}$ (300 MHz) δ 7.81 (1H, s, H-3), 7.52 (1H, d, $J = 7.8$ Hz, H-6), 7.27 (1H, dd, $J = 7.8, 0.5$ Hz, H-6), 3.94 (3H, s, CO_2CH_3), 2.36 (3H, s, CH_3); $^{13}\text{C-RMN}$ (75 MHz) δ 187.27 (CO), 162.54 (CO_2CH_3), 145.31 (C-4), 141.72 (C-3), 134.79 (C-1), 132.14 (C-6), 129.03 (C-5), 93.65 (C-2), 53.24 (CO_2CH_3), 21.07 (CH_3); **EM** (IE) m/z (%) 304 (M^+ , 14), 246 (16), 245 (100), 217 (18), 118 (6), 90 (27), 89 (14), 63 (6); **EMAR** m/z calculada para $\text{C}_{10}\text{H}_9\text{IO}_3$ 303.9596, encontrada 303.9599.



2-(4-Iodo-2-metilfenil)-(E)-2-(metoxiimino)acetato de metilo (96). 202.4 mg (0.666 mmol) del α -cetoéster **93** y 240 mg (2.87 mmol) de clorhidrato de *o*-metilhidroxilamina se disolvieron en 3.5 mL de piridina seca bajo atmósfera de nitrógeno. La suspensión resultante se agitó a temperatura ambiente durante toda la noche (19 h). Pasado este tiempo, la mezcla de reacción se vertió sobre agua y se extrajo con acetato de etilo. Las fases orgánicas se lavaron con disolución saturada de NaCl, se secaron sobre Na_2SO_4 anhidro y se filtraron. El residuo resultante después de eliminar el disolvente a vacío se purificó por cromatografía de columna, con hexano-éter etílico (de 8:2 a 6:4) como eluyente. El producto **97** fue eluido en primer lugar como un aceite incoloro (61.4 mg, 28%), seguido de **96** (157.2 mg, 71%) como un sólido blanco.

Datos físicos y espectroscópicos de 96: Pf. 50–52 °C (Hexano); IR (KBr) ν_{\max} (cm⁻¹) 2940d, 2886d, 1725f, 1597d, 1478d, 1437m, 1323m, 1219f, 1129d, 1066f, 1018f, 957m, 846m, 821d, 780m; ¹H-RMN (300 MHz) δ 7.63 (1H, sa, H-3), 7.57 (1H, dd, J = 8.1, 1.4 Hz, H-5), 6.83 (1H, d, J = 8.1 Hz, H-6), 4.05 (3H, s, NOCH₃) 3.87 (3H, s, CO₂CH₃), 2.13 (3H, s, CH₃); ¹³C-RMN (75 MHz) δ 163.07 (CO₂CH₃), 149.69 (CN), 138.83 (C-3), 138.33 (C-2), 134.61 (C-5), 129.64 (C-1), 129.50 (C-6), 95.64 (C-4), 63.85 (NOCH₃), 53.02 (CO₂CH₃), 19.14 (CH₃); EM (IE) m/z (%) 333 (M⁺, 28), 302 (100), 270 (15), 259 (5), 243 (59), 242 (30), 175 (8), 143 (8), 116 (20), 89 (15), 63 (5), 59 (8); EMAR m/z calculada para C₁₁H₁₂INO₃ 332.9862, encontrada 332.9867.

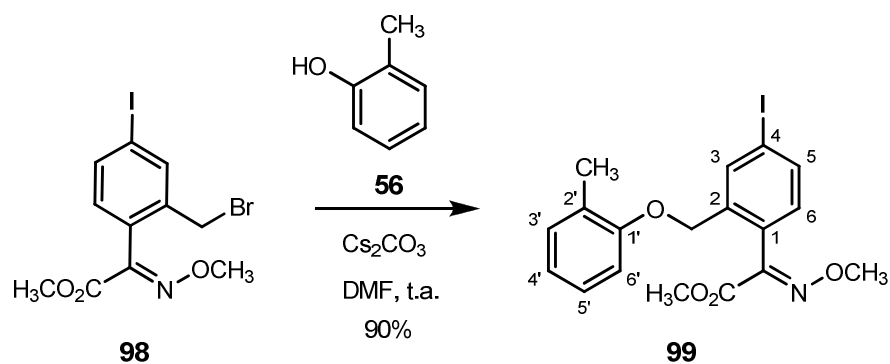
Datos espectroscópicos de 97: IR (NaCl) ν_{\max} (cm⁻¹) 2941d, 2879d, 1725f, 1598d, 1477d, 1435m, 1320m, 1220f, 1129d, 1065f, 1018f, 955m, 843m, 782m; ¹H-RMN (300 MHz) δ 7.62 (1H, d, J = 1.3 Hz, H-3), 7.56 (1H, dd, J = 8.2, 1.3 Hz, H-5), 7.05 (1H, d, J = 8.2 Hz, H-6), 4.02 (3H, s, NOCH₃) 3.86 (3H, s, CO₂CH₃), 2.39 (3H, s, CH₃); ¹³C-RMN (75 MHz) δ 163.67 (CO₂CH₃), 150.59 (CN), 140.51 (C-2), 139.00 (C-3), 138.20 (C-2), 134.55 (C-5), 129.60 (C-1), 129.49 (C-6), 96.50 (C-4), 63.18 (NOCH₃), 52.40 (CO₂CH₃), 20.68 (CH₃); EM (IE) m/z (%) 333 (M⁺, 28), 302 (100), 270 (15), 259 (5), 243 (59), 242 (30), 175 (8), 143 (8), 116 (20), 89 (15), 63 (5), 59 (8); EMAR m/z calculada para C₁₁H₁₂INO₃ 332.9862, encontrada 332.9867.



2-(2-(Bromometil)-4-iodofenil)-(E)-2-(metoxiimino)acetato de metilo (98). A un matraz que contenía 300 mg (0.900 mmol) del acetato de metoxiimino **96**, 160 mg (0.900 mmol) de NBS y 8.8 mg (0.054 mmol) de AIBN se le añadieron, bajo atmósfera de nitrógeno, 4 mL de benceno seco. La mezcla de reacción fue desgasificada burbujeando nitrógeno en baño de

ultrasonidos y posteriormente se agitó a reflujo de benceno durante toda la noche (14 h). Transcurrido el tiempo, se eliminó el disolvente a vacío y el residuo obtenido se purificó por cromatografía de columna, con hexano–éter etílico (9:1) como eluyente, para obtener el bromuro bencílico **98** como un aceite amarillo (248.4 mg, 67%).

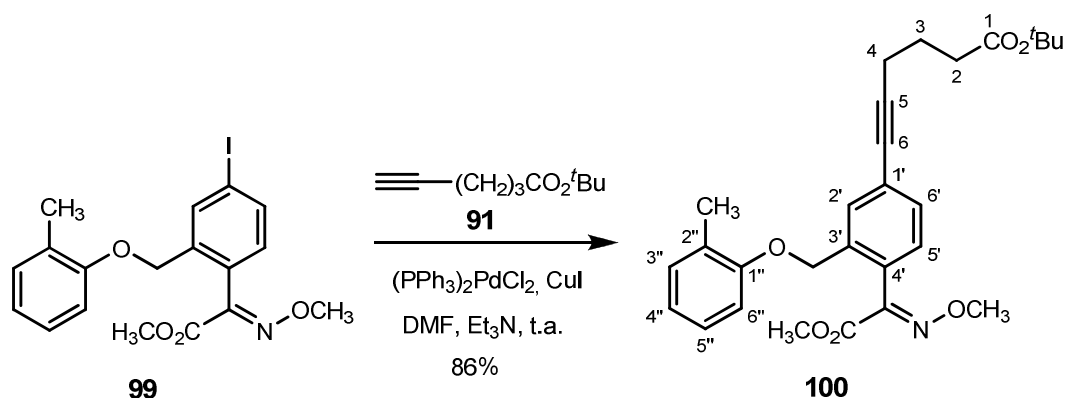
Datos espectroscópicos: IR (NaCl) ν_{\max} (cm⁻¹) 3053d, 2941d, 1726f, 1595d, 1480d, 1437m, 1388d, 1325m, 1302m, 1266m, 1223f, 1063f, 1017f, 957m, 859d, 785m, 736f; **¹H-RMN** (300 MHz) δ 7.84 (1H, d, $J = 1.7$ Hz, H-3), 7.70 (1H, dd, $J = 8.1, 1.7$ Hz, H-5), 6.88 (1H, d, $J = 8.1$ Hz, H-6), 4.23 (2H, s, CH₂Br), 4.07 (3H, s, NOCH₃), 3.88 (3H, s, CO₂CH₃); **¹³C-RMN** (75 MHz) δ 162.71 (CO₂CH₃), 148.09 (CN), 138.97 (C-3), 137.71 (C-2), 137.45 (C-5), 130.21 (C-6), 129.79 (C-1), 95.64 (C-4), 64.02 (NOCH₃), 53.20 (CO₂CH₃), 29.37 (CH₂Br); **EM** (IE) m/z (%) 414 (M⁺¹ ⁸¹Br, 12), 413 (M⁺ ⁸¹Br, 97), 412 (M⁺¹ ⁷⁹Br, 13), 411 (M⁺ ⁷⁹Br, 99), 380 (21), 378 (5), 332 (29), 301 (100), 272 (30), 269 (22), 258 (6), 242 (36), 193 (2), 145 (13), 114 (10); **EMAR** m/z calculada para C₁₁H₁₁I⁷⁹BrNO₃ 410.8967, encontrada 410.8966.



2-(4-Iodo-2-((*o*-toliloxi)metil)fenil)-(E)-2-(metoxiimino)acetato de metilo (99). 112 mg (0.272 mmol) del bromuro bencílico **98**, 133 mg (0.408 mmol) de Cs₂CO₃ y 28 μ L (0.272 mmol) de *o*-cresol se disolvieron en 1.3 mL de DMF seca bajo atmósfera de nitrógeno. La suspensión resultante color marrón se agitó a temperatura ambiente durante 6 h. Después de este tiempo, la mezcla de reacción se vertió sobre agua y se extrajo con acetato de etilo. Las fases orgánicas reunidas se lavaron con disolución saturada de NaCl, se secaron sobre Na₂SO₄ anhidro y se filtraron. El residuo resultante después de eliminar

el disolvente a vacío se purificó por cromatografía de columna, usando como eluyente hexano–éter etílico (de 9:1 a 8:2), obteniéndose el ioduro arílico **99** como un aceite oscuro (107.5 mg, 90%).

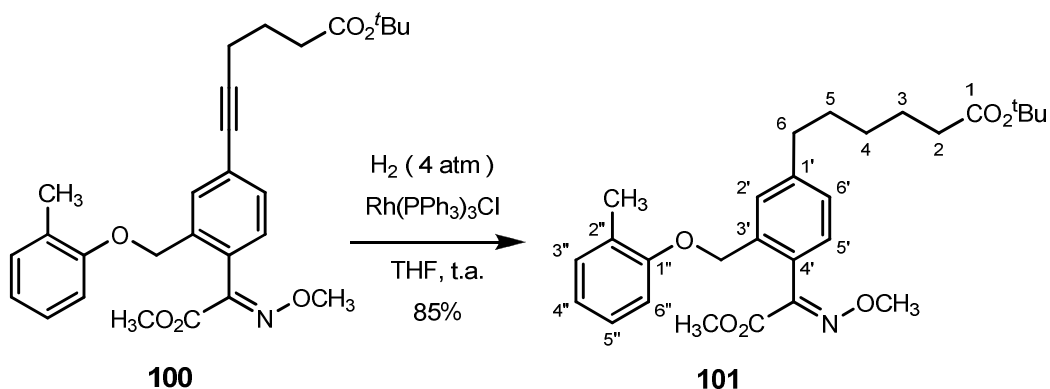
Datos espectroscópicos: IR (NaCl) ν_{\max} (cm^{-1}) 2939d, 1725f, 1600m, 1588m, 1494f, 1454m, 1437m, 1323m, 1240f, 1222f, 1191d, 1121m, 1065f, 1018f, 956d, 787d, 752m; **$^1\text{H-RMN}$** (300 MHz) δ 7.95 (1H, d, $J = 1.5$ Hz, H-3), 7.72 (1H, dd, $J = 8.1, 1.5$ Hz, H-5), 7.13 (2H, m, H-3' y H-5'), 6.94 (1H, d, $J = 8.1$ Hz, H-6), 6.88 (1H, t, $J = 7.3, 7.3$ Hz, H-4'), 6.74 (1H, d, $J = 8.1$ Hz, H-6'), 4.89 (2H, s, OCH_2), 4.03 (3H, s, NOCH_3), 3.82 (3H, s, CO_2CH_3), 2.26 (3H, s, CH_3); **$^{13}\text{C-RMN}$** (75 MHz) δ 162.79 (CO_2CH_3), 156.28 (C-1'), 148.46 (CN), 137.90 (C-2), 136.65 (C-5), 136.55 (C-3), 130.83 (C-3'), 130.17 (C-6), 128.42 (C-2'), 126.97 (C-1), 126.73 (C-5'), 120.90 (C-4'), 111.19 (C-6'), 95.82 (C-4), 67.38 (OCH_2), 63.84 (NOCH_3), 52.96 (CO_2CH_3), 16.16 (CH_3); **EM** (IE) m/z (%) 439 (M^+ , 13), 408 (8), 332 (100), 302 (15), 272 (24), 268 (6), 257 (37), 243 (29), 242 (87), 161 (18), 146 (50), 131 (17), 115 (38), 114 (21), 107 (17), 91 (14), 89 (11), 77 (27), 59 (83); **EMAR** m/z calculada para $\text{C}_{18}\text{H}_{18}\text{INO}_4$ 439.0280, encontrada 439.0299.



6-(4-(E)-2-Metoxi-1-(metoxiimino)-2-oxoetil)-3-(*o*-toliloxi) metil) fenil) hex-5-inoato de *terc*-butilo (100**). Sobre una disolución que contenía 101 mg (0.230 mmol) del ioduro arílico **99**, 1.3 mg (3%) de CuI , 155 mg (0.920 mmol) del alquino **91** en 1 mL de DMF seca, se añadieron, bajo atmósfera de nitrógeno, 0.5 mL de Et_3N y 4.8 mg (0.007 mmol) de $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_2\text{Cl}_2$. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente. A los 10 minutos la**

disolución amarilla se volvió de color rojo intenso. Pasadas 6 h, la mezcla de reacción se vertió sobre agua y se extrajo con acetato de etilo. Las fases orgánicas se lavaron con salmuera, se secaron sobre Na_2SO_4 y se filtraron. El residuo resultante después de eliminar el disolvente a vacío, se purificó por cromatografía de columna, utilizando como eluyente hexano-éter etílico (7:3), proporcionando 94.7 mg (86%) del alquino **100**, como un líquido incoloro.

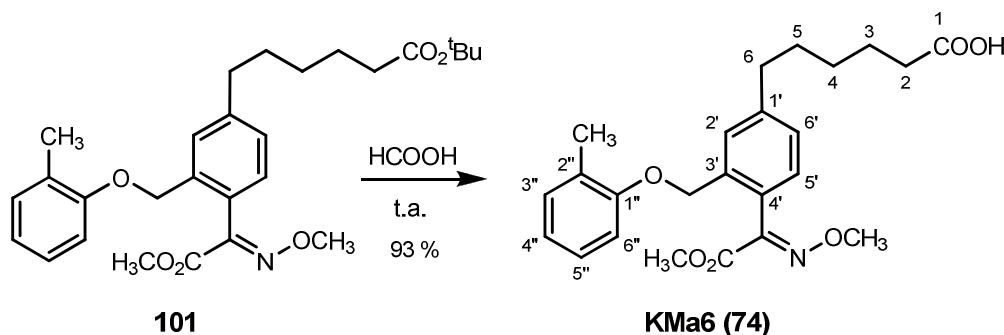
Datos espectroscópicos: IR (NaCl) ν_{max} (cm^{-1}) 2977m, 2939m, 2258d, 1728f, 1603m, 1494f, 1458m, 1437m, 1312m, 1239f, 1149f, 1069f, 1020f, 952m, 912m, 835m, 785m, 733f, 654d; **$^1\text{H-RMN}$** (300 MHz) δ 7.59 (1H, d, $J = 1.6$ Hz, H-2'), 7.40 (1H, dd, $J = 7.9, 1.6$ Hz, H-6'), 7.14 (1H, m, H-3'' parcialmente solapado con H-5' y H-5''), 7.13 (1H, m, H-5' parcialmente solapado con H-3'' y H-5''), 7.10 (1H, m, H-5'' parcialmente solapado con H-5' y H-3''), 6.86 (1H, td, $J = 7.4, 7.3, 0.8$ Hz, H-4''), 6.75 (1H, d, $J = 8.1$ Hz, H-6''), 4.91 (2H, s, OCH_2), 4.01 (3H, s, NOCH_3), 3.80 (3H, s, CO_2CH_3), 2.48 (2H, t, $J = 7.0$ Hz, H_2-4), 2.40 (2H, t, $J = 7.5$ Hz, H_2-2), 2.25 (3H, s, CH_3), 1.89 (2H, q, $J = 7.5, 7.0$ Hz, H_2-3), 1.46 (9H, s, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$); **$^{13}\text{C-RMN}$** (75 MHz) δ 172.44 (CO_2^tBu), 163.01 (CO_2CH_3), 156.48 (C-1''), 148.93 (CN), 135.97 (C-3'), 130.69 (C-6'), 130.60 (C-2' y C-3''), 128.61 (C-5'), 128.16 (C-4'), 127.00 (C-2''), 126.67 (C-5''), 125.33 (C-1'), 120.71 (C-4''), 111.23 (C-6''), 90.58 (C-5), 80.75 (C-6), 80.28 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 67.93 (OCH_2), 63.78 (NOCH_3), 52.90 (CO_2CH_3), 34.36 (C-2), 28.08 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 24.01 (C-3), 18.84 (C-4), 16.19 (CH_3); **EM** (IE) m/z (%) 479 (M^+ , 20), 423 (4), 406 (16), 392 (4), 320 (100), 276 (27), 246 (17), 230 (19), 212 (12), 204 (4), 184 (5), 172 (17), 160 (5), 144 (18), 130 (9); **EMAR** m/z calculada para $\text{C}_{28}\text{H}_{33}\text{NO}_6$ 479.2308, encontrada 479.2304.



6-(4-(*E*)-(2-Metoxi-1-(metoxiimino)-2-oxoetil)-3-(*o*-toliloxi) metil) fenil) hexanoato de *terc*-butilo (101**). Una mezcla de 56.3 mg (0.117 mmol) del alquino **100** y 3.3 mg (0.003 mmol) de Rh(PPh₃)₃Cl en 1 mL de THF seco, se purgó con H₂. La mezcla de reacción se mantuvo con buena agitación bajo una presión de H₂ de 4 atm a temperatura ambiente durante 16 h. Transcurrido el tiempo, se liberó la presión y se eliminó el disolvente a vacío. El residuo resultante se purificó por cromatografía de columna, utilizando como eluyente hexano–acetato de etilo (9:1), para obtener el hapteno protegido como un aceite marrón (48.2 mg, 85%).**

Datos espectroscópicos: IR (NaCl) ν_{\max} (cm⁻¹) 2976d, 2936m, 2859m, 1727f, 1602d, 1495m, 1460m, 1438m, 1366m, 1311m, 1243f, 1214f, 1156f, 1067f, 1020m, 955d, 847d, 752m; ¹H–RMN (300 MHz) δ 7.38 (1H, s, H–2'), 7.19 (1H, dd, $J = 7.8, 1.6$ Hz, H–6'), 7.14 (1H, m, H–5' parcialmente solapado con H–3'' y H–5''), 7.13 (1H, m, H–3'' parcialmente solapado con H–5' y H–5''), 7.10 (1H, m, H–5' 'parcialmente solapado con H–5' y H–3''), 6.85 (1H, td, $J = 7.4, 7.4, 0.8$ Hz, H–4''), 6.78 (1H, d, $J = 8.1$ Hz, H–6''), 4.93 (2H, s, OCH₂), 4.02 (3H, s, NOCH₃), 3.81 (3H, s, CO₂CH₃), 2.65 (2H, t, $J = 7.6$ Hz, H₂–6), 2.25 (3H, s, CH₃), 2.21 (2H, t, $J = 7.5$ Hz, H₂–2), 1.68–1.60 (4H, m, H₂–5 y H₂–3), 1.45 (9H, s, C(CH₃)₃), 1.40 (2H, m, H₂–4); ¹³C–RMN (75 MHz) δ 173.09 (CO₂^tBu), 163.37 (CO₂CH₃), 156.60 (C–1''), 149.42 (CN), 144.12 (C–1'), 135.59 (C–3'), 130.02 (C–3''), 128.53 (C–5'), 127.65 (C–2'), 127.53 (C–6'), 126.94 (C–2''), 126.64 (C–5''), 126.27 (C–4'), 120.56 (C–4''), 111.23 (C–6''), 79.98 (C(CH₃)₃), 68.31 (OCH₂), 63.65 (NOCH₃), 52.82 (CO₂CH₃), 35.58 (C–6), 35.41 (C–2), 30.62 (C–5), 28.69 (C–4), 28.07 (C(CH₃)₃), 24.88 (C–3), 16.17 (CH₃);

EM (IE) m/z (%) 483 (M^+ , 4), 452 (4), 396 (7), 320 (100), 276 (23), 246 (15), 230 (18), 212 (9), 204 (5), 184 (10), 172 (15), 160 (8), 144 (18), 130 (7); **EMAR** m/z calculada para $C_{28}H_{37}NO_6$ 483.2621, encontrada 483.2631.

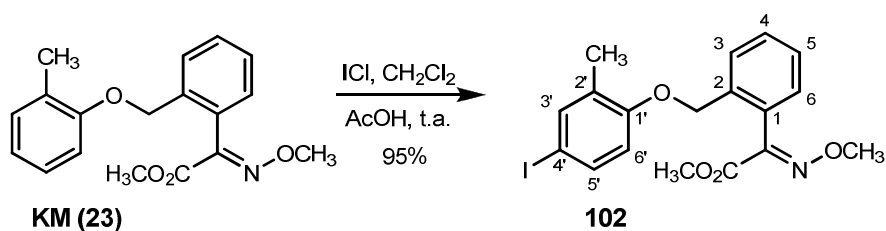


Ácido 6-(4-(*E*)-(2-metoxi-1-(metoxiimino)-2-oxoetil)-3-((*o*-toliloxi) metil)fenil)hexanoico (Hapteno KMa6, 74). 48.2 mg (0.099 mmol) del éster *tert*-butílico **101** se disolvieron en 2 mL de ácido fórmico. La mezcla se mantuvo bajo agitación a temperatura ambiente en atmósfera inerte durante 3 h. Seguidamente, la mezcla se diluyó en benceno y se lavó con agua fría hasta pH neutro. La fase orgánica se secó con Na_2SO_4 anhidro, se filtró y se eliminó el benceno a vacío. El residuo resultante se purificó por cromatografía de columna, utilizando como eluyente $CHCl_3$. Se obtuvo KMa6 (**74**) con un 93% de rendimiento (39.3 mg), como un aceite incoloro.

Datos espectroscópicos: IR (NaCl) ν_{max} (cm^{-1}) 3293d (ancha), 2937m, 2858d, 1725f, 1708f, 1601d, 1494m, 1460d, 1438m, 1310m, 1242f, 1190d, 1122m, 1067f, 1019f, 953d, 782d, 752m; **1H -RMN** (300 MHz) δ 7.38 (1H, s, H-2'), 7.20 (1H, dd, $J = 7.9, 1.5$ Hz, H-6'), 7.14 (1H, m, H-3'' parcialmente solapado con H-5' y H-5''), 7.13 (1H, m, H-5' parcialmente solapado con H-3'' y H-5''), 7.10 (1H, m, H-5'' parcialmente solapado con H-5' y H-3''), 6.86 (1H, td, $J = 7.3, 7.3, 0.7$ Hz, H-4''), 6.77 (1H, d, $J = 8.1$ Hz, H-6''), 4.94 (2H, s, OCH_2), 4.02 (3H, s, $NOCH_3$), 3.81 (3H, s, CO_2CH_3), 2.66 (2H, t, $J = 7.7$ Hz, H₂-6), 2.35 (2H, t, $J = 7.5$ Hz, H₂-2), 2.25 (3H, s, CH_3), 1.68–1.60 (4H, m, H₂-5 y H₂-3), 1.41 (2H, m, H₂-4); **^{13}C -RMN** (75 MHz) δ 179.65 (CO_2H), 163.40 (CO_2CH_3), 156.59 (C-1''), 149.39 (CN), 143.98 (C-1'), 135.64 (C-3'), 130.61 (C-3''), 128.56 (C-5'), 127.65 (C-2'), 127.55 (C-6'), 126.94

(C-2''), 126.64 (C-5''), 126.31 (C-4'), 120.59 (C-4''), 111.26 (C-6''), 68.29 (OCH₂), 63.68 (NOCH₃), 52.87 (CO₂CH₃), 35.52 (C-6), 33.84 (C-2), 30.54 (C-5), 28.63 (C-4), 24.44 (C-3), 16.18 (CH₃); **EM** (IE) *m/z* (%) 427 (M⁺, 6), 396 (6), 320 (100), 276 (21), 246 (14), 230 (19), 212 (8), 204 (3), 184 (5), 172 (15), 160 (8), 144 (18), 130 (8); **EMAR** *m/z* calculada para C₂₄H₂₉NO₆ 427.1995, encontrada 427.2007.

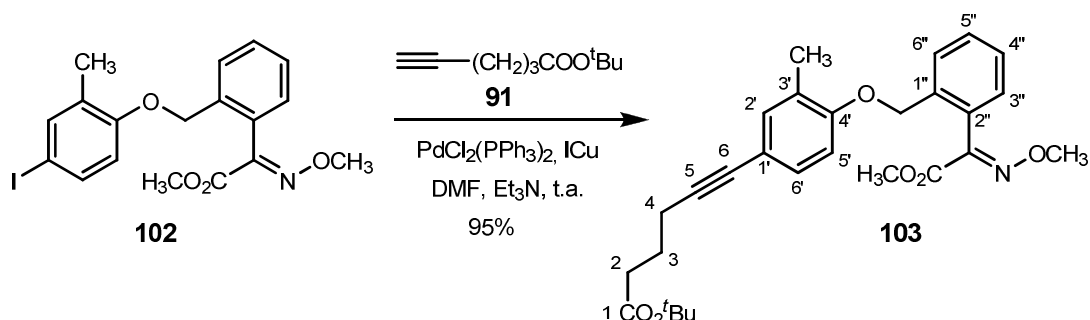
5.2.2.2. Síntesis del hapteno KMb6



2-(2-((4-Iodo-2-metilfenoxi)metil)fenil)-2-(E)-(metoxiimino)acetato de metilo (102) A una disolución de 537.5 mg (1.720 mmol) de KM (**23**) en 3 mL de AcOH se añadieron, bajo atmósfera de nitrógeno, 4.5 mL (6.881 mmol) de una disolución 1.53 M de ICl en CH₂Cl₂. La mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante 5 h. Transcurrido este tiempo, la mezcla se vertió sobre agua y se extrajo con acetato de etilo. Las fases orgánicas se lavaron en primer lugar con una disolución de tiosulfato sódico, y en segundo lugar con una disolución saturada de NaCl. Se secaron sobre Na₂SO₄ anhidro y se filtraron. El residuo obtenido después de eliminar el disolvente a vacío, se purificó por cromatografía de columna, usando como eluyente hexano–acetato de etilo (8:2), obteniéndose el ioduro arílico **102** como un sólido blanco (718.4 mg, 95%).

Datos físicos y espectroscópicos: Pf. 124–125 °C (Hexano–Benceno); **IR** (KBr) ν_{\max} (cm⁻¹) 2985d, 2969d, 2938d, 1738f, 1585m, 1487f, 1464f, 1436f, 1384m, 1296f, 1241f, 1188f, 1132f, 1002f, 978f, 887m, 801f, 786f, 766f, 644m; **¹H–RMN** (300 MHz) δ 7.52 (1H, dd, *J* = 7.3, 1.4 Hz, H-6), 7.49–7.33 (4H, m, H-3', H-5, H-5', H-4), 7.20 (1H, dd, *J* = 7.3, 1.3 Hz, H-3), 6.52 (1H, d, *J* = 8.6 Hz, H-6'), 4.93 (2H, s, OCH₂), 4.02 (3H, s, NOCH₃), 3.83 (3H, s, CO₂CH₃), 2.19 (3H, s, CH₃); **¹³C–RMN** (75 MHz) δ 163.18 (CO₂CH₃), 156.40

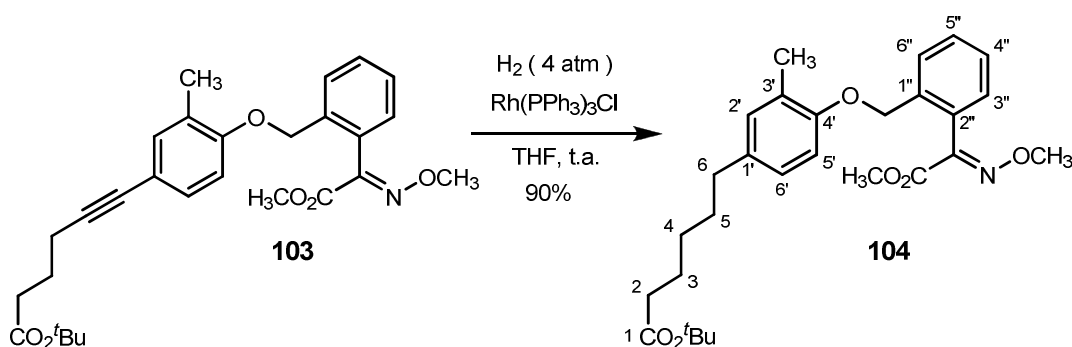
(C-1'), 149.19 (CN), 139.08 (C-3'), 135.40 (C-5'), 135.15 (C-2), 129.78 (C-3), 129.65 (C-5), 128.95 (C-2'), 128.61 (C-1), 127.72 (C-4), 127.48 (C-6), 113.41 (C-6'), 82.97 (C-4'), 68.21 (OCH₂), 63.84 (NOCH₃), 53.02 (CO₂CH₃), 15.88 (CH₃); **EM** (IE) *m/z* (%) 439 (M⁺, 9), 232 (7), 206 (48), 146 (7), 131 (44), 117 (16), 116 (100), 106 (5), 89 (21), 78 (27), 59 (67); **EMAR** *m/z* calculada para C₁₈H₁₈INO₄ 439.0280, encontrada 439.0281.



(E)-6-(4-(2-((2-Metoxi-1-(metoxiimino)-2-oxoetil)encil)oxi)-3-metilfenil)hex-5-ionato de *tert*-butilo (103). Preparado mediante un procedimiento análogo al descrito para la preparación de **100**; a partir de una disolución que contenía 529.8 mg (1.21 mmol) del ioduro arílico **102**, 6.9 mg (3%) de CuI, 811mg (4.841 mmol) del alquino **91**, 3.9 mL de DMF seca, 2.9 mL de de Et₃N y 25.5 mg (0.040 mmol) de Pd(PPh₃)₂Cl₂, tras 3 h de reacción y la correspondiente purificación por cromatografía, utilizando hexano–acetato de etilo (de 9:1 a 8:2) como eluyente, se obtuvieron 545.8 mg del alquino **103** (95%), como un aceite amarillo.

Datos espectroscópicos: IR (NaCl) ν_{\max} (cm⁻¹) 2977d, 2939d; 1727f, 1604d, 1500m, 1461d, 1437d, 1367d, 1313d, 1262d, 1233m, 1147m, 1132m, 1069m, 1019m, 958d, 758d, 738d; **¹H-RMN** (300 MHz) δ 7.54 (1H, dd, *J* = 7.3, 1.5 Hz, H-3''), 7.44 (1H, td, *J* = 7.4, 7.3, 1.3 Hz, H-4''), 7.38 (1H, td, *J* = 7.4, 7.4, 1.5 Hz, H-5''), 7.20 (1H, dd, *J* = 7.4, 1.5 Hz, H-6''), 7.19 (1H, s, H-2'), 7.14 (1H, dd, *J* = 8.4, 2.0 Hz, H-6'), 6.66 (1H, d, *J* = 8.4 Hz, H-5'), 4.94 (2H, s, OCH₂), 4.02 (3H, s, NOCH₃), 3.82 (3H, s, CO₂CH₃), 2.43 (2H, t, *J* = 7.0 Hz, H₂-4), 2.39 (2H, t, *J* = 7.5 Hz, H₂-2), 2.19 (3H, s, CH₃), 1.86 (2H, q, *J* = 7.5, 7.0 Hz, H₂-3), 1.45 (9H, s, C(CH₃)₃); **¹³C-RMN** (75 MHz) δ 172.62 (CO₂^tBu),

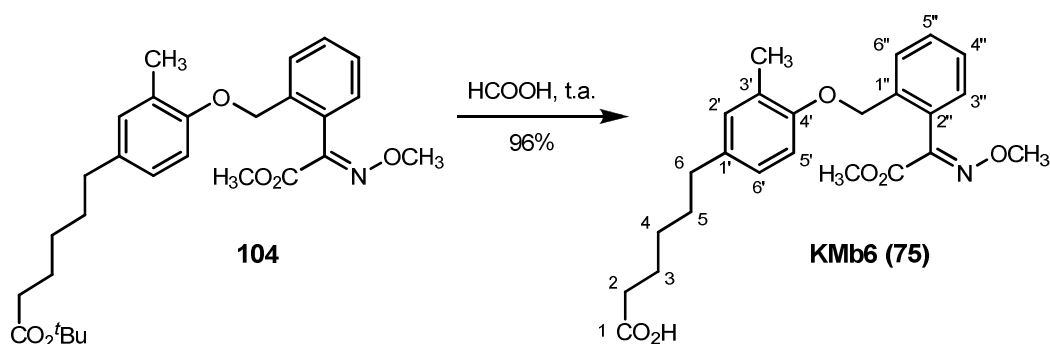
163.19 (CO_2CH_3), 156.15 (C-4'), 149.22 (CN), 135.34 (C-1''), 133.86 (C-2'), 130.18 (C-6'), 129.63 (C-4''), 128.93 (C-2''), 128.57 (C-6''), 127.64 (C-5''), 127.52 (C-3''), 126.95 (C-3'), 115.76 (C-1'), 110.92 (C-5'), 87.25 (C-5), 81.03 (C-6), 80.23 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 68.13 (OCH_2), 63.83 (NOCH_3), 52.99 (CO_2CH_3), 34.46 (C-2), 28.10 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 24.21 (C-3), 18.83 (C-4), 16.03 (CH_3); **EM** (IE) m/z (%) 479 (M^+ , 26), 423 (3), 406 (16), 392 (4), 217 (6), 206 (100), 176 (8), 162 (11), 159 (2), 146 (9), 132 (26), 131 (58), 116 (95), 105 (5), 59 (25), 57 (21); **EMAR** m/z calculada para $\text{C}_{28}\text{H}_{33}\text{NO}_6$ 479.2308, encontrada 479.2302.



6-(4-(2-((*E*)-2-Metoxi-1-(metoxiimino)-2-oxoetil)benciloxi)-3-metilfenil)hexanoato de *terc*-butilo (104). La hidrogenación de 499.4 mg (1.041 mmol) del alquino **103** siguiendo el mismo procedimiento que para **101** y utilizando 28.9 mg (0.031 mmol) de $\text{Rh}(\text{PPh}_3)_3\text{Cl}$ y 9.5 mL de THF, proporcionó, tras la purificación cromatográfica con hexano-acetato de etilo (8:2) como eluyente, 455.8 mg del éster *terc*-butílico **104** (91%) como un semisólido ligeramente coloreado.

Datos espectroscópicos: IR (NaCl) ν_{max} (cm^{-1}) 2976m, 2933m, 2857d, 1728f, 1609d, 1592d, 1503f, 1456d, 1437m, 1367f, 1219f, 1155f, 1133f, 1069f, 1046d, 1020f, 1046d, 1020f, 957d, 759d; **^1H -RMN** (300 MHz) 7.58 (1H, d, $J = 7.4$ Hz, H-3''), 7.44 (1H, td, $J = 7.6, 7.4, 1.5$ Hz, H-4''), 7.38 (1H, td, $J = 7.6, 7.4, 1.5$ Hz, H-5''), 7.19 (1H, dd, $J = 7.4, 1.5$ Hz, H-6''), 6.94 (1H, s, H-2'), 6.88 (1H, dd, $J = 8.2, 1.8$ Hz, H-6'), 6.67 (1H, d, $J = 8.2$ Hz, H-5'), 4.92 (2H, s, OCH_2), 4.03 (3H, s, NOCH_3), 3.82 (3H, s, CO_2CH_3), 2.49 (2H, t, $J = 7.6$ Hz, H₂-6), 2.22 (5H, m, CH_3 y H₂-2), 1.67-1.51 (4H, m, H₂-5 y H₂-3), 1.43 (9H, s, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 1.33 (2H, m, H₂-4); δ **^{13}C -RMN** (75 MHz) δ 172.25 (CO_2^tBu), 163.22 (CO_2CH_3), 156.64 (C-4'), 149.32 (CN), 135.66 (C-1''), 134.66 (C-1'), 130.82

(C-6'), 129.58 (C-4''), 128.88 (C-2''), 128.41 (C-6''), 127.50 (C-5''), 127.46 (C-3''), 126.64 (C-3'), 126.20 (C-2'), 111.05 (C-5'), 79.93 (C(CH₃)₃), 68.10 (OCH₂), 63.81 (NOCH₃), 52.97 (CO₂CH₃), 35.50 (C-2), 34.82 (C-6), 31.41 (C-5), 28.68 (C-4). 28.08 (C(CH₃)₃), 24.91 (C-3), 16.25 (CH₃); **EM** (IE) *m/z* (%) 483 (M⁺, 4), 452 (4), 396 (7), 206 (94), 176 (8), 162 (12), 146 (9), 132 (28), 131 (57), 121 (19), 116 (100), 105 (6), 91 (10), 57 (40); **EMAR** *m/z* calculada para C₂₈H₃₇NO₆ 483.2621, encontrada 483.2632.

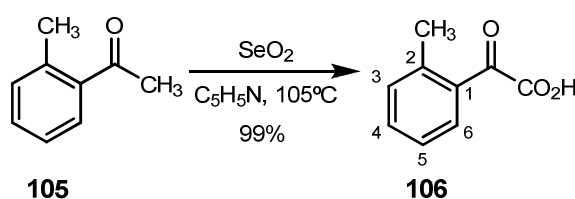


Ácido 6-((4-(2-((*E*)-2-metoxi-1-(metoxiimino)-2-oxoetil)encil)oxi)-3-metilfenil)hexanoico (Hapteno KMb6, 75). Siguiendo el procedimiento descrito para la preparación del hapteno KMa6 (74), a partir de 159 mg (0.329 mmol) del éster *tert*-butílico **104** y 6.8 mL de ácido fórmico se obtuvieron tras la purificación cromatográfica, usando también en este caso CHCl₃ como eluyente, 127.8 mg del hapteno KMb6 (75, 91%) como un aceite oscuro.

Datos espectroscópicos: IR (NaCl) ν_{\max} (cm⁻¹) 3325d (ancha), 2937f, 2856m, 2660m, 1727f, 1708f, 1609d, 1503f, 1437m, 1380d, 1317m, 1251f, 1220f, 1132m, 1070f, 1046d, 1019f, 938m, 788d, 760d, 140d; ¹H-RMN (300 MHz) 7.59 (1H, d, *J* = 7.4 Hz, H-3''), 7.45 (1H, td, *J* = 7.6, 7.4, 1.4 Hz, H-4''), 7.39 (1H, td, *J* = 7.6, 7.4, 1.5 Hz, H-5''), 7.21 (1H, dd, *J* = 7.4, 1.4 Hz, H-6''), 6.96 (1H, d, *J* = 1.8 Hz, H-2'), 6.90 (1H, dd, *J* = 8.2, 1.8 Hz, H-6'), 6.69 (1H, d, *J* = 8.2 Hz, H-5'), 4.94 (2H, s, OCH₂), 4.04 (3H, s, NOCH₃), 3.83 (3H, s, CO₂CH₃), 2.52 (2H, t, *J* = 7.5 Hz, H₂-6), 2.36 (2H, t, *J* = 7.5 Hz, H₂-2), 2.24 (3H, s; CH₃), 1.74–1.54 (4H, m, H₂-5, H₂-3), 1.38 (2H, m, H₂-4); δ ¹³C-RMN (75 MHz) δ 180.04 (CO₂H), 163.20 (CO₂CH₃), 154.64 (C-4'), 149.28 (CN),

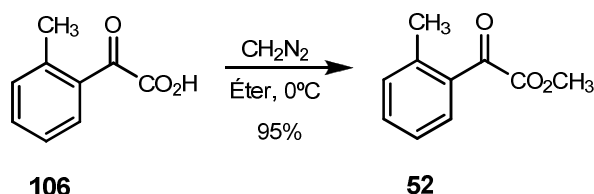
135.82 (C-1''), 134.46 (C-1'), 130.78 (C-6'), 129.54 (C-4''), 128.85 (C-2''), 128.39 (C-6''), 127.48 (C-5''), 127.43 (C-3''), 126.63 (C-3'), 126.16 (C-2'), 111.03 (C-5'), 68.08 (OCH₂), 63.75 (NOCH₃), 52.92 (CO₂CH₃), 34.71 (C-6), 33.92 (C-2), 31.29 (C-5), 28.59 (C-4), 24.45 (C-3), 16.20 (CH₃); **EM** (IE) *m/z* (%) 427 (M⁺, 25), 396 (4), 337 (3), 206 (61), 176 (4), 162 (8), 146 (9), 135 (10), 132 (23), 131 (51), 121 (42), 116 (100), 105 (8), 91 (15), 59 (44); **EMAR** *m/z* calculada para C₂₄H₂₉NO₆ 427.1995, encontrada 427.2004.

5.2.2.3. Síntesis del hapteno KMc6

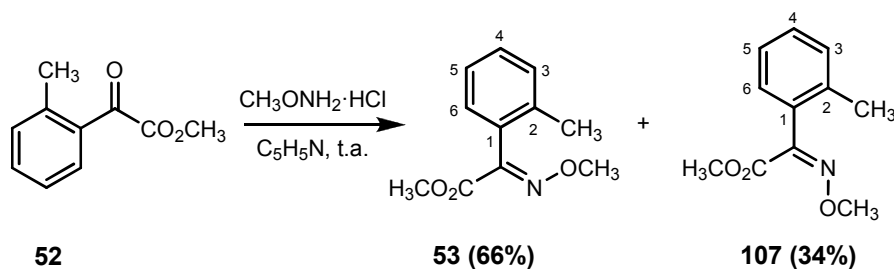


Ácido 2-oxo-2-*o*-tolilacético (106). A una disolución que contenía 1 mL (1.03 g, 7.65 mmol) de la cetona **105** en 20 mL de piridina seca se le añadieron 1.3 g (11.47 mmol) de SeO₂ recientemente sublimado. La suspensión se mantuvo con buena agitación a 110 °C durante 17 h. Transcurrido este tiempo, se dejó que la mezcla de reacción alcanzara temperatura ambiente y se filtró para eliminar el selenio (sólido negro). El filtrado se destiló a vacío (45 °C, 60 mmHg) para eliminar la piridina. El residuo obtenido se disolvió en 100 mL de disolución de NaOH al 5% y se extrajo con éter etílico. La fase acuosa se acidificó con HCl concentrado hasta pH 1 y se re-extrajo con acetato de etilo. Las fases orgánicas reunidas se lavaron con disolución saturada de NaCl, se secaron sobre Na₂SO₄ anhidro y se filtraron. Después de eliminar el disolvente a vacío se obtuvo el ácido **106** como un semisólido color crema (1.248 g, 99%). El compuesto **106** ha sido previamente descrito (CAS 150781-72-9). Las propiedades espectroscópicas del producto obtenido coinciden con las anteriormente descritas (Zhu *et al.*, 2005), a excepción del ¹³C-RMN y el EM, cuyas asignaciones hasta la fecha no han sido especificadas.

Datos espectroscópicos: ^{13}C -RMN (75 MHz) δ 187.20 (CO), 165.22 (CO₂H), 141.80 (C-2), 134.21 (C-4), 132.87 (C-6), 132.35 (C-3), 130.40 (C-1), 125.95 (C-5), 21.50 (CH₃); **EM** (IE) m/z (%) 164 (M⁺, 1), 136 (1), 120 (9), 119 (100), 91 (70), 89 (8), 74 (1), 65 (23), 63 (9), 51 (1); **EMAR** m/z calculada para C₉H₈O₃ 164.0473, encontrada 164.0476.



2-Oxo-2-o-tolilacetato de metilo (52). A una disolución agitada y enfriada a 0 °C que contenía 222 mg (1.35 mmol) del α -cetoácido **106** disuelto en 5 mL de éter etílico seco, se le añadió gota a gota una disolución de diazometano en éter hasta que la disolución permaneció de color amarillo. Seguidamente, tras eliminar el disolvente a vacío, el residuo obtenido se purificó por cromatografía de columna con hexano-éter etílico (6:4), lo que proporcionó 217.7 mg (95%) del α -cetoéster **52**, como un aceite ligeramente amarillo. El compuesto **52** ha sido previamente descrito (CAS 34966-54-6). Las propiedades espectroscópicas del producto obtenido coinciden con las anteriormente descritas (Wu *et al.*, 2008).

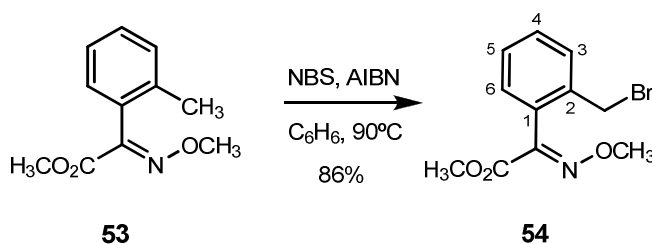


2-(E)-(Metoxiimino)-2-o-tolilacetato de metilo (53). Preparado mediante un procedimiento análogo al descrito para la preparación de **96**; la reacción de 200 mg (1.122 mmol) del α -cetoéster **52** y 375 mg (4.488 mmol) de clorhidrato de *o*-metilhidroxilamina proporcionó tras 21 h de reacción un crudo que se purificó por cromatografía de columna con hexano-acetato de

etilo (8:2). El producto **107** fue eluido en primer lugar como un aceite incoloro (56.3 mg, 24%), seguido de **53** (152.8 mg, 66%) como un sólido blanco. Estos productos han sido previamente descrito (CAS 120974–97–2 para **53** y CAS 144106–03–6 para **107**). Las propiedades físicas y espectroscópicas de ambos productos obtenidos coinciden con las anteriormente descritas (Li *et al.*, 2006a y b; Li y Yang, 2009), a excepción del ^{13}C -RMN, cuya asignación hasta la fecha no ha sido especificada.

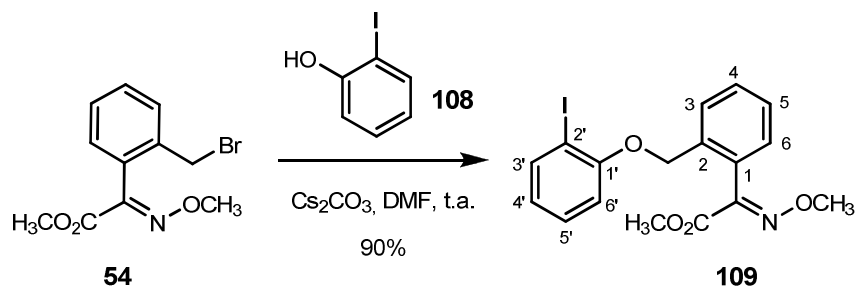
Datos espectroscópicos de 53: ^{13}C -RMN (75 MHz) δ 163.50 (CO_2CH_3), 149.98 (CN), 135.97 (C-2), 130.20 (C-1), 129.90 (C-4), 129.30 (C-6), 127.87 (C-3), 125.44 (C-5), 63.72 (NOCH_3), 52.93 (CO_2CH_3), 19.48 (CH_3).

Datos espectroscópicos de 107: ^{13}C -RMN (75 MHz) δ 163.79 (CO_2CH_3), 150.87 (CN), 137.37 (C-2), 131.25 (C-4), 129.82 (C-1), 129.70 (C-6), 128.89 (C-3), 125.93 (C-5), 62.98 (NOCH_3), 52.32 (CO_2CH_3), 20.82 (CH_3).



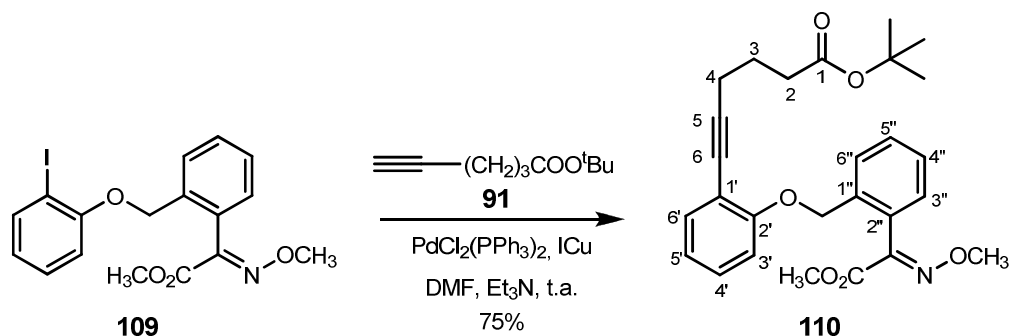
2-(2-(Bromometil)fenil)-2-(E)-(metoxiimino)acetato de metilo (54). Preparado siguiendo el procedimiento descrito para **98**; la purificación cromatográfica, utilizando hexano–éter etílico (9:1) como eluyente, del crudo de reacción obtenido a partir de 98 mg (0.475 mmol) de acetato de metoxiimino **53**, 84 mg (0.475 mmol) de NBS, 4.6 mg (0.028 mmol) de AIBN y 2.2 mL de benceno seco proporcionó 116.8 mg del bromuro bencílico **54** (86%) como un aceite oscuro. El compuesto **54** ha sido previamente descrito (CAS 133409–72–0). Las propiedades físicas y espectroscópicas del producto obtenido coinciden con las anteriormente descritas (Li y Yang, 2009), a excepción del ^{13}C -RMN, cuya asignación hasta la fecha no ha sido especificada.

Datos espectroscópicos: ^{13}C -RMN (75 MHz) δ 163.05 (CO_2CH_3), 148.84 (CN), 135.60 (C-2), 130.27 (C-1), 130.10 (C-6), 129.75 (C-5), 128.59 (C-3), 128.35 (C-4), 63.83 (NOCH_3), 53.05 (CO_2CH_3), 30.73 (CH_2Br).



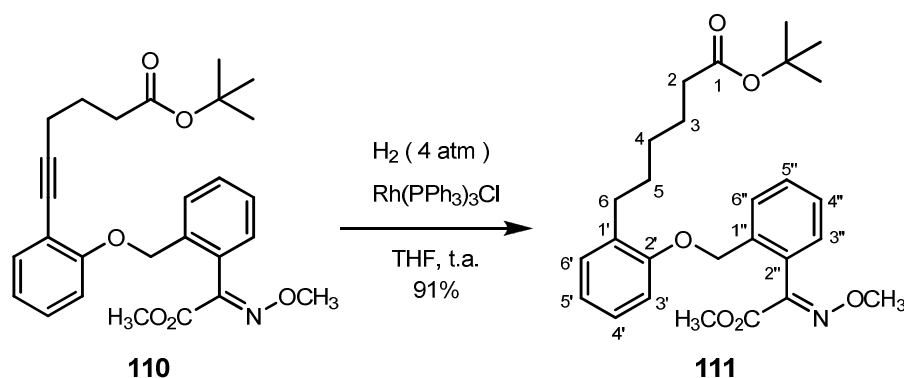
2-(2-((2-Iodofenoxi)metil)fenil)-2-(E)-(metoxiimino) acetato de metilo (109). Preparado siguiendo el procedimiento descrito para la preparación de **99**; el residuo obtenido tras 19 h de reacción a partir de una disolución que contenía 74.2 mg (0.259 mmol) del bromuro bencílico **54**, 30 μL (0.259 mmol) de 2-iodofenol (**108**), 125 mg (0.388 mmol) de Cs_2CO_3 y 1.5 mL de DMF seca fue purificado por cromatografía en columna, utilizando hexano-éter etílico (7:3) como eluyente, obteniéndose 72.6 mg del ioduro arílico **109** (90%) como un sólido blanco.

Datos físicos y espectroscópicos: Pf. 87–89 $^\circ\text{C}$ (Hexano–Benceno); IR (KBr) ν_{max} (cm^{-1}) 3000d, 2945d, 1715f, 1579d, 1470m, 1446m, 1318m, 1222m, 1069f, 1012f, 948m, 745f; ^1H -RMN (300 MHz) δ 7.78 (1H, dd, $J = 7.8, 1.6$ Hz, H3'), 7.71 (1H, dd, $J = 7.7, 1.2$ Hz, H6), 7.46 (1H, td, $J = 7.7, 7.6, 1.4$ Hz, H5), 7.38 (1H, td, $J = 7.6, 7.4, 1.2$ Hz, H4), 7.24–7.16 (2H, m, H3 y H5'), 6.77–6.68 (2H, m, H4' y H6'), 5.01 (2H, s, OCH_2), 4.05 (3H, s, NOCH_3), 3.87 (3H, s, CO_2CH_3); ^{13}C -RMN (75 MHz) δ 163.71 (CO_2CH_3), 157.41 (C-1'), 149.21 (CN), 139.56 (C3'), 132.20 (C-2), 129.80 (C-5), 129.40 (C-3), 128.27 (C-5'), 127.63 (C-4), 127.43 (C-6), 125.21 (C-1), 122.87 (C-4'), 112.59 (C-6'), 85.90 (C-2'), 68.76 (OCH_2), 63.91 (NOCH_3), 53.14 (CO_2CH_3); EMAR (ES) m/z calculada para $\text{C}_{17}\text{H}_{16}\text{INNaO}_4$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 448.0022, encontrada 448.0019.



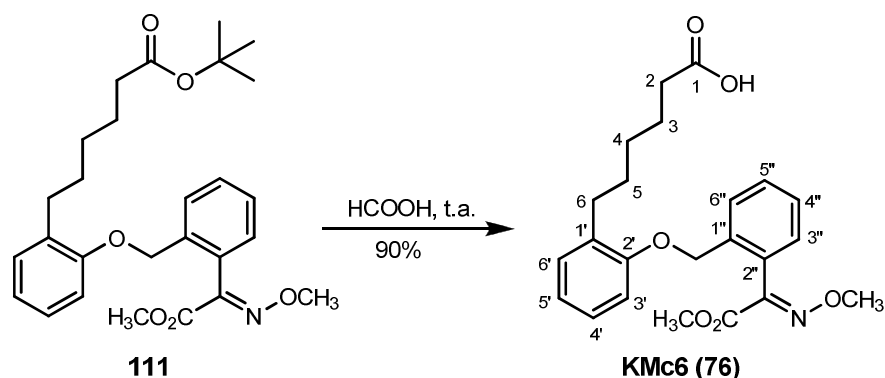
6-(2-(2-((*E*)-2-Metoxi-1-(metoxiimino)-2-oxoetil) benciloxi) fenil) hex-5-inoato de *terc*-butilo (110). Preparado siguiendo el mismo procedimiento descrito para **100**; la purificación por cromatografía, utilizando hexano-éter etílico (8:2) como eluyente, del residuo obtenido tras 2 h de reacción a partir de una disolución que contenía 78.0 mg (0.239 mmol) del ioduro arílico **109**, 1.4 mg (3%) de CuI, 48.0 mg (0.287 mmol) de hexin-5-ionato de *terc*-butilo (**91**), 1.0 mL de DMF seca, 0.5 mL de de Et₃N y 5.0 mg (0.007 mmol) de Pd(PPh₃)₂Cl₂, proporcionó 65.6 mg del compuesto **110** (75%) como un aceite incoloro.

Datos espectroscópicos: IR (NaCl) ν_{\max} (cm⁻¹) 2975d, 2934d, 1735f, 1488d, 1441d, 1369d, 1307d, 1214m, 1137f, 1064m, 1013m, 961d, 754m; ¹H-RMN (300 MHz) δ 7.69 (1H, dd, $J = 7.7, 0.7$ Hz, H-3''), 7.44 (1H, td, $J = 7.7, 7.6, 1.4$ Hz, H-4''), 7.39–7.32 (2H, m, H-3' y H-5''), 7.19–7.11 (2H, m, H-6'' y H-5'), 6.87 (1H, dt, $J = 7.5, 7.5, 0.7$ Hz, H-4'), 6.76 (1H, d, $J = 8.3$ Hz, H-6'), 5.01 (2H, s, OCH₂), 4.05 (3H, s, NOCH₃), 3.86 (3H, s, CO₂CH₃), 2.53 (2H, t, $J = 7.2$ Hz, H-4), 2.42 (2H, t, $J = 7.2$ Hz, H-2), 1.91 (2H, q, $J = 7.2$ Hz, H-3), 1.44 (9H, s, C(CH₃)₃); ¹³C-RMN (75 MHz) δ 172.64 (CO₂^tBu), 158.81 (CO₂CH₃), 157.01 (C-1'), 149.18 (CN), 135.42 (C-1''), 133.47 (C-3'), 129.60 (C-4''), 128.82 (C-5'), 128.02 (C-6''), 127.39 (C-5''), 127.08 (C-3''), 120.84 (C-4'), 119.74 (C-2''), 113.67 (C-2'), 112.57 (C-6'), 110.55 (C-5), 93.51 (C-6), 80.19 (C(CH₃)₃), 68.04 (OCH₂), 63.85 (NOCH₃), 53.06 (CO₂CH₃), 34.47 (C-2), 28.11 (C(CH₃)₃), 24.21 (C-3), 19.22 (C-4); **EMAR** (ES) m/z calculada para C₂₇H₃₁NNaO₆ [M+Na]⁺ 488.2049, encontrada 488.2047.



6-(2-(2-((*E*)-2-Metoxi-1-(metoxiimino)-2-oxoetil) benziloxi) fenil) hexanoato de *terc*-butilo (111). Preparado siguiendo el procedimiento descrito para **101**; la purificación cromatográfica, utilizando hexano–éter etílico (de 9:1 a 8:2) como eluyente, del crudo de reacción obtenido a partir de 65.6 mg (0.180 mmol) del alquino **110**, 5.0 mg (0.005 mmol) de $\text{Rh}(\text{PPh}_3)_3\text{Cl}$ y 1.6 mL de THF proporcionó 60.8 mg del éster *terc*-butílico **111** (92%) como un aceite incoloro.

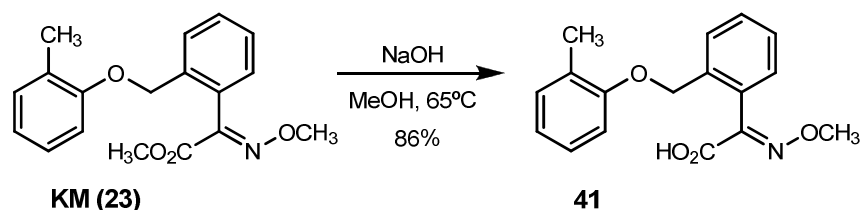
Datos espectroscópicos: IR (NaCl) ν_{max} (cm^{-1}) 2967d, 2936m, 2862d, 1727f, 1594d, 1492d, 1450m, 1366d, 1318m, 1224f, 1156f, 1068f, 1019f, 955d, 752m; $^1\text{H-RMN}$ (300 MHz) δ 7.57 (1H, dd, $J = 7.6, 1.4$ Hz, H-3''), 7.45 (1H, td, $J = 7.6, 7.6, 1.5$ Hz, H-4''), 7.38 (1H, td, $J = 7.6, 7.5, 1.4$ Hz, H-5''), 7.19 (1H, dd, $J = 7.5, 1.5$ Hz, H-6''), 7.15–7.05 (2H, m, H-6' y H-4'), 6.87 (1H, td, $J = 7.4, 7.4, 1.0$ Hz, H-5'), 6.76 (1H, d, $J = 8.1$ Hz, H-3'), 4.94 (2H, s, OCH_2), 4.04 (3H, s, NOCH_3), 3.84 (3H, s, CO_2CH_3), 2.65 (2H, t, $J = 7.5$ Hz, H-6), 2.19 (2H, t, $J = 7.5$ Hz, H-2), 1.68–1.55 (4H, m, H-5 y H-3), 1.41–1.32 (11H, m, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$ y H-4); $^{13}\text{C-RMN}$ (75 MHz) δ 173.27 (CO_2^tBu), 163.23 (CO_2CH_3), 156.23 (C-2'), 149.21 (CN), 135.83 (C-1''), 131.27 (C-1'), 129.82 (C-6'), 129.65 (C-4''), 128.59 (C-2''), 128.29 (C-6''), 127.39 (C-5''), 127.16 (C-3''), 126.77 (C-4'), 120.71 (C-5'), 111.61 (C-3'), 79.88 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 67.74 (OCH_2), 63.84 (NOCH_3), 52.97 (CO_2CH_3), 35.57 (C-2), 29.96 (C-6), 29.95 (C-5), 28.44 (C-4), 28.11 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 25.30 (C-3); **EMAR** (ES) m/z calculada para $\text{C}_{27}\text{H}_{35}\text{NNaO}_6$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 492.2362, encontrada 492.2357.



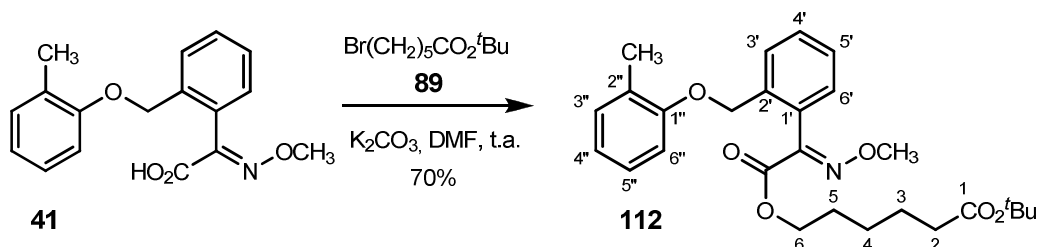
Ácido 6-(2-(2-((*E*)-2-metoxi-1-(metoxiimino)-2-oxoetil)benziloxi)fenil)hexanoíco (Hapteno KMc6, 76). El éster *tert*-butílico **111** fue hidrolizado siguiendo el procedimiento general descrito para la preparación del hapteno KMa6 (**74**); la purificación cromatográfica del residuo obtenido a partir de 60.8 mg (0.165 mmol) del éster *tert*-butílico **111** y 3.4 mL de ácido fórmico, usando CHCl_3 como eluyente, proporcionó 46.5 mg del hapteno KMc6 (**76**, 90%) como un sólido blanco.

Datos físicos y espectroscópicos: Pf. 86–89 °C (Hexano); IR (KBr) ν_{max} (cm^{-1}) 3031–2935f (ancha), 2770d, 1718f, 1596d, 1493m, 1455m, 1287m, 1233f, 1203f, 1071f, 1049m, 1020f, 761m, 743m, 678d ; $^1\text{H-RMN}$ (300 MHz) δ 9.90 (1H, s, OH), 7.58 (1H, dd, $J = 7.6, 1.4$ Hz, H–3''), 7.45 (1H, td, $J = 7.6, 7.5, 1.5$ Hz, H–4''), 7.38 (1H, td, $J = 7.6, 7.5, 1.4$ Hz, H–5''), 7.20 (1H, dd, $J = 7.6, 1.5$, Hz, H–6''), 7.15–7.06 (2H, m, H–4' y H–6'), 6.88 (1H, td, $J = 7.4, 7.4, 1.0$ Hz, H–5'), 6.77 (1H, d, $J = 8.1$ Hz, H–3'), 4.95 (2H, s, OCH_2), 4.04 (3H, s, NOCH_3), 3.84 (3H, s, CO_2CH_3), 2.66 (2H, t, $J = 7.5$ Hz, H–6), 2.38 (2H, t, $J = 7.5$ Hz, H–2), 1.72–1.56 (4H, m, H–5 y H–3), 1.45–1.33 (2H, m, H–4); $^{13}\text{C-RMN}$ (75 MHz) δ 179.40 (CO_2H), 163.26 (CO_2CH_3), 156.24 (C–2'), 149.19 (CN), 135.78 (C–1''), 131.13 (C–1'), 129.83 (C–6''), 129.66 (C–4''), 128.62 (C–2''), 128.31 (C–6''), 127.44 (C–5''), 127.16 (C–3''), 126.83 (C–4'), 120.73 (C–5'), 111.62 (C–3'), 67.82 (OCH_2), 63.82 (NOCH_3), 52.97 (CO_2CH_3), 33.89 (C–2), 29.93 (C–6), 29.37 (C–5), 28.87 (C–4), 24.52 (C–3) ; **EMAR** (ES) m/z calculada para $\text{C}_{23}\text{H}_{27}\text{NNaO}_6$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 436.1736, encontrada 436.1736.

5.2.2.4. Síntesis del hapteno KMe6



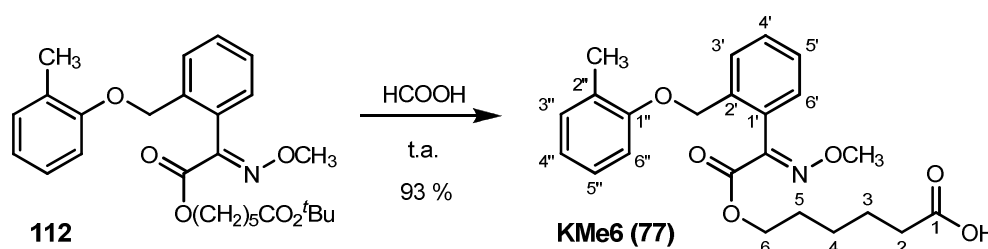
Ácido (*E*)-2-(metoxiimino)-2-(2-(*o*-toliloximetil)fenil)acético (41). 5 g de KM (15.96 mmol), 70 mL metanol y 10 mL de una disolución 5 M de NaOH se agitaron a reflujo durante 5 h. Después de este tiempo, se eliminó el metanol a vacío, se añadió agua al residuo y se extrajo con acetato de etilo. La fase acuosa se enfrió a 0 °C y se acidificó con HCl 2 M hasta pH 3. El producto fue extraído con acetato de etilo. Las fases orgánicas se lavaron con disolución saturada de NaCl, se secaron sobre MgSO₄ anhidro y se filtraron. Una vez eliminado el disolvente se obtuvieron 4.09 g del ácido **41** (86%) como un sólido blanco. Este producto ha sido previamente descrito (CAS 1007364–30–8). Las propiedades físicas y espectroscópicas del producto obtenido coinciden con las anteriormente descritas (Mercader *et al.*, 2008a).



6-(2-(*E*)-2-(Metoxiimino)-2-(2-(*o*-toliloximetil) fenil) acetoxi)) hexanoato de *terc*-butilo (112). A una disolución de 100 mg (0.334 mmol) del ácido **41** y 54.4 mg (0.401 mmol) de K₂CO₃ anhidro en 13 mL de DMF seca se añadieron, bajo atmósfera de nitrógeno, 100.6 mg (0.401 mmol) del bromuro alquílico **89**. La mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante 24 h. Pasado este tiempo, la mezcla de reacción se vertió sobre agua y se extrajo con acetato de etilo. Las fases orgánicas se lavaron con salmuera, se secaron sobre Na₂SO₄ anhidro y se filtraron. El residuo obtenido tras eliminar el disolvente a vacío, se purificó por cromatografía de columna, usando como

eluyente hexano–éter etílico (de 8:2 a 7:3), obteniéndose el compuesto **112** como un aceite incoloro (110 mg, 70%).

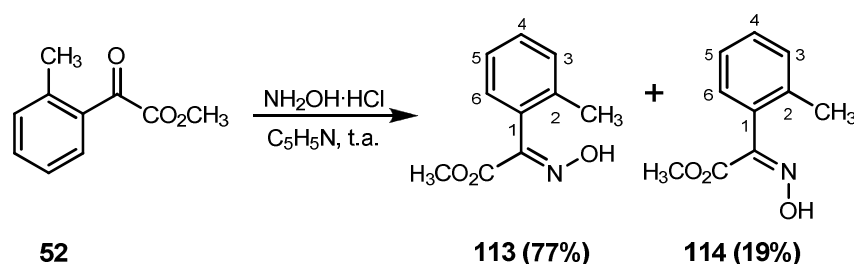
Datos espectroscópicos: IR (NaCl) ν_{\max} (cm⁻¹) 2969m, 2938m, 2868d, 1726f, 1602d, 1586d, 1494m, 1459m, 1367m, 1313m, 1214f, 1194m, 1151f, 1123m, 1068f, 1013m, 953d, 847d, 752m; ¹H-RMN (300 MHz) δ 7.57 (1H, d, $J = 7.5$ Hz, H-6'), 7.44 (1H, td, $J = 7.5, 7.5, 1.5$ Hz, H-5'), 7.37 (1H, td, $J = 7.5, 7.5, 1.4$ Hz, H-4'), 7.20 (1H, dd, $J = 7.4, 1.4$ Hz, H-3'), 7.12 (1H, m, H-3'' parcialmente solapado con H-5''), 7.10 (1H, m, H-5'' parcialmente solapado con H-3''), 6.85 (1H, td, $J = 7.5, 7.3, 0.7$ Hz, H-4''), 6.76 (1H, d, $J = 8.0$ Hz, H-6''), 4.95 (2H, s, OCH₂), 4.20 (2H, t, $J = 6.8$ Hz, H₂-6), 4.02 (3H, s, NOCH₃), 2.25 (3H, s, CH₃), 2.15 (2H, t, $J = 7.5$ Hz, H₂-2), 1.68–1.50 (4H, m, H₂-5 y H₂-3), 1.43 (9H, s C(CH₃)₃), 1.29 (2H, m, H₂-4); ¹³C-RMN (75 MHz) δ 172.88 (CO₂^tBu), 162.81 (CO₂), 156.53 (C-1''), 149.48 (CN), 135.05 (C-2'), 130.67 (C-3''), 129.49 (C-5'), 129.08 (C-1'), 128.45 (C-3'), 127.44 (C-4'), 127.42 (C-6'), 126.96 (C-2''), 126.67 (C-5''), 120.58 (C-4''), 111.14 (C-6''), 80.06 (C(CH₃)₃), 67.99 (OCH₂), 65.88 (C-6), 63.54 (NOCH₃), 35.29 (C-2), 28.11 (C-5), 28.09 (C(CH₃)₃), 25.22 (C-4), 24.58 (C-3), 16.30 (CH₃); EM (IE) m/z (%) 469 (M⁺, 2), 382 (6), 362 (5), 306 (11), 282 (2), 275 (3), 223 (3), 205 (15), 192 (100), 116 (51), 97 (7), 89 (3), 73 (2), 69 (12), 57 (38); EMAR m/z calculada para C₂₇H₃₅NO₆ 469.2464, encontrada 469.2499.



Ácido 6-(2-(E)-2-(metoxiimino)-2-(2-(*o*-toliloximetil) fenil) acetoxi) hexanoíco (Hapteno KMe6, 77). Preparado mediante un procedimiento análogo al descrito para la preparación del hapteno KMa6 (74); la purificación cromatográfica del residuo obtenido a partir de 36.9 mg (0.078 mmol) del éster *tert*-butílico **112** y 1.6 mL de ácido fórmico proporcionó 30.6 mg del hapteno KMe6 (**77**, 93%) como un aceite incoloro.

Datos espectroscópicos: IR (NaCl) ν_{\max} (cm^{-1}) 3329m (ancha), 2940m, 2804d, 1709f, 1601d, 1592d, 1494m, 1462m, 1388d, 1312m, 1240f, 1195m, 1123m, 1069f, 1012m, 953d, 753m; **$^1\text{H-RMN}$** (300 MHz) δ 7.57 (1H, d, $J = 7.5$ Hz, H-6'), 7.44 (1H, td, $J = 7.5, 7.5, 1.6$ Hz, H-5'), 7.38 (1H, td, $J = 7.5, 7.5, 1.4$ Hz, H-4'), 7.20 (1H, dd, $J = 7.5, 1.6$ Hz, H-3'), 7.13 (1H, m, H-3'' parcialmente solapado con H-5''), 7.10 (1H, m, H-5'' parcialmente solapado con H-3''), 6.85 (1H, td, $J = 7.5, 7.4, 0.8$ Hz, H-4''), 6.76 (1H, d, $J = 8.1$ Hz, H-6''), 4.96 (2H, s, OCH_2), 4.21 (2H, t, $J = 6.7$ Hz, H_2 -6), 4.03 (3H, s, NOCH_3), 2.29 (2H, t, $J = 7.5$ Hz, H_2 -2), 2.25 (3H, s, CH_3), 1.72–1.52 (4H, m, H_2 -5 y H_2 -3), 1.33 (2H, m, H_2 -4); **$^{13}\text{C-RMN}$** (75 MHz) δ 179.35 (CO_2H), 162.79 (CO_2CH_2), 156.52 (C-1''), 149.47 (CN), 135.62 (C-2'), 130.67 (C-3''), 129.49 (C-5'), 129.09 (C-1'), 128.46 (C-3'), 127.46 (C-4' y C-6'), 126.95 (C-2''), 126.66 (C-5''), 120.61 (C-4''), 111.13 (C-6''), 68.03 (OCH_2), 65.73 (C-6), 63.73 (NOCH_3), 33.66 (C-2), 28.01 (C-5), 25.20 (C-4), 24.09 (C-3), 16.28 (CH_3); **EM** (IE) m/z (%) 413 (M^+ , 1), 306 (9), 192 (53), 162 (1), 144 (1), 116 (100), 108 (8), 97 (7), 89 (7), 78 (2), 69 (26), 55 (13); **EMAR** m/z calculada para $\text{C}_{23}\text{H}_{27}\text{NO}_6$ 413.1838, encontrada 413.1830.

5.2.2.5. Síntesis del hapteno KMo6

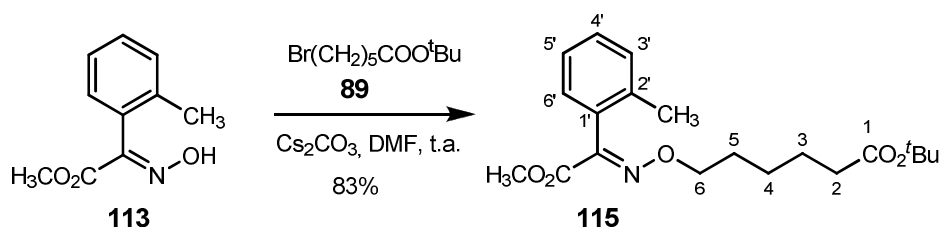


2-(E)-(Hidroxiimino)-2-*o*-tolilacetato de metilo (113). 177 mg (0.993 mmol) del α -cetoéster **52** y 276 mg (3.972 mmol) de clorhidrato de hidroxilamina se disolvieron, bajo atmósfera de nitrógeno, en 2.5 mL de piridina seca. La suspensión resultante se agitó a temperatura ambiente durante toda la noche (21 h). Pasado este tiempo, la mezcla de reacción se vertió sobre agua y se extrajo con acetato de etilo. Las fases orgánicas se lavaron con disolución saturada de NaCl, se secaron sobre Na_2SO_4 anhidro y se filtraron. El residuo resultante después de eliminar el disolvente a vacío fue purificado por

cromatografía de columna con hexano–éter etílico (de 9:1 a 7:3). El producto **114** fue eluido en primer lugar como un aceite incoloro (36.1 mg, 19%), seguido de **113** (147.6 mg, 77%), como un sólido blanco. Estos productos han sido previamente descrito (CAS 178240–01–2 para **113** y CAS 178240–02–3 para **114**). Las propiedades físicas y espectroscópicas de ambos productos obtenidos coinciden con las anteriormente descritas (Li *et al.*, 2006a y b), a excepción del ^{13}C –RMN y el EM, cuyas asignaciones hasta la fecha no ha sido especificadas.

Datos espectroscópicos de 113: ^{13}C –RMN (75 MHz) δ 163.57 (CO_2CH_3), 150.64 (CN), 136.32 (C–2), 130.03 (C–4), 129.55 (C–1), 129.37 (C–6), 128.03 (C–3), 125.54 (C–5), 52.93 (CO_2CH_3), 19.55 (CH_3); **EMAR** (ES) m/z calculada para $\text{C}_{10}\text{H}_{11}\text{NNaO}_3$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 216.0637, encontrada 216.0638.

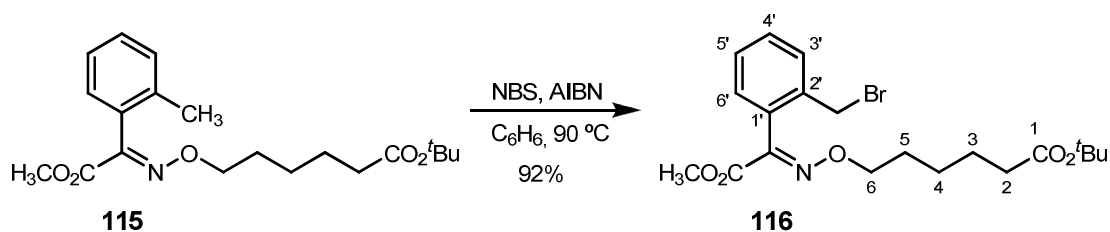
Datos espectroscópicos de 114: ^{13}C –RMN (75 MHz) δ 163.93 (CO_2CH_3), 150.40 (CN), 137.25 (C–2), 130.90 (C–4), 130.62 (C–1), 129.67 (C–6), 129.17 (C–3), 125.90 (C–5), 52.55 (CO_2CH_3), 20.35 (CH_3); **EMAR** (ES) m/z calculada para $\text{C}_{10}\text{H}_{11}\text{NNaO}_3$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 216.0637, encontrada 216.0640.



6-(2-(E)-Metoxi-2-oxo-1-oximino-2-phenylethyl) hexanoato de *tert*-butilo (115). A una disolución de 90 mg (0.466 mmol) de la oxima **113** y 228 mg (0.699 mmol) de Cs_2CO_3 anhidro en 1.7 mL de DMF seca se añadieron, bajo atmósfera de nitrógeno, 117 mg (0.466 mmol) del bromuro alquílico **89**. La mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante 4 h. Pasado este tiempo, la mezcla de reacción se vertió sobre agua y se extrajo con acetato de etilo. Las fases orgánicas se lavaron con salmuera y se secaron sobre Na_2SO_4 anhidro. El residuo obtenido tras filtrar y eliminar el disolvente a vacío, se purificó por cromatografía de columna, usando como eluyente

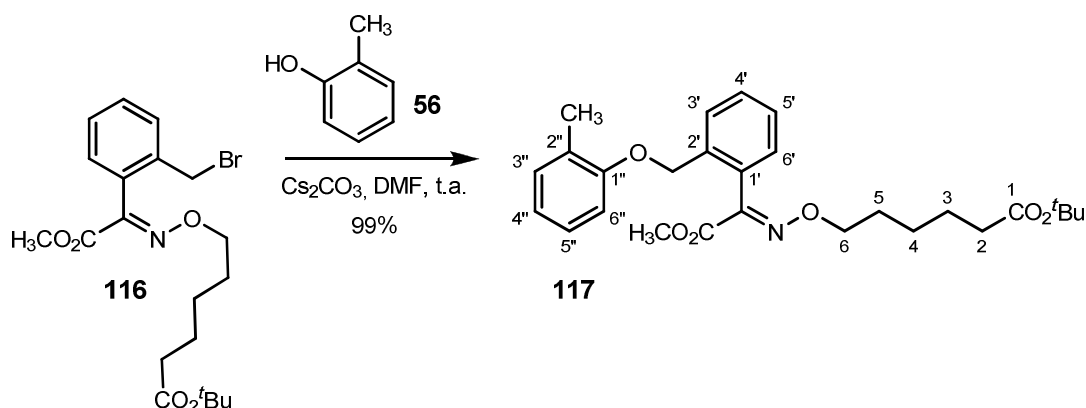
hexano–acetato de etilo (9:1), obteniéndose el compuesto **115** como un aceite incoloro (141 mg, 83%).

Datos espectroscópicos: IR (NaCl) ν_{\max} (cm^{-1}) 2973m, 2937m, 2858m, 1728f, 1655d, 1465d, 1437d, 1367m, 1321m, 1279d, 1219m, 1199d, 1152m, 1068m, 998m, 755m, 731d; **^1H –RMN** (300 MHz) δ 7.30 (1H, td, $J = 7.6, 7.0, 1.1$ Hz, H–5'), 7.18 (2H, m, H–4' y H–6'), 7.09 (1H, dd, $J = 7.3, 1.7$ Hz, H–3'), 4.25 (2H, t, $J = 6.8$ Hz, H₂–6), 3.86 (3H, s, CO₂CH₃), 2.18 (3H, s, CH₃), 2.17 (2H, t, $J = 7.4$ Hz, H₂–2), 1.68 (2H, q, $J = 7.4, 6.8$ Hz, H₂–5), 1.56 (2H, q, $J = 7.4, 7.4$ Hz, H₂–3), 1.43 (9H, s, C(CH₃)₃), 1.29 (2H, m, H₂–4); **^{13}C –RMN** (75 MHz) δ 172.90 (CO₂^tBu), 163.72 (CO₂CH₃), 149.79 (CN), 135.95 (C–2'), 130.60 (C–1'), 129.86 (C–6'), 129.15 (C–5'), 127.91 (C–3'), 125.42 (C–4'), 80.01 (C(CH₃)₃), 76.05 (C–6), 52.86 (CO₂CH₃), 35.38 (C–2), 28.74 (C–5), 28.09 (C(CH₃)₃), 25.16 (C–4), 24.74 (C–3), 19.53 (CH₃); **EM** (IE) m/z (%) 363 (M⁺, 0.2), 308 (0.4), 276 (4), 234 (19), 233 (15), 218 (6), 176 (65), 132 (29), 118 (22), 117 (34), 116 (20), 97 (14), 69 (21), 57 (100); **EMAR** m/z calculada para C₂₀H₂₉NO₅ 363.2046, encontrada 363.2044.



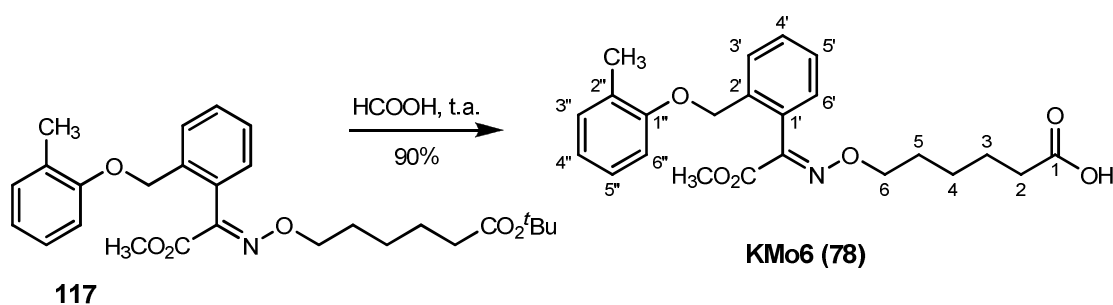
6-(1-(2-(Bromometil)fenil)-2-(E)-metoxi-2-oxoetilideneaminoxi) hexanoato de *terc*-butilo (116). Preparado mediante un procedimiento análogo al descrito para la preparación de **98**; la purificación cromatográfica, utilizando hexano–éter etílico (de 9:1 a 8:2) como eluyente, del crudo de reacción obtenido a partir de 123 mg (0.339 mmol) del compuesto **115**, 60.3 mg (0.339 mmol) de NBS, 3.3 mg (0.020 mmol) de AIBN y 1.5 mL de benceno seco proporcionó 137.8 mg del bromuro bencílico **116** (92%) como un aceite marrón.

Datos espectroscópicos: IR (NaCl) ν_{\max} (cm^{-1}) 2970d, 2938d, 1728f, 1588d, 1437d, 1367m, 1219m, 1152f, 1066m, 1001m, 847d, 758d; $^1\text{H-RMN}$ (300 MHz) δ 7.48 (1H, dd, $J = 7.4, 1.6$ Hz, H-6'), 7.40 (1H, td, $J = 7.4, 7.3, 1.7$ Hz, H-5'), 7.35 (1H, td, $J = 7.3, 7.3, 1.6$ Hz, H-4'), 7.13 (1H, dd, $J = 7.3, 1.7$ Hz, H-3'), 4.33 (2H, s, CH_2Br), 4.27 (2H, t, $J = 6.9$ Hz, H_2-6), 3.87 (3H, s, CO_2CH_3), 2.16 (2H, t, $J = 7.3$ Hz, H_2-2), 1.68 (2H, q, $J = 7.3, 6.9$ Hz, H_2-5), 1.54 (2H, q, $J = 7.4, 7.3$ Hz, H_2-3), 1.42 (9H, s, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 1.28 (2H, m, H_2-4); $^{13}\text{C-RMN}$ (75 MHz) δ 172.90 (CO_2^tBu), 163.77 (CO_2CH_3), 149.57 (CN), 138.22 (C-2'), 130.58 (C-1'), 130.11 (C-6'), 129.72 (C-5'), 128.67 (C-3'), 128.38 (C-4'), 80.04 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 76.34 (C-6), 53.07 (CO_2CH_3), 35.34 (C-2), 30.88 (CH_2Br), 28.69 (C-5), 28.08 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 25.13 (C-4), 24.70 (C-3); **EM** (FAB) m/z (%) 444 (M^++1 ^{81}Br , 78), 442 (M^++1 ^{79}Br , 70), 401 (4), 391 (12), 387 (98), 385 (100), 364 (23), 308 (53), 288 (11), 255 (5), 211 (8), 191 (10), 175 (26), 153 (96), 148 (17), 136 (82), 135 (70), 130 (27), 123 (10), 115 (53), 106 (27); **EMAR** m/z calculada para $\text{C}_{20}\text{H}_{29}^{79}\text{BrNO}_5$ [$\text{M}+\text{H}$] $^+$ 442.1229, encontrada 442.1181.



6-(2-(*E*)-Metoxi-2-oxo-1-(2-(*o*-toliloximetil) fenil) etilideneaminooxi) hexanoato de *terc*-butilo (117). Preparado siguiendo el procedimiento descrito para la preparación de **99**; el residuo obtenido tras 6 h de reacción a partir de una disolución que contenía 54.7 mg (0.124 mmol) del bromuro bencílico **116**, 12.8 μL (0.124 mmol) de *o*-cresol (**56**), 60.6 mg (0.186 mmol) de Cs_2CO_3 y 522 μL de DMF seca fue purificado por cromatografía en columna, utilizando hexano-éter etílico (9:1) como eluyente, obteniéndose 57.6 mg del éster *terc*-butílico **117** (99%) como un aceite incoloro.

Datos espectroscópicos: IR (NaCl) ν_{\max} (cm^{-1}) 2974d, 2935d, 1727f, 1602d, 1494d, 1460d, 1437d, 1367d, 1321d, 1241m, 1219m, 1152m, 1123f, 1068m, 1001m, 914d, 753m, 732m; **$^1\text{H-RMN}$** (300 MHz) δ 7.57 (1H, d, $J = 7.4$ Hz, H-6'), 7.44 (1H, td, $J = 7.4, 7.4, 1.4$ Hz, H-5'), 7.37 (1H, td, $J = 7.5, 7.4, 1.4$ Hz, H-4'), 7.19 (1H, dd, $J = 7.5, 1.4$ Hz, H-3'), 7.13 (1H, m, H-3'' parcialmente solapado con H-5''), 7.09 (1H, m, H-5'' parcialmente solapado con H-3''), 6.85 (1H, td, $J = 7.3, 7.2, 0.8$ Hz, H-4''), 6.75 (1H, d, $J = 8.1$ Hz, H-6''), 4.95 (2H, s, OCH_2), 4.23 (2H, t, $J = 6.8$ Hz, H_2-6), 3.81 (3H, s, CO_2CH_3), 2.25 (3H, s, CH_3), 2.14 (2H, t, $J = 7.5$ Hz, H_2-2), 1.66 (2H, q, $J = 7.1, 6.8$ Hz, H_2-5), 1.53 (2H, q, $J = 7.5, 7.1$ Hz, H_2-3), 1.42 (9H, s, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 1.27 (2H, m, H_2-4); **$^{13}\text{C-RMN}$** (75 MHz) δ 172.88 (CO_2^tBu), 163.39 (CO_2CH_3), 156.51 (C-1''), 148.96 (CN), 135.65 (C-2'), 130.65 (C-3''), 129.44 (C-5'), 129.10 (C-1'), 128.45 (C-3'), 127.44 (C-4'), 127.38 (C-6'), 126.88 (C-2''), 126.65 (C-5''), 120.56 (C-4''), 111.08 (C-6''), 79.99 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 76.21 (C-6), 67.99 (OCH_2), 52.87 (CO_2CH_3), 35.28 (C-2), 28.69 (C-5), 28.06 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 25.11 (C-4), 24.69 (C-3), 16.24 (CH_3); **EM** (IE) m/z (%) 469 (M^+ , 5), 382 (10), 360 (5), 306 (12), 282 (2), 275 (5), 223 (3), 205 (15), 192 (100), 116 (51), 97 (8), 89 (3), 73 (2), 69 (12), 57 (39); **EMAR** m/z calculada para $\text{C}_{27}\text{H}_{35}\text{NO}_6$ 469.2464, encontrada 469.2499.

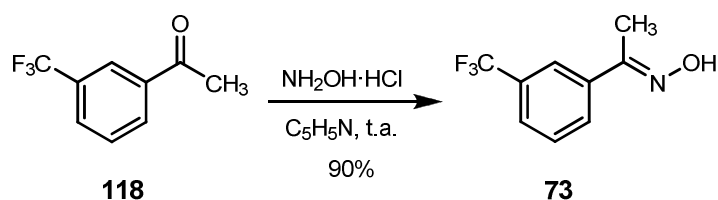


Ácido 6-(2-(*E*)-metoxi-2-oxo-1-(2-(*o*-toliloximetil)fenil)etilideneamino-oxi)hexanoico (Hapteno KMo6, 78). Preparado siguiendo el procedimiento descrito para la preparación del hapteno KMa6 (74); la purificación cromatográfica del residuo obtenido a partir de 115.2 mg (0.246 mmol) del éster *terc*-butílico 117 y 5.0 mL de ácido fórmico, usando CHCl_3 como eluyente, proporcionó 91.4 mg del hapteno KMo6 (78, 90%) como un aceite incoloro.

Datos espectroscópicos: IR (NaCl) ν_{\max} (cm^{-1}) 3424m (ancha), 3026m, 2948m, 2853m, 1733f, 1708f, 1602d, 1590d, 1495f, 1437m, 1310m, 1241f, 1215f, 1123m, 1069f, 1001f, 781d, 754f; **$^1\text{H-RMN}$** (300 MHz) δ 7.57 (1H, d, $J = 7.5$ Hz, H-6'), 7.44 (1H, td, $J = 7.5, 7.5, 1.5$ Hz, H-5'), 7.37 (1H, td, $J = 7.5, 7.5, 1.4$ Hz, H-4'), 7.19 (1H, dd, $J = 7.5, 1.5$ Hz, H-3'), 7.12 (1H, m, H-3'' parcialmente solapado con H-5''), 7.10 (1H, m, H-5'' parcialmente solapado con H-3''), 6.84 (1H, td, $J = 7.3, 7.2, 0.8$ Hz, H-4''), 6.76 (1H, d, $J = 8.1$ Hz, H-6''), 4.95 (2H, s, OCH_2), 4.24 (2H, t, $J = 6.8$ Hz, H_2-6), 3.81 (3H, s, CO_2CH_3), 2.27 (2H, m, H_2-2 parcialmente solapado con CH_3), 2.25 (3H, m, CH_3 parcialmente solapado con H_2-2), 1.66 (2H, q, $J = 7.4, 6.8$ Hz, H_2-5), 1.57 (2H, q, $J = 7.6, 7.4$ Hz, H_2-3), 1.30 (2H, m, H_2-4); **$^{13}\text{C-RMN}$** (75 MHz) δ 179.35 (CO_2H), 163.39 (CO_2CH_3), 156.51 (C-1''), 149.07 (CN), 135.64 (C-2'), 130.08 (C-3''), 129.46 (C-5'), 129.08 (C-1'), 128.45 (C-3'), 127.46 (C-4'), 127.42 (C-6'), 126.90 (C-2''), 126.65 (C-5''), 120.60 (C-4''), 111.08 (C-6''), 76.06 (C-6), 68.02 (OCH_2), 52.90 (CO_2CH_3), 33.66 (C-2), 28.59 (C-5), 25.11 (C-4), 24.21 (C-3), 16.24 (CH_3); **EM** (IE) m/z (%) 413 (M^+ , 2), 306 (32), 223 (2), 192 (20), 184 (1), 175 (3), 160 (10), 148 (27), 143 (2), 132 (6), 116 (100), 107 (4), 97 (6), 89 (7), 77 (7), 69 (16), 58 (13); **EMAR** m/z calculada para $\text{C}_{23}\text{H}_{27}\text{NO}_6$ 413.1838, encontrada 413.1820.

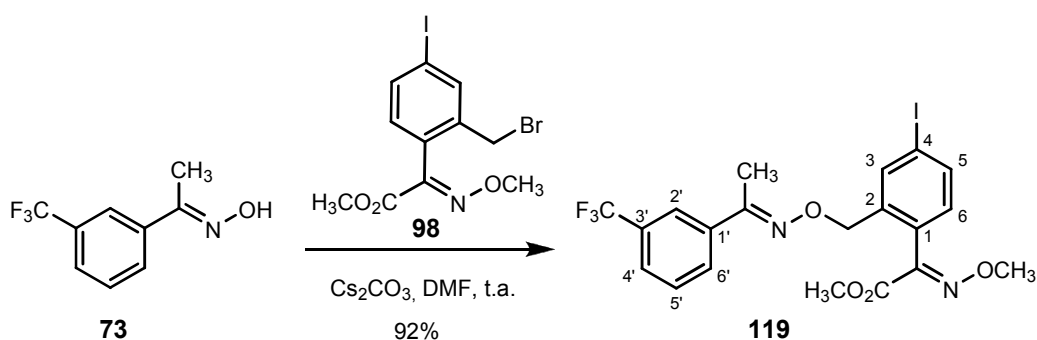
5.2.3. Síntesis de haptenos para trifloxystrobin

5.2.3.1. Síntesis del hapteno TFA6



(E)-1-(3-(Trifluorometil)fenil)oxima etanona (73). 478 mg (2.540 mmol) de 3-trifluorometilacetofenona (**118**) y 530 mg (7.620 mmol) de clorhidrato de hidroxilamina se disolvieron, bajo atmósfera de nitrógeno, en 5.5 mL de piridina seca. La suspensión resultante se agitó a temperatura ambiente durante toda la noche (22 h). Pasado este tiempo, la mezcla de reacción se vertió sobre agua y

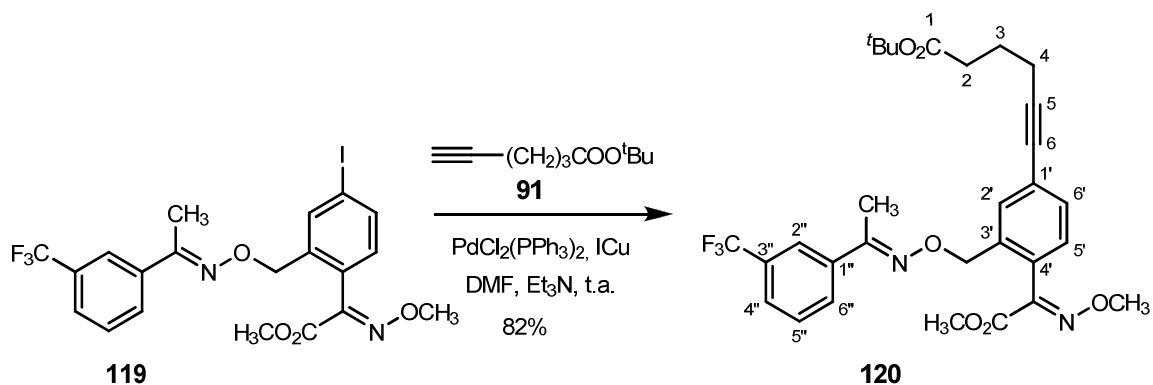
se extrajo con acetato de etilo. Las fases orgánicas se lavaron con disolución saturada de NaCl, se secaron sobre Na₂SO₄ anhidro y se filtraron. Después de eliminar el disolvente a vacío se obtuvo la oxima **73** con un 90% de rendimiento (467.1 mg), como un sólido color marfil. El producto **73** ha sido previamente descrito (CAS 99705–50–7). Las propiedades físicas y espectroscópicas del producto obtenido coinciden con las anteriormente descritas (Neufeldt y Sanford, 2010).



2-(4-Iodo-2-(((*E*)-1-(3-(trifluorometil) fenil) etilideno) amino) oxi) metil) fenil) (*E*)-2-(metoxiimino)acetato de metilo (119**). Se preparó siguiendo un procedimiento análogo al descrito para la preparación de **99**; el residuo obtenido tras 6 h de reacción a partir de una disolución que contenía 55.3 mg (0.255 mmol) de la oxima **73**, 105 mg (0.255 mmol) del bromuro bencílico **98**, 125 mg (0.382 mmol) de Cs₂CO₃ y 1.2 mL de DMF seca fue purificado por cromatografía en columna, utilizando hexano–éter etílico (8:2) como eluyente, obteniéndose 128 mg del ioduro arílico **119** (92%) como un sólido blanco.**

Datos físicos y espectroscópicos: Pf. 103–104 °C (Hexano); IR (KBr) ν_{\max} (cm⁻¹) 2946d, 2878d, 1725f, 1595d, 1442d, 1369m, 1340f, 1299m, 1277f, 1217m, 1169f, 1119f, 1068f, 1020f, 925m, 914m, 875d, 803d, 788d, 700d, 677m; **¹H-RMN** (300 MHz) δ 7.86 (2H, sa, H–3 y H–2'), 7.78 (1H, d, $J = 7.8$ Hz, H–6'), 7.71 (1H, dd, $J = 8.1, 1.7$ Hz, H–5), 7.60 (1H, d, $J = 7.8$ Hz, H–4'), 7.47 (1H, ta, $J = 7.8, 7.8$ Hz, H–5'), 6.92 (1H, d, $J = 8.1$ Hz, H–6), 5.06 (2H, s, OCH₂), 4.03 (3H, s, NOCH₃), 3.82 (3H, s, CO₂CH₃), 2.23 (3H, s, CH₃); **¹³C-RMN** (75 MHz) δ 162.90 (CO₂CH₃), 154.10 (CH₃CN), 148.70 (CN), 138.23 (C–2), 137.67 (C–3), 137.00 (C–1'), 136.81 (C–5), 130.79 (C–3''), $c, J = 32.5$ Hz), 130.19 (C–6), 129.29 (C–6'), 129.20 (C–1), 128.85 (C–5'), 125.72

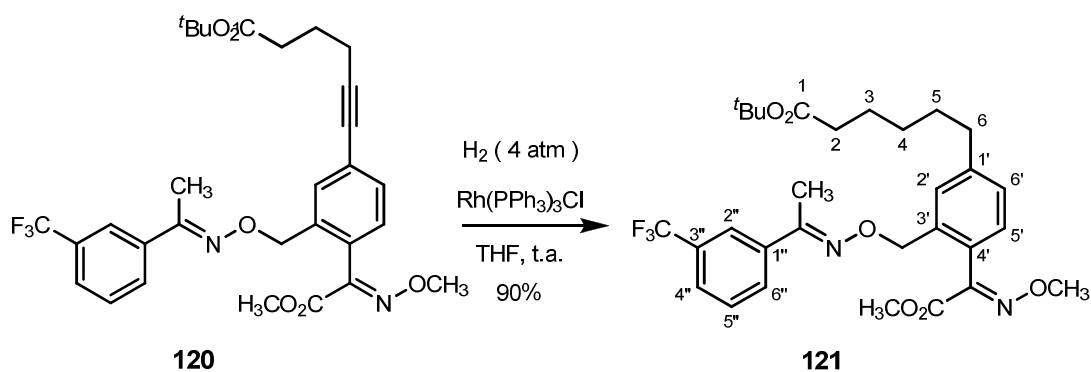
(C-4', c, $J = 3.8$ Hz), 123.94 (CF₃, c, $J = 272.9$ Hz), 122.88 (C-2', c, $J = 3.8$ Hz), 95.62 (C-4), 73.99 (OCH₂), 63.90 (NOCH₃), 52.97 (CO₂CH₃), 12.61 (CH₃); **EM** (IE) m/z (%) 534 (M⁺, 0.1), 503 (12), 348 (100), 332 (50), 316 (33), 288 (8), 272 (11), 256 (53), 243 (21), 242 (90), 198 (5), 186 (18), 146 (5); **EMAR** m/z calculada para C₂₀H₁₈F₃IN₂O₄ 534.0263, encontrada 534.0282.



6-(4-((*E*)-2-Metoxi-1-(metoxiimino)-2-oxoetil)-3-(((*E*)-1-(3-(trifluorometil)fenil)etilideno)amino)oxi)metil)fenil)hex-5-ionato de *terc*-butilo (120).
 El acoplamiento entre el yoduro **119** y el alquino **91** se realizó siguiendo el procedimiento descrito para la preparación del intermedio **100**; la purificación por cromatografía en columna, utilizando hexano-éter etílico (7:3) como eluyente, del residuo obtenido tras 3 h de reacción a partir de una disolución que contenía 127 mg (0.238 mmol) del yoduro arílico **119**, 1.3 mg (3%) de CuI, 156 mg (0.952 mmol) del alquino **91**, 1.0 mL de DMF seca, 0.5 mL de de Et₃N y 5.0 mg (0.007 mmol) de Pd(PPh₃)₂Cl₂, proporcionó 112.3 mg del alquino **120** (82%) como un aceite ligeramente coloreado.

Datos espectroscópicos: IR (NaCl) ν_{max} (cm⁻¹) 2977m, 2940f, 2231d, 1727f, 1609m, 1493m, 1437f, 1368f, 1301f, 1275f, 1214f, 1127f, 1070f, 1017f, 951m, 899m, 834m, 788m, 732d, 698m, 675d ; **¹H-RMN** (300 MHz) δ 7.86 (1H, sa, H-2''), 7.78 (1H, d, $J = 7.7$ Hz, H-6''), 7.60 (1H, d, $J = 7.8$ Hz, H-4''), 7.51 (1H, d, $J = 1.9$ Hz, H-2'), 7.46 (1H, ta, $J = 7.8, 7.7$ Hz, H-5''), 7.39 (1H, dd, $J = 7.9, 1.9$ Hz, H-6'), 7.11 (1H, d, $J = 7.9$ Hz, H-5'), 5.09 (2H, s, OCH₂), 4.02 (3H, s, NOCH₃), 3.81 (3H, s, CO₂CH₃), 2.47 (2H, t, $J = 7.0$ Hz, H₂-4), 2.42 (2H, t, $J = 7.5$ Hz, H₂-2), 2.22 (3H, s, CH₃), 1.88 (2H, q, $J = 7.5, 7.0$ Hz, H₂-3), 1.45

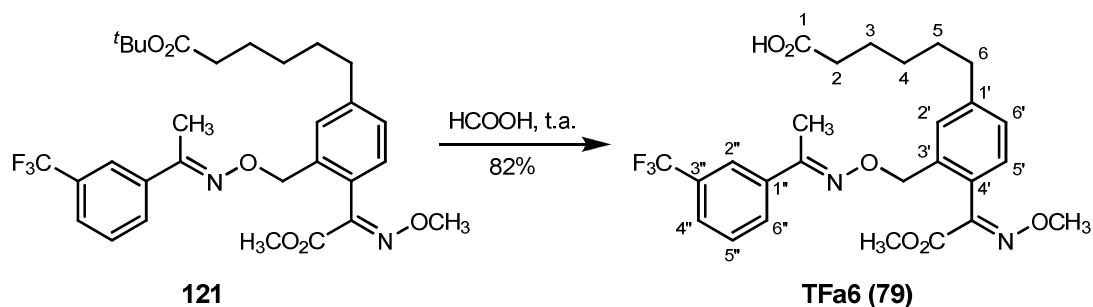
(9H, s $C(CH_3)_3$); ^{13}C -RMN (75 MHz) δ 172.41 (CO_2^tBu), 163.05 (CO_2CH_3), 153.74 (CH_3CN), 149.11 (CN), 137.11 (C-3'), 136.17 (C-1''), 131.76 (C-2'), 130.72 (C-6'), 130.71 (C-3'', c, $J = 32.5$ Hz), 129.17 (C-6''), 128.93 (C-4'), 128.77 (C-5''), 128.57 (C-5'), 125.57 (C-4'', c, $J = 3.8$ Hz), 125.09 (C-1'), 123.94 (CF_3 , c, $J = 272.4$ Hz), 122.83 (C-2'', c, $J = 3.8$ Hz), 90.44 (C-5), 80.69 (C-6), 80.24 ($C(CH_3)_3$), 74.54 (OCH_2), 63.73 ($NOCH_3$), 52.80 (CO_2CH_3), 34.32 (C-2), 28.05 ($C(CH_3)_3$), 24.00 (C-3), 18.80 (C-4), 12.49 (CH_3); **EM** (IE) m/z (%) 574 (M^+ , 14), 518 (72), 501 (33), 487 (4), 473 (4), 332 (12), 316 (12), 300 (9), 284 (10), 272 (23), 256 (10), 242 (10), 226 (49), 212 (8), 199 (6), 187 (20), 186 (100), 180 (13), 172 (24), 168 (24), 153 (16), 145 (30), 127 (10), 57 (39); **EMAR** m/z calculada para $C_{30}H_{33}F_3N_2O_6$ 574.2291, encontrada 574.2284.



6-(4-((*E*)-2-Metoxi-1-(metoxiimino)-2-oxoetil)-3-(((*E*)-1-(3-(trifluorometil)fenil)etilideno)amino)oxi)metil)fenil)hexanoato de *terc*-butilo (121). Obtenido mediante un procedimiento análogo al descrito para la preparación de **101**; la purificación cromatográfica, utilizando hexano-éter etílico (8:2) como eluyente, del crudo de reacción obtenido a partir de 117.8 mg (0.205 mmol) del alquino **120**, 6 mg (0.006 mmol) de $Rh(PPh_3)_3Cl$ y 1.9 mL de THF, proporcionó 102 mg del éster *terc*-butílico **121** (90%) como un líquido ligeramente coloreado

Datos espectroscópicos: IR (NaCl) ν_{max} (cm^{-1}) 2975d, 2937m, 2858d, 1728f, 1613d, 1437d, 1367m, 1341m, 1299m, 1275f, 1214m, 1167f, 1127f, 1070f, 1021m, 953d, 835d, 785d; 1H -RMN (300 MHz) δ 7.87 (1H, sa, H-2''), 7.79 (1H, d, $J = 7.8$ Hz, H-6''), 7.58 (1H, d, $J = 7.8$ Hz, H-4''), 7.46 (1H, ta,

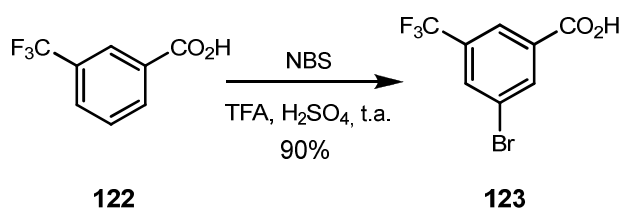
$J = 7.8, 7.8$ Hz, H-5''), 7.29 (1H, d, $J = 1.6$ Hz, H-2'), 7.19 (1H, dd, $J = 7.8, 1.6$ Hz, H-6'), 7.11 (1H, d, $J = 7.8$ Hz, H-5'), 5.12 (2H, s, OCH₂), 4.03 (3H, s, NOCH₃), 3.81 (3H, s, CO₂CH₃), 2.65 (2H, t, $J = 7.7$, H₂-6), 2.21 (5H, m, H₂-2 y CH₃), 1.72–1.57 (4H, m, H₂-5 y H₂-3), 1.44–1.33 (11H, m, C(CH₃)₃ y H₂-3); ¹³C-RMN (75 MHz) δ 173.12 (CO₂^tBu), 163.45 (CO₂CH₃), 153.52 (CH₃CN), 149.67 (CN), 143.94 (C-1'), 137.26 (C-3'), 135.74 (C-1''), 130.74 (C-3'', c, $J = 32.1$ Hz), 129.23 (C-6''), 128.93 (C-2'), 128.78 (C-5''), 128.54 (C-5'), 127.78 (C-6'), 127.13 (C-4'), 125.54 (C-4'', c, $J = 3.8$ Hz), 124.00 (CF₃, c, $J = 272.5$ Hz), 122.85 (C-2'', c, $J = 3.8$ Hz), 79.95 (C(CH₃)₃), 75.14 (OCH₂), 63.68 (NOCH₃), 52.80 (CO₂CH₃), 35.58 (C-6), 35.43 (C-2), 30.67 (C-5), 28.79 (C-4), 28.08 (C(CH₃)₃), 24.90 (C-3), 12.50 (CH₃); **EM** (FAB) m/z (%) 579 (M⁺+1, 3), 505 (12), 376 (10), 336 (19), 320 (6), 288 (5), 276 (27), 246 (6), 230 (31), 214 (10), 186 (40), 172 (11), 158 (8), 146 (13), 142 (10), 130 (13), 60 (29), 57 (100), 55 (5); **EMAR** m/z calculada para C₃₀H₃₈F₃N₂O₆ [M+H]⁺ 579.2682, encontrada 579.2690.



Ácido 6-(4-((*E*)-2-metoxi-1-(metoxiimino)-2-oxoetil)-3-(((*E*)-1-(3-(trifluorometil)fenil)etilideno)amino)oxi)metil)fenil)hexanoico (Hapteno TFa6, 79). Se obtuvo siguiendo el mismo procedimiento de hidrólisis utilizado previamente para la síntesis del hapteno KMa6 (74); la purificación cromatográfica, utilizando como eluyente cloroformo–metanol (99:1), del residuo obtenido a partir de 86 mg (0.149 mmol) del éster *terc*-butilico 121 y 3.3 mL de ácido fórmico, proporcionó 63.4 mg del hapteno TFa6 (79, 82%) como un aceite incoloro.

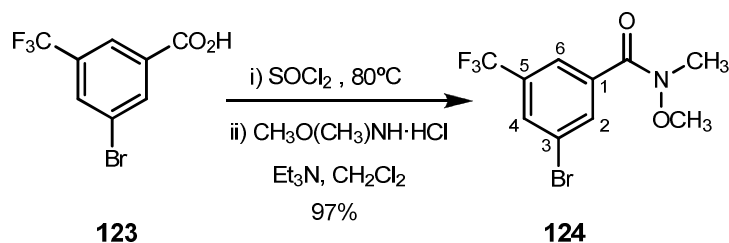
Datos espectroscópicos: IR (NaCl) ν_{\max} (cm^{-1}) 3371m (ancha), 2984f, 2859m, 1738f, 1709f, 1614d, 1437m, 1341f, 1299f, 1275f, 1214f, 1167f, 1127f, 1070f, 1020f, 933d, 899d, 737m, 699m; **^1H -RMN** (300 MHz) δ 7.87 (1H, sa, H-2''), 7.78 (1H, d, $J = 7.8$ Hz, H-6''), 7.59 (1H, da, $J = 7.8$ Hz, H-4''), 7.46 (1H, ta, $J = 7.8, 7.8$ Hz, H-5''), 7.29 (1H, s, H-2'), 7.19 (1H, dd, $J = 7.8, 1.6$ Hz, H-6'), 7.11 (1H, d, $J = 7.8$ Hz, H-5'), 5.12 (2H, s, OCH_2), 4.03 (3H, s, NOCH_3), 3.82 (3H, s, CO_2CH_3), 2.66 (2H, t, $J = 7.6$ Hz, H_2 -6), 2.35 (2H, t, $J = 7.4$ Hz, H_2 -2), 2.21 (3H, s, CH_3), 1.71–1.56 (4H, m, H_2 -5 y H_2 -3), 1.42 (2H, m, H_2 -4); **^{13}C -RMN** (75 MHz) δ 178.40 (CO_2H), 163.49 (CO_2CH_3), 153.57 (CH_3CN), 149.65 (CN), 143.80 (C-1'), 137.24 (C-3'), 135.80 (C-1''), 130.80 (C-3'', c, $J = 32.5$ Hz), 129.25 (C-6''), 128.95 (C-2'), 128.79 (C-5''), 128.58 (C-5'), 127.80 (C-6'), 127.18 (C-4'), 125.57 (C-4'', c, $J = 3.8$ Hz), 124.00 (CF_3 , c, $J = 272.3$ Hz), 122.86 (C-2'', c, $J = 3.8$ Hz), 75.12 (OCH_2), 63.70 (NOCH_3), 52.84 (CO_2CH_3), 35.51 (C-6), 33.79 (C-2), 30.59 (C-5), 28.71 (C-4), 24.47 (C-3), 12.52 (CH_3); **EM** (IE) m/z (%) 522 (M^+ , 0.6), 491 (11), 337 (21), 336 (100), 320 (96), 304 (30), 289 (5), 276 (45), 260 (12), 246 (37), 230 (45), 212 (23), 186 (82), 172 (72), 160 (51), 158 (35), 145 (54), 144 (78), 142 (38), 130 (69), 116 (22), 103 (29), 77 (12), 59 (82), 55 (19); **EMAR** m/z calculada para $\text{C}_{26}\text{H}_{29}\text{F}_3\text{N}_2\text{O}_6$ 522.1978, encontrada 522.1985.

5.2.3.2. Síntesis del hapteno TFb6



Ácido 3-bromo-5-(trifluorometil)benzoico (123). A una disolución de 600 mg (3.156 mmol) de ácido 3-trifluorometilbenzoico (**122**) en 1.6 mL de TFA y 480 μL de H_2SO_4 , se añadieron en pequeñas porciones 842 mg (4.734 mmol) de NBS. La suspensión resultante se mantuvo bajo agitación vigorosa a temperatura ambiente durante toda la noche (18 h). Transcurrido este tiempo, la mezcla de reacción se vertió sobre agua-hielo y el precipitado resultante se filtro a vacío, obteniéndose el ácido **123** como un sólido blanco

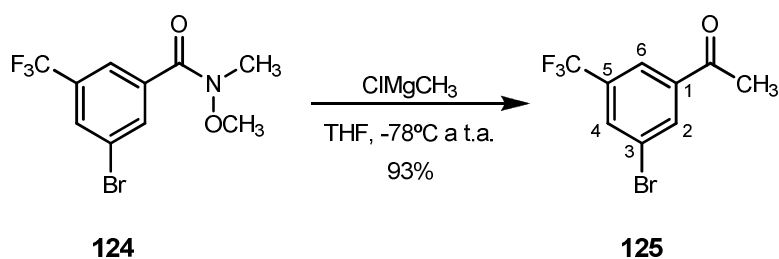
con un 90% de rendimiento (765 mg). El producto **123** ha sido previamente descrito (CAS 328–67–6). Las propiedades físicas y espectroscópicas del producto obtenido coinciden con las anteriormente descritas (Marzi *et al.*, 2002).



3-Bromo-*N*-metoxi-*N*-metil-5-(trifluorometil)benzamida (124). 433.1 mg del ácido benzoico **123** disueltos en 1.7 mL de SOCl_2 se refluieron durante 4 h bajo atmósfera de nitrógeno. Pasado el tiempo, se eliminó a vacío el exceso de SOCl_2 . El cloruro de ácido formado se añadió, bajo atmósfera inerte y disuelto en CH_2Cl_2 seco (5 mL), sobre una suspensión de 187 mg (1.920 mmol) de $\text{MeO(Me)NH}\cdot\text{HCl}$, 535 μL (3.840 mmol) de Et_3N y 10 mL de CH_2Cl_2 seco. La mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante toda la noche (18 h). Después de este tiempo, la mezcla de reacción se vertió sobre agua y se extrajo con acetato de etilo. Las fases orgánicas reunidas se lavaron con disolución saturada de NaCl , se secaron sobre Na_2SO_4 anhidro y se filtraron. El residuo resultante después de eliminar el disolvente a vacío se purificó por cromatografía de columna, usando como eluyente hexano–acetato de etilo (de 9:1 a 8:2), obteniéndose la amida **124** como un aceite incoloro (488 mg, 97%).

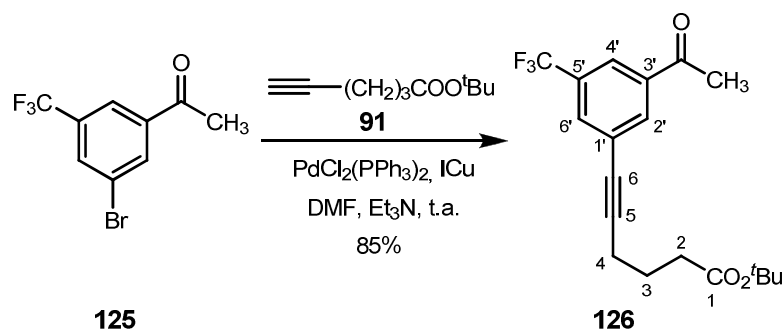
Datos espectroscópicos: IR (NaCl) ν_{max} (cm^{-1}) 3076d, 2973d, 2939d, 1651f, 1578d, 1460m, 1414f, 1384f, 1316f, 1260d, 1207f, 1174f, 1132f, 1102f, 986m, 885m, 741m, 692f; **^1H –RMN** (300 MHz) δ 8.03 (1H, sa, H–2), 7.91 (1H, sa, H–6), 7.85 (1H, sa, H–4), 3.55 (3H, s, OCH_3), 3.38 (3H, s, CH_3); **^{13}C –RMN** (75 MHz) δ 166.58 (CO), 136.42 (C–1), 134.71 (C–2), 132.14 (C–5, c, $J = 32.6$ Hz), 130.36 (C–4, c, $J = 3.6$ Hz), 124.03 (C–6, c, $J = 3.6$ Hz), 122.78 (CF_3 , c, $J = 273.1$ Hz), 122.36 (C–3), 61.39 (OCH_3), 33.25 (CH_3); **EM** (IE) m/z (%) 314 ($\text{M}^+ + 1$ ^{81}Br , 10), 313 (M^+ ^{81}Br , 95), 312 ($\text{M}^+ + 1$ ^{79}Br , 12), 311 (M^+ ^{79}Br , 98), 293 (2), 252 (94), 250 (100), 224 (23), 222 (23), 172 (3), 144 (19),

125 (4), 75 (3), 57 (8); **EMAR** m/z calculada para $C_{10}H_9F_3^{79}BrNO_2$ 310.9769, encontrada 310.9761.



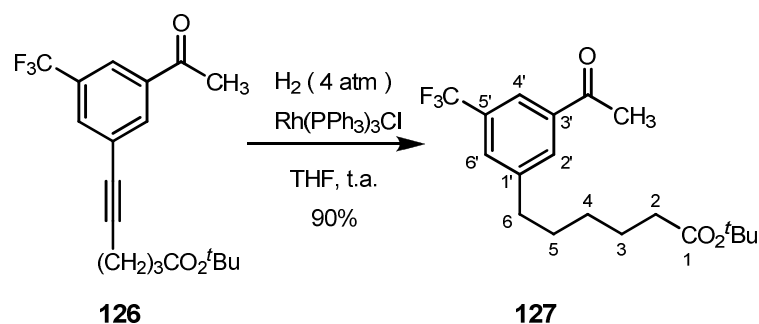
1-(3-Bromo-5-(trifluorometil)fenil)etanona (125). Sobre una disolución de 443.4 mg (1.421 mmol) de la amida **124** en 8.6 mL de THF seco, previamente enfriada a -78°C , se añadieron 2.4 mL (7.106 mmol) de una disolución 3 M de CIMgCH_3 en THF bajo atmósfera de nitrógeno. Tras completar la adición, la reacción se agitó a temperatura ambiente durante toda la noche (19 h). Pasado este tiempo, la mezcla de reacción se enfrió a 0°C , se le añadieron 20 mL de HCl 1 M y posteriormente se extrajo con acetato de etilo. Las fases orgánicas reunidas se lavaron con disolución saturada de NaCl, se secaron sobre MgSO_4 anhidro y se filtraron. Después de eliminar el disolvente a vacío, el residuo obtenido fue purificado por cromatografía de columna, empleando hexano–acetato de etilo (8:2), obteniéndose la metil–cetona **125** como un aceite incoloro (351.5 mg, 93%).

Datos espectroscópicos: IR (NaCl) ν_{max} (cm^{-1}) 3079d, 3006d, 1688f, 1604d, 1582d, 1361m, 1324f, 1239f, 1175f, 1134f, 1098m, 885m, 783m, 692f; $^1\text{H-RMN}$ (300 MHz) δ 8.25 (1H, sa, H-2), 8.11 (1H, sa, H-6), 7.95 (1H, sa, H-4), 2.64 (3H, s, CH_3); $^{13}\text{C-RMN}$ (75 MHz) δ 195.13 (CO), 139.05 (C-1), 134.58 (C-2), 132.87 (C-5, c, $J = 32.8$ Hz), 132.53 (C-4, c, $J = 3.8$ Hz), 123.72 (C-6, c, $J = 3.8$ Hz), 123.38 (C-3), 122.70 (CF_3 , c, $J = 272.9$), 26.63 (CH_3); **EM** (IE) m/z (%) 268 ($\text{M}^+ \text{}^{81}\text{Br}$, 32), 266 ($\text{M}^+ \text{}^{79}\text{Br}$, 34), 253 (45), 250 (45), 225 (15), 144 (13), 97 (23), 85 (50), 71 (65), 57 (100); **EMAR** m/z calculada para $C_9H_6F_3^{79}BrO$ 265.9554, encontrada 265.9542.



6-(3-Acetil-5-(trifluorometil)fenil)hex-5-inoato de *terc*-butilo (126). La síntesis de este compuesto se llevó a cabo siguiendo el mismo procedimiento utilizado en la reacción de acoplamiento que conduce a **100**; la purificación por cromatografía en columna, utilizando hexano–éter etílico (9:1) como eluyente, del residuo obtenido tras 3 h de reacción a partir de una disolución que contenía 330 mg (1.236 mmol) del bromuro arílico **125**, 7.0 mg (3%) de CuI, 623 mg (3.708 mmol) del alquino **91**, 5.3 mL de DMF seca, 2.7 mL de de Et₃N y 26 mg (0.037 mmol) de Pd(PPh₃)₂Cl₂, proporcionó 371.9 mg del alquino **126** (85%) como un aceite incoloro.

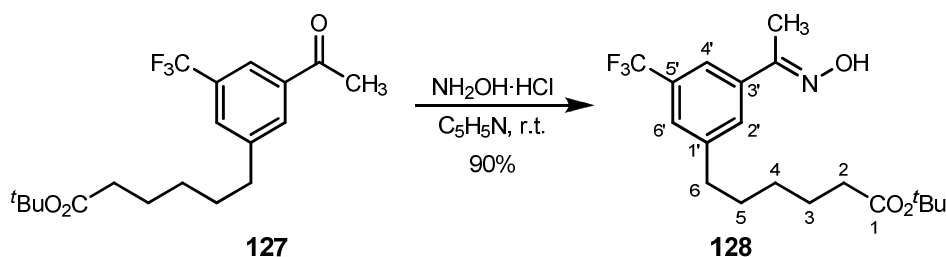
Datos espectroscópicos: IR (NaCl) ν_{\max} (cm⁻¹) 2978d, 2928d, 1728m, 1698m, 1599d, 1449d, 1369m, 1352m, 1251f, 1218d, 1172m, 1134f, 1084d, 893d, 844d, 696d; **¹H-RMN** (300 MHz) δ 8.11 (1H, sa, H-2'), 8.08 (1H, sa, H-4'), 7.82 (1H, sa, H-6'), 2.64 (3H, s, CH₃), 2.50 (2H, t, $J = 7.2$ Hz, H₂-4), 2.41 (2H, t, $J = 7.2$ Hz, H₂-2), 1.91 (2H, q, $J = 7.2$ Hz, H₂-3), 1.46 (9H, s, C(CH₃)₃); **¹³C-RMN** (75 MHz) δ 196.07 (CO), 172.32(CO₂^tBu), 137.55 (C-3'), 134.38 (C-2'), 132.27 (C-6', c, $J = 3.6$ Hz), 131.99 (C-5', c, $J = 32.6$ Hz), 125.62 (C-1'), 123.77 (C-4', c, $J = 3.6$ Hz), 122.40 (CF₃, c, $J = 272.2$), 92.45 (C-5), 80.49 (C-6), 79.09 (C(CH₃)₃), 34.37 (C-2), 28.10 (C(CH₃)₃), 26.68 (CH₃), 23.79 (C-3), 18.75 (C-4); **EM** (IE) m/z (%) 354 (M⁺, 0.2), 298 (23), 281 (16), 256 (10), 238 (21), 225 (6), 205 (4), 182 (7), 132 (1), 57 (100), 55 (10); **EMAR** m/z calculada para C₁₉H₂₁F₃O₃ 354.1443, encontrada 354.1436.



6-(3-Acetil-5-(trifluorometil)fenil)hexanoato de *terc*-butilo (127).

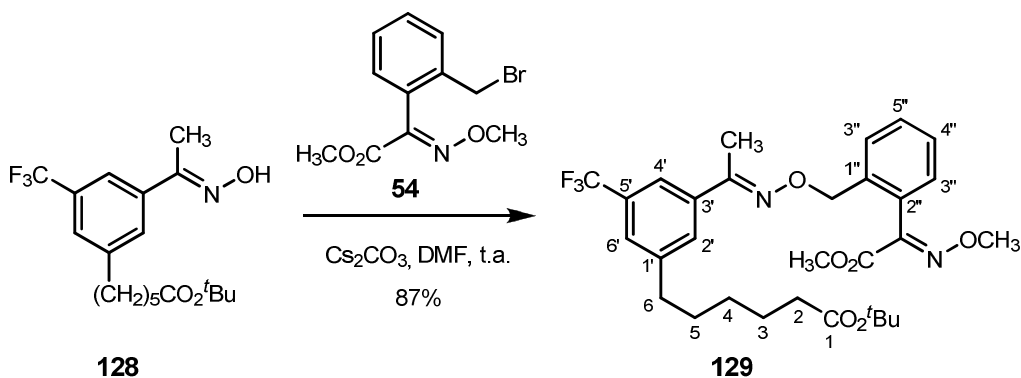
Preparado en las condiciones de hidrogenación catalítica utilizadas para la obtención de **101**; la purificación cromatográfica, utilizando hexano–éter etílico (9:1) como eluyente, del crudo de reacción obtenido a partir de 166.1 mg (0.469 mmol) del alquino **126**, 13 mg (0.003 mmol) de $\text{Rh}(\text{PPh}_3)_3\text{Cl}$ y 4.3 mL de THF, proporcionó 151.1 mg del éster *terc*-butílico **127** (90%) como un aceite incoloro.

Datos espectroscópicos: IR (NaCl) ν_{max} (cm^{-1}) 2978d, 2935d, 2863d, 1728m, 1694m, 1606d, 1458d, 1368m, 1348m, 1245f, 1166f, 1129f, 890d, 843d, 701d; **^1H -RMN** (300 MHz) δ 8.00 (1H, sa, H-4'), 7.94 (1H, sa, H-2'), 7.61 (1H, sa, H-6'), 2.73 (2H, t, $J = 7.6$ Hz, H₂-6), 2.64 (3H, s, CH₃), 2.21 (2H, t, $J = 7.3$ Hz, H₂-2), 1.73–1.56 (4H, m, H₂-3 y H₂-5), 1.42 (9H, s, C(CH₃)₃), 1.36 (2H, m, H₂-3); **^{13}C -RMN** (75 MHz) δ 196.93 (CO), 173.01 (CO₂^tBu), 144.33 (C-1'), 137.59 (C-3'), 131.32 (C-2'), 131.13 (C-5', c, $J = 32.5$ Hz), 129.44 (C-6', c, $J = 3.5$ Hz), 122.77 (C-4', c, $J = 3.5$ Hz), 122.38 (CF₃, c, $J = 272.2$), 80.07 (C(CH₃)₃), 35.48 (C-6), 35.33 (C-2), 30.88 (C-5), 28.55 (C-3), 28.07 (C(CH₃)₃), 26.72 (CH₃), 24.77 (C-4); **EM** (IE) m/z (%) 359 (M⁺+1, 0.7), 303 (100), 285 (66), 200 (8), 165 (4), 153 (72), 137 (26), 134 (49), 119 (9), 106 (17); **EMAR** m/z calculada para C₁₉H₂₅F₃O₃ 358.1756, encontrada 358.1742.



(E)-6-(3-(1-(Hidroxiimino)etil)-5-(trifluorometil)fenil)hexanoato de *terc*-butilo (128). La formación de esta oxima se llevó a cabo en las mismas condiciones utilizadas para la preparación de **73**; la purificación cromatográfica, utilizando hexano–éter etílico (8:2) como eluyente, del crudo de reacción obtenido a partir de 130.7 mg (0.365 mmol) de la metil–cetona **127**, 101 mg (1.460 mmol) de clorhidrato de hidroxilamina y 2.5 mL de piridina seca proporcionó 122.5 mg de la oxima **128** (90%) como un aceite incoloro.

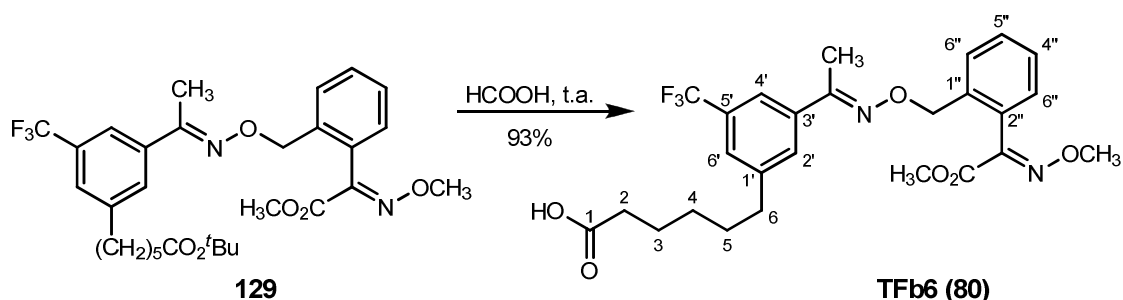
Datos espectroscópicos: IR (NaCl) ν_{\max} (cm⁻¹) 3359d (ancha), 2979d, 2934d, 2862d, 1728m, 1696m, 1604d, 1459d, 1398d, 1368m, 1319d, 1272f, 1165f, 1126f, 1008d, 882d, 836d, 703d; **¹H–RMN** (300 MHz) δ 7.77 (1H, sa, OH), 7.69 (1H, sa, H–4'), 7.62 (1H, sa, H–2'), 7.42 (1H, sa, H–6'), 2.68 (2H, t, $J = 7.6$ Hz, H₂–6), 2.29 (3H, s, CH₃), 2.21 (2H, t, $J = 7.3$ Hz, H₂–2), 1.72–1.55 (4H, m, H₂–3 y H₂–5), 1.43 (9H, s, C(CH₃)₃), 1.36 (2H, m, H₂–3); **¹³C–RMN** (75 MHz) δ 173.12 (CO₂^tBu), 155.12 (CN), 143.76 (C–1'), 137.28 (C–3'), 130.95 (C–5', c, $J = 32.5$ Hz), 129.18 (C–2'), 125.68 (C–6', c, $J = 3.8$ Hz), 122.38 (CF₃, c, $J = 272.2$), 120.42 (C–4', c, $J = 3.8$ Hz), 80.08 (C(CH₃)₃), 35.59 (C–6), 35.39 (C–2), 30.92 (C–5), 28.60 (C–3), 28.07 (C(CH₃)₃), 24.83 (C–4), 11.95 (CH₃); **EM** (IE) m/z (%) 373 (M⁺, 0.6), 342 (1), 317 (37), 300 (44), 272 (4), 256 (4), 240 (4), 230 (23), 212 (12), 198 (2), 184 (3), 158 (4), 146 (2), 57 (100); **EMAR** m/z calculada para C₁₉H₂₆F₃NO₃ 373.1865, encontrada 373.1857.



6-(3-(((E)-1-(2-((E)-2-Metoxi-1-(metoxiimino)-2-oxoetil)encil)oxiimino)etil)-5-(trifluorometil)fenil)hexanoato de *terc*-butilo (129). Preparado siguiendo el procedimiento descrito para la obtención de **99**; el residuo obtenido tras 4 h de reacción a partir de una disolución que contenía 58.3 mg (0.156 mmol) de la oxima **128**, 44.7 mg (0.156 mmol) del bromuro bencílico **54**, 76.4 mg (0.234 mmol) de Cs_2CO_3 y 660 μL de DMF seca fue purificado por cromatografía en columna, utilizando hexano-éter etílico (de 9:1 a 8.5:1.5) como eluyente, obteniéndose 78.7 mg del éster *terc*-butílico **129** (87%) como un aceite incoloro.

Datos espectroscópicos: IR (NaCl) ν_{max} (cm^{-1}) 2984d, 2938d, 2848d, 1728f, 1598d, 1444d, 1367m, 1279f, 1218m, 1164f, 1126f, 1069m, 1021m, 956d, 887d, 844d, 762d; **$^1\text{H-RMN}$** (300 MHz) δ 7.76 (1H, sa, H-4'), 7.57 (1H, sa, H-2'), 7.49 (1H, dd, $J = 7.4, 1.4$ Hz, H-3''), 7.46–7.34 (3H, m, H-5'', H-6' y H-4''), 7.18 (1H, dd, $J = 7.4, 1.3$ Hz, H-6''), 5.13 (2H, s, OCH_2), 4.03 (3H, s, NOCH_3), 3.82 (3H, s, CO_2CH_3), 2.66 (2H, t, $J = 7.7$, H_2 -6), 2.25–2.17 (5H, m, H_2 -2 y CH_3), 1.68–1.55 (4H, m, H_2 -5 y H_2 -3), 1.42 (9H, s, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 1.35 (2H, m, H_2 -3); **$^{13}\text{C-RMN}$** (75 MHz) δ 173.05 (CO_2^tBu), 163.27 (CO_2CH_3), 153.90 (CH_3CN), 149.50 (CN), 143.61 (C-1'), 137.15 (C-1''), 135.90 (C-3'), 130.67 (C-5', c, $J = 31.9$ Hz), 129.75 (C-2''), 129.37 (C-4''), 129.24 (C-2'), 128.72 (C-3''), 128.48 (C-6''), 127.72 (C-5''), 125.49 (C-6', c, $J = 3.7$ Hz), 124.03 (CF_3 , c, $J = 272.3$ Hz), 120.43 (C-4', c, $J = 3.7$ Hz), 80.01 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 74.82 (OCH_2), 63.77 (NOCH_3), 52.87 (CO_2CH_3), 35.56 (C-6), 35.36 (C-2), 30.91 (C-5), 28.61 (C-4), 28.04 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 24.81 (C-3), 12.66 (CH_3); **EM (FAB) m/z** (%) 579 ($\text{M}^+ + 1$, 18), 575 (83), 520 (100), 391 (7), 307 (10), 300 (87), 282 (9),

221 (37), 205 (43), 153 (64), 135 (42), 117 (32), 106 (14); **EMAR** m/z calculada para $C_{30}H_{38}F_3N_2O_6$ $[M+H]^+$ 579.2637, encontrada 579.2643.

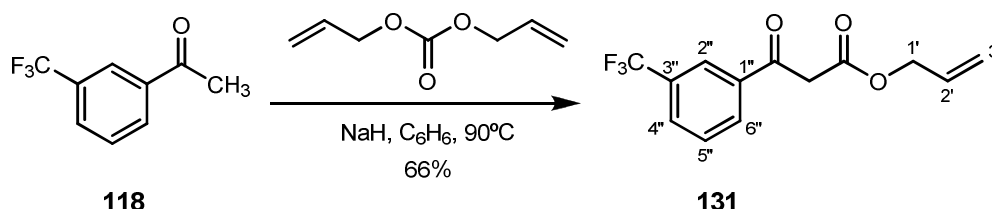


Ácido 6-(3-((*E*)-1-(((2-((*E*)-2-metoxi-1-(metoxiimino)-2-oxoetil)encil)oxi)imino)etil)-5-(trifluorometil)fenil)hexanoico (Hapteno TFb6, 80). La hidrólisis del grupo éster *terc*-butílico que conduce a **80** se realizó siguiendo el procedimiento descrito para la preparación del hapteno KMa6 (**74**); la purificación por cromatografía en columna del crudo de reacción obtenido a partir de 78.7 mg (0.136 mmol) del éster *terc*-butílico **129** y 2.8 mL de ácido fórmico, proporcionó 65.9 mg del hapteno TFb6 (**80**, 93%) como un aceite incoloro.

Datos espectroscópicos: IR (NaCl) ν_{\max} (cm^{-1}) 3314d (ancha), 2939m, 2859d, 1726f, 1598d, 1441d, 1368d, 1279f, 1218m, 1166m, 1124f, 1070m, 1020m, 956d, 886d, 703d; **$^1\text{H-RMN}$** (300 MHz) δ 7.66 (1H, sa, H-4'), 7.59 (1H, sa, H-2'), 7.50 (1H, dd, $J = 7.6, 1.5$ Hz, H-3''), 7.47–7.35 (3H, m, H-5'', H-6' y H-4''), 7.19 (1H, dd, $J = 7.4, 1.5$ Hz, H-6''), 5.14 (2H, s, OCH_2), 4.03 (3H, s, NOCH_3), 3.82 (3H, s, CO_2CH_3), 2.68 (2H, t, $J = 7.7$ Hz, H_2-6), 2.36 (2H, t, $J = 7.3$ Hz, H_2-2), 2.21 (3H, s, CH_3), 1.72–1.62 (4H, m, H_2-5 y H_2-3), 1.40 (2H, m, H_2-3); **$^{13}\text{C-RMN}$** (75 MHz) δ 179.22 (CO_2H), 163.30 (CO_2CH_3), 153.94 (CH_3CN), 149.51 (CN), 143.50 (C-1'), 137.19 (C-1''), 135.90 (C-3'), 130.72 (C-5', c, $J = 32.04$ Hz), 129.75 (C-2''), 129.39 (C-4''), 129.28 (C-2'), 128.74 (C-3''), 128.51 (C-6''), 127.75 (C-5''), 125.57 (C-6', c, $J = 3.8$ Hz), 124.04 (CF_3 , c, $J = 272.6$ Hz), 120.51 (C-4', c, $J = 3.8$ Hz), 74.86 (OCH_2), 63.79 (NOCH_3), 52.90 (CO_2CH_3), 35.46 (C-6), 33.75 (C-2), 30.81 (C-5), 28.51 (C-4), 24.35 (C-3), 12.69 (CH_3); **EM** (IE) m/z (%) 522 (M^+ , 0.5), 505 (1), 491 (5), 300 (32), 280 (6), 222 (96), 214 (13), 207 (12), 206 (100), 190 (17), 162

(11), 146 (14), 132 (20), 131 (48), 116 (67), 59 (6); **EMAR** m/z calculada para $C_{26}H_{29}F_3N_2O_6$ 522.1978, encontrada 522.1976.

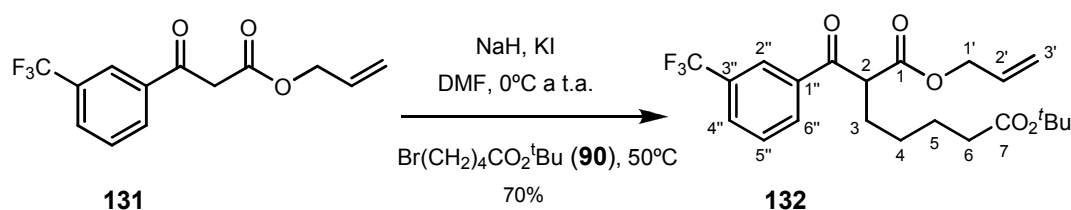
5.2.3.3. Síntesis del hapteno TFC6



3-Oxo-3-(3-(trifluorometil)fenil)propanoato de alilo (131). La metil-cetona **118** (1 g, 5.310 mmol) se adicionó bajo atmósfera inerte a una suspensión que contenía 1.5 mL (7.965 mmol) de carbonato de dialilo y NaH (dispersión en aceite al 60%, 532 mg, 13.27 mmol, prelavado con pentano) en 5 mL de benceno seco. La mezcla de reacción se calentó a reflujo de benceno durante 5 h. Pasado este tiempo, la mezcla se enfrió a 0 °C, se le añadieron 20 mL de HCl 3 M y posteriormente se extrajo con diclorometano. Las fases orgánicas reunidas se lavaron con disolución saturada de NaCl, se secaron sobre $MgSO_4$ anhidro y se filtraron. Después de eliminar el disolvente a vacío, el residuo obtenido fue purificado por cromatografía de columna, empleando hexano-acetato de etilo (9:1), obteniéndose el compuesto **131** como un aceite amarillo (952.5 mg, 66%).

Datos espectroscópicos: IR (NaCl) ν_{max} (cm^{-1}) 3038d, 2985d, 2943d, 1745f, 1696f, 1629m, 1488d, 1440m, 1404m, 1328f, 1255f, 1170f, 1129f, 1098m, 1074f, 990m, 932m, 802m, 694m; 1H -RMN (300 MHz) δ 8.20 (1H, sa, H-2''), 8.13 (1H, d, $J = 7.8$ Hz, H-6''), 7.85 (1H, d, $J = 7.8$ Hz, H-4''), 7.64 (1H, ta, $J = 7.8, 7.8$ Hz, H-5''), 5.88 (1H, m, H-2'), 5.36–5.21 (2H, m, H₂-3'), 4.66 (2H, dt, $J = 5.7, 1.3$ Hz, H₂-1'), 4.05 (2H, s, H₂-2); ^{13}C -RMN (75 MHz) δ 191.05 (CO), 166.61 (COO), 136.42 (C-1''), 131.65 (C-6''), 131.32 (C-2'), 131.50 (C-3'', c, $J = 32.3$ Hz), 130.17 (C-4'', c, $J = 3.8$ Hz), 129.53 (C-5''), 125.35 (C-2'', c, $J = 3.8$ Hz), 123.92 (CF₃, c, $J = 272.0$ Hz), 119.01 (C-3'), 66.26 (C-1'), 45.81 (C-2); **EM** (IE) m/z (%) 272 (M⁺, 4), 253 (2), 215 (8), 188

(35), 173 (100), 159 (4), 145 (30), 125 (2), 95 (2); **EMAR** m/z calculada para $C_{13}H_{11}F_3O_3$ 272.0660, encontrada 272.0668.

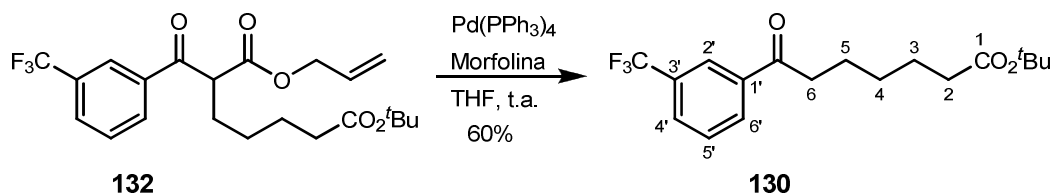


2-(3-(Trifluorometil)benzoil)heptanodioato de 7-*terc*-butil-1-alilo (**132**).

Sobre una suspensión en atmósfera de nitrógeno agitada y enfriada a 0°C de NaH prelavado (dispersión en aceite al 60%, 88 mg, 2.205 mmol) en 8 mL de DMF seca, se adicionó lentamente una disolución de 400 mg (1.470 mmol) del propanoato de alilo **131** en DMF seca. A los 30 min, una vez cesado el desprendimiento de hidrógeno, se añadieron 700 mg (2.940 mmol) del bromuro alquílico **90** y 244 mg (1.470 mmol) de KI. Después de agitar la mezcla de reacción a 50°C durante 18 h, la mezcla de reacción se vertió sobre agua y se extrajo con acetato de etilo. Las fases orgánicas se lavaron con salmuera, se secaron sobre Na_2SO_4 anhidro y se filtraron. Una vez eliminado el disolvente, el residuo se purificó por cromatografía de columna con hexano-éter etílico (de 8.5:1.5 a 8:2) como eluyente, obteniéndose el compuesto **132** como un aceite amarillo (463 mg, 70%).

Datos espectroscópicos: IR (NaCl) ν_{max} (cm^{-1}) 2980d, 2933d, 2863d, 1729f, 1695m, 1611d, 1367m, 1331f, 1254m, 1167f, 1127f, 1073m, 919d, 829d, 797d; $^1\text{H-RMN}$ (300 MHz) δ 8.24 (1H, sa, H-2''), 8.16 (1H, d, $J = 7.8$ Hz, H-6''), 7.84 (1H, d, $J = 7.8$ Hz, H-4''), 7.63 (1H, ta, $J = 7.8, 7.8$ Hz, H-5''), 5.87–5.72 (1H, m, H-2'), 5.27–5.12 (2H, m, H_2 -3'), 4.58 (2H, da, $J = 5.8$ Hz, H_2 -1'), 4.32 (1H, t, $J = 7.2, 7.1$ Hz, H-2), 2.21 (2H, t, $J = 7.4, 7.3$ Hz, H_2 -6), 2.05 (2H, m, H_2 -4), 1.70–1.57 (4H, m, H_2 -3 y H_2 -5), 1.42 (9H, s, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$); $^{13}\text{C-RMN}$ (75 MHz) δ 193.58 (CO), 172.74 (C-7), 169.08 (COO), 136.69 (C-1''), 131.65 (C-6''), 131.50 (C-3'', c, $J = 32.5$ Hz), 131.19 (C-2''), 129.88 (C-4'', c, $J = 3.7$ Hz), 129.45 (C-5''), 125.39 (C-2'', c, $J = 3.9$ Hz), 123.50 (CF_3 , c, $J = 272.4$ Hz), 118.96 (C-3'), 80.12 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 66.08 (C-1'), 54.01 (C-2), 35.10 (C-6), 28.43 (C-3), 28.03 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 26.88 (C-4), 24.75 (C-5); **EM**

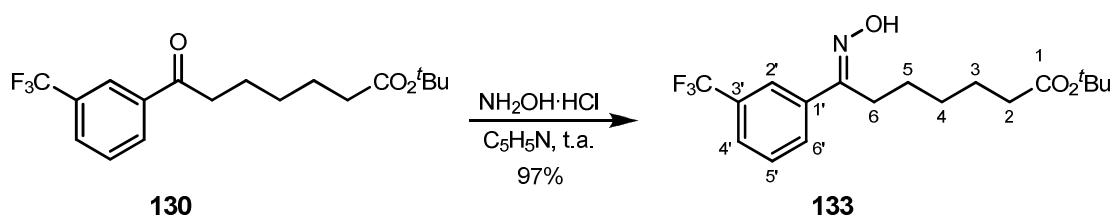
(FAB) m/z (%) 429 ($M^+ + 1$, 0.1), 427 ($M^+ - 1$, 0.3), 409 (9), 372 (4), 313 (7), 297 (8), 272 (17), 182 (27), 173 (100), 145 (18), 101 (22), 97 (3), 67 (3), 54 (4); **EMAR** m/z calculada para $C_{22}H_{28}F_3O_5$ [$M+H$] $^+$ 429.1888, encontrada 429.1984.



7-Oxo-7-(3-(trifluorometil)fenil)heptanoato de *terc*-butilo (130). A un matraz que contenía 214.3 mg (0.500 mmol) del compuesto **132**, 87 μ L (1.00 mmol) de morfolina disueltos en 2.8 mL de THF seco se añadieron, bajo atmósfera de nitrógeno, 32 mg (0.027 mmol) de $Pd(PPh_3)_4$. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 40 min. Después de este tiempo, la mezcla se vertió sobre agua y se extrajo con acetato de etilo. Las fases orgánicas se lavaron con disolución saturada de NaCl, se secaron sobre Na_2SO_4 anhidro y se filtraron. El residuo obtenido después de eliminar el disolvente a vacío se purificó por cromatografía de columna, utilizando como eluyente hexano-éter etílico (9:1), para obtener 103.3 mg (60%) del éster de *terc*-butilo **130** como un aceite incoloro.

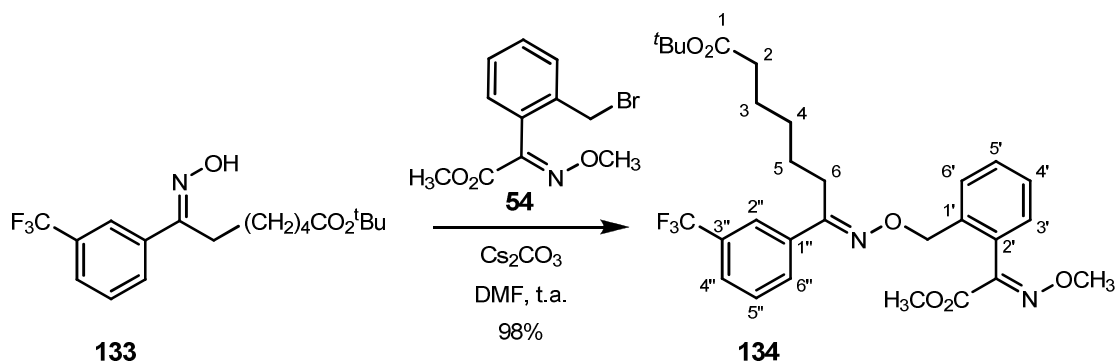
Datos espectroscópicos: IR (NaCl) ν_{max} (cm^{-1}) 3420m (ancha), 2956d, 1739f, 1685f, 1601d, 1573d, 1457d, 1435d, 1317d, 1281d, 1179m, 1129d, 1002m, 724m, 666m; **1H -RMN** (300 MHz) δ 8.20 (1H, sa, H-2'), 8.12 (1H, d, $J = 7.8$ Hz, H-6'), 7.80 (1H, d, $J = 7.8$ Hz, H-4'), 7.60 (1H, ta, $J = 7.8, 7.8$ Hz, H-5'), 3.00 (2H, t, $J = 7.2$ Hz, H_2 -6), 2.24 (2H, t, $J = 7.3$ Hz, H_2 -2), 1.77 (2H, q, $J = 7.3$ Hz, H_2 -3), 1.63 (2H, q, $J = 7.2$ Hz, H_2 -5), 1.43 (9H, s, $C(CH_3)_3$), 1.41 (2H, m, H_2 -4); **^{13}C -RMN** (75 MHz) δ 198.70 (CO), 173.02 (COO), 137.44 (C-1'), 131.18 (C-3', c, $J = 32.9$ Hz), 131.13 (C-6'), 129.31 (C-4', c, $J = 3.6$ Hz), 129.25 (C-5'), 124.82 (C-2', c, $J = 3.8$ Hz), 123.65 (CF_3 , c, $J = 272.5$ Hz), 80.06 ($C(CH_3)_3$), 38.39 (C-6), 35.31 (C-2), 28.61 (C-4), 28.07 ($C(CH_3)_3$), 24.82 (C-5), 23.62 (C-3); **EM** (FAB) m/z (%) 345 ($M^+ + 1$, 7), 344 (M^+ , 33), 338 (3), 288 (100), 270 (46), 251 (18), 225 (15), 172 (24), 153 (18),

136 (24), 106 (9); **EMAR** m/z calculada para $C_{18}H_{24}F_3O_3$ $[M+H]^+$ 345.1677, encontrada 344.9419



7-((E)-(Hidroxiimino))-7-(3-(trifluorometil)fenil)heptanoato de *tert*-butilo (133). Preparado siguiendo el procedimiento descrito para la preparación de **73**; la purificación del crudo de reacción obtenido a partir de 98.4 mg (0.286 mmol) de la cetona **130**, 80 mg (1.144 mmol) de clorhidrato de hidroxilamina y 1.5 mL de piridina seca proporcionó 99.4 mg de la oxima **133** (97%) como un aceite incoloro.

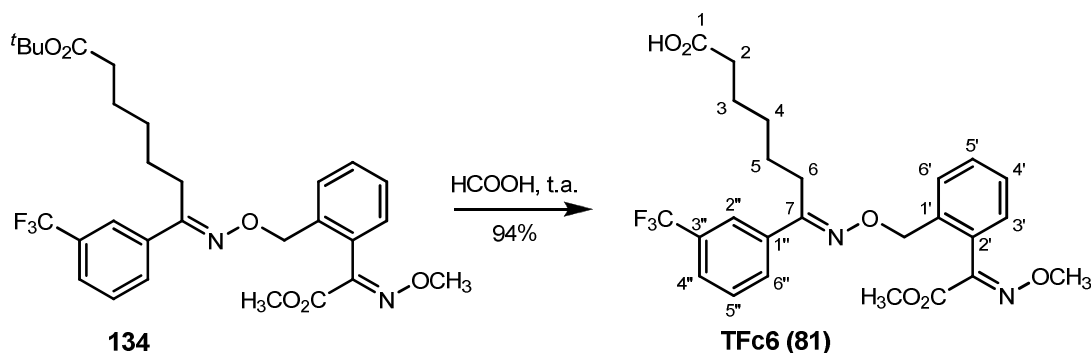
Datos espectroscópicos: **IR** (NaCl) ν_{\max} (cm^{-1}) 3365d (ancha), 2978d, 2933d, 2866d, 1728m, 1457d, 1436d, 1368m, 1334m, 1296d, 1269m, 1166f, 1127f, 1102d, 1074m, 962d, 804d, 698m, 666m; **^1H -RMN** (300 MHz) δ 7.95 (1H, sa, OH), 7.87 (1H, sa, H-2'), 7.77 (1H, d, $J = 7.8$ Hz, H-6'), 7.62 (1H, d, $J = 7.8$ Hz, H-4'), 7.50 (1H, ta, $J = 7.8, 7.8$ Hz, H-5'), 2.82 (2H, t, $J = 7.8, 7.8$ Hz, H₂-6), 2.20 (2H, t, $J = 7.4, 7.4$ Hz, H₂-2), 1.65–1.55 (4H, m, H₂-5 y H₂-3), 1.42 (9H, s, C(CH₃)₃), 1.40 (2H, m, H₂-4); **^{13}C -RMN** (75 MHz) δ 173.14 (CO₂^tBu), 158.58 (CN), 136.52 (C-1'), 130.98 (C-3', c, $J = 32.3$ Hz), 129.43 (C-6'), 129.05 (C-5'), 125.73 (C-4', c, $J = 3.6$ Hz), 124.45 (CF₃, c, $J = 272.4$ Hz), 123.04 (C-2', c, $J = 3.9$ Hz), 80.10 (C(CH₃)₃), 35.34 (C-2), 29.04 (C-4), 28.06 (C(CH₃)₃), 25.89 (C-5), 25.63 (C-6), 24.71 (C-3); **EM** (IE) m/z (%) 359 (M⁺, 0.1), 303 (5), 286 (14), 240 (1), 203 (20), 187 (2), 178 (4), 145 (5), 97 (2), 83 (2), 71 (2), 69 (8), 57 (100), 55 (11); **EMAR** m/z calculada para $C_{18}H_{24}F_3NO_3$ 359.1708, encontrada 359.1717.



(E)-7-(((2-((E)-2-Metoxi-1-(metoxiimino)-2-oxoetil)encil)oxi)imino)-7-(3-(trifluorometil)fenil)heptanoato de *terc*-butilo (134). Preparado siguiendo básicamente el procedimiento descrito para la preparación de **99**; el residuo obtenido tras 4 h de reacción a partir de una disolución que contenía 32.8 mg (0.091 mmol) de la oxima **133**, 31.2 mg (0.109 mmol) del bromuro bencílico **54**, 44 mg (0.136 mmol) de Cs_2CO_3 y 1.0 mL de DMF seca fue purificado por cromatografía en columna, utilizando hexano–éter etílico (8:2) como eluyente, obteniéndose 50.4 mg del éster *terc*-butílico **134** (98%) como un aceite incoloro.

Datos espectroscópicos: IR (NaCl) ν_{max} (cm^{-1}) 2980d, 2939m, 2869d, 1728f, 1437d, 1367d, 1344m, 1304m, 1276m, 1218m, 1127f, 1072f, 1019m, 957d, 805d, 698d; $^1\text{H-RMN}$ (300 MHz) δ 7.88 (1H, sa, H-2''), 7.75 (1H, d, $J = 7.8$ Hz, H-6''), 7.59 (1H, d, $J = 7.8$ Hz, H-4''), 7.49 (1H, m, H-3' parcialmente solapado con H-5', H-4' y H-5''), 7.46 (1H, m, H-5'' parcialmente solapado con H-5', H-4' y H-3') 7.40 (1H, m, H-4' parcialmente solapado con H-5', H-3' y H-5''), 7.38 (1H, m, H-5' parcialmente solapado con H-5', H-6' y H-5''), 7.18 (1H, dd, $J = 7.3, 1.2$ Hz, H-6'), 5.11 (2H, s, OCH_2), 4.04 (3H, s, NOCH_3), 3.81 (3H, s, CO_2CH_3), 2.74 (2H, t, $J = 7.6$ Hz, H_2 -6), 2.17 (2H, t, $J = 7.6$ Hz, H_2 -2), 1.50–1.40 (4H, m, H_2 -5 y H_2 -3), 1.42 (9H, s, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 1.37 (2H, m, H_2 -4); $^{13}\text{C-RMN}$ (75 MHz) δ 172.99 (CO_2^tBu), 163.26 (CO_2CH_3), 157.49 (CH_2CN), 149.35 (CN), 136.39 (C-1'), 136.12 (C-1''), 130.81 (C-3'', c, $J = 32.3$ Hz), 129.50 (C-4'), 129.48 (C-2'), 129.42 (C-6''), 128.82 (C-3'), 128.54 (C-5''), 128.40 (C-6'), 127.61 (C-5'), 125.56 (C-4'', c, $J = 3.7$ Hz), 123.96 (CF_3 , c, $J = 272.3$ Hz), 123.04 (C-2'', c, $J = 3.9$ Hz), 80.00

($C(CH_3)_3$), 74.49 (OCH_2), 63.79 ($NOCH_3$), 52.89 (CO_2CH_3), 35.30 (C-2), 29.12 (C-4), 28.06 ($C(CH_3)_3$), 26.21 (C-6), 26.06 (C-3), 24.71 (C-5); **EM** (IE) m/z (%) 564 (M^+ , 1), 508 (5), 491 (8), 286 (17), 240 (4), 222 (38), 206 (99), 187 (14), 172 (10), 162 (12), 146 (12), 131 (60), 116 (100), 91 (6), 57 (59); **EMAR** m/z calculada para $C_{29}H_{35}F_3N_2O_6$ 564.2447, encontrada 564.2437.

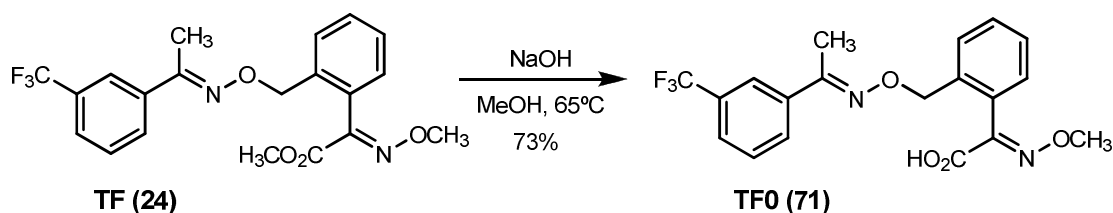


Ácido (*E*)-7-(((2-((*E*)-2-metoxi-1-(metoxiimino)-2-oxoetil) bencil) oxo)imino)-7-(3-(trifluorometil)fenil)heptanoico (Hapteno TFC6, 81). Preparado a través del procedimiento descrito para la preparación del hapteno KMa6 (**74**); la purificación por cromatografía del crudo de reacción obtenido a partir de 58.8 mg (0.104 mmol) del éster *terc*-butílico **134** y 2.1 mL de ácido fórmico, utilizando $CHCl_3$ como eluyente, proporcionó 49.7 mg del hapteno TFC6 (**81**, 94%) como un aceite incoloro.

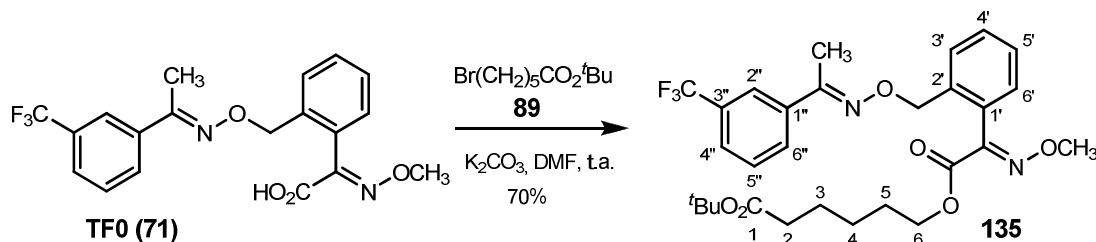
Datos espectroscópicos: IR (NaCl) ν_{\max} (cm^{-1}) 3339m (ancha), 2941f, 2853m, 2689d, 1728f, 1711f, 1607d, 1437f, 1340f, 1304f, 1277f, 1220f, 1168f, 1127f, 1071f, 1019f, 958m, 806d, 780d, 736d, 699m; 1H -RMN (300 MHz) δ 7.85 (1H, sa, H-2''), 7.75 (1H, d, $J = 7.8$ Hz, H-6''), 7.59 (1H, d, $J = 7.8$ Hz, H-4''), 7.49 (1H, m, H-3' parcialmente solapado con H-5', H-4' y H-5''), 7.48 (1H, m, H-5'' parcialmente solapado con H-5', H-4' y H-3'), 7.43 (1H, m, H-4' parcialmente solapado con H-5', H-3' y H-5''), 7.37 (1H, m, H-5' parcialmente solapado con H-4', H-3' y H-5''), 7.19 (1H, dd, $J = 7.7, 1.5$ Hz, H-6'), 5.11 (2H, s, OCH_2), 4.04 (3H, s, $NOCH_3$), 3.81 (3H, s, CO_2CH_3), 2.74 (2H, t, $J = 7.9$ Hz, H_2-6), 2.31 (2H, t, $J = 7.4$ Hz, H_2-2), 1.63 (2H, q, $J = 7.5, 7.4$ Hz, H_2-3), 1.53 (2H, q, $J = 7.9, 7.5$ Hz, H_2-5), 1.39 (2H, m, H_2-4); ^{13}C -RMN (75 MHz) δ 179.05 (CO_2H), 163.31 (CO_2CH_3), 157.40 (CH_2CN), 149.35 (CN),

136.33 (C-1'), 136.06 (C-1''), 130.92 (C-3'', c, $J = 32.2$ Hz), 130.20 (C-2'), 129.50 (C-4'), 129.44 (C-6''), 128.90 (C-3'), 128.62 (C-5''), 128.43 (C-6'), 127.67 (C-5'), 125.62 (C-4'', c, $J = 3.8$ Hz), 123.94 (CF₃, c, $J = 272.4$ Hz), 123.05 (C-2'', c, $J = 3.8$ Hz), 74.54 (OCH₂), 63.77 (NOCH₃), 52.89 (CO₂CH₃), 33.70 (C-2), 28.96 (C-4), 26.10 (C-6), 25.95 (C-5), 24.21 (C-3); **EM** (IE) m/z (%) 508 (M⁺, 1); 491 (2), 286 (8), 266 (3), 222 (35), 206 (88), 190 (7), 187 (9), 172 (6), 146 (4), 132 (26), 131 (57), 116 (100), 105 (5), 91 (5), 59 (32), 57 (39); **EMAR** m/z calculada para C₂₆H₂₇F₃N₂O₆ 508.1821, encontrada 508.1807.

5.2.3.4. Síntesis de los haptenos TF0 y TFe6

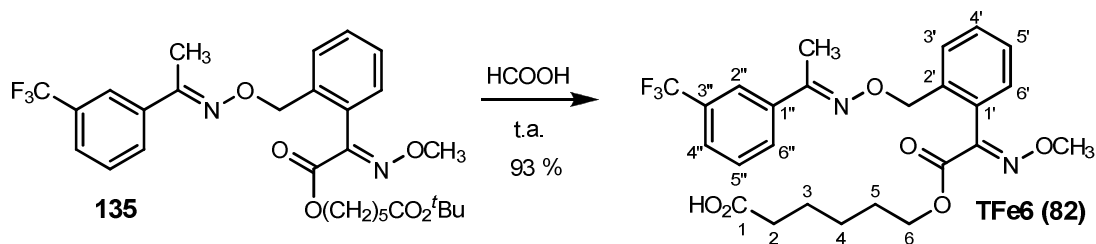


Ácido (*E*)-2-(metoxiimino)-2-(2-(((*E*)-1-(3-(trifluorometil) fenil) etilideno) amino)oxi)metil)fenil)acético (Hapteno TF0, 71). Preparado siguiendo el procedimiento utilizado para la preparación de **41**; la purificación por cristalización (hexano–acetona (95:5) del residuo obtenido a partir de 5.0 g de TF (12.24 mmol), 12.5 mL de una disolución 5 M de NaOH y 70 mL de metanol, proporcionó 3.52 g del hapteno TF0 (**71**, 73%) como un sólido blanco cristalino. Este producto ha sido previamente descrito (CAS 252913–85–2). Las propiedades físicas y espectroscópicas del producto obtenido coinciden con las anteriormente descritas (Mercader *et al.*, 2008b).



6-((E)-2-(Metoxiimino)-2-(2-(((E)-1-(3-trifluorometil) fenil) etilideno) amino)oxi)metil)fenil)acetoxi)hexanoato de *terc*-butilo (135). Obtenido siguiendo el procedimiento descrito para la preparación de **112**; la purificación del crudo de reacción obtenido a partir de 100 mg (0.253 mmol) del ácido **71**, 76.2 mg (0.304 mmol) del bromuro alquílico **89**, 42 mg (0.304 mmol) de K₂CO₃ anhidro y 10 mL de DMF seca, proporcionó 100 mg del éster *terc*-butílico **135** (70%) como un aceite incoloro.

Datos espectroscópicos: IR (NaCl) ν_{\max} (cm⁻¹) 2984d, 2940m, 2859d, 1725f, 1618d, 1459d, 1368m, 1341m, 1298m, 1275f, 1216m, 1167f, 1127f, 1071f, 1014m, 941d, 804d, 702d; **¹H-RMN** (300 MHz) δ 7.86 (1H, sa, H-2''), 7.79 (1H, d, $J = 7.9$ Hz, H-6''), 7.59 (1H, d, $J = 7.9$ Hz, H-4''), 7.48 (1H, m, H-6' parcialmente solapado con H-4', H-5' y H-5''), 7.46 (1H, m, H-5'' parcialmente solapado con H-4', H-5' y H-6') 7.42 (1H, m, H-5' parcialmente solapado con H-4', H-6' y H-5''), 7.37 (1H, m, H-4' parcialmente solapado con H-5', H-6' y H-5''), 7.18 (1H, dd, $J = 7.5, 1.8$ Hz, H-3'), 5.14 (2H, s, OCH₂), 4.20 (2H, t, $J = 6.8$ Hz, H₂-6), 4.02 (3H, s, NOCH₃), 2.23 (3H, s, CH₃), 2.15 (2H, t, $J = 7.4$ Hz, H₂-2), 1.65 (2H, q, $J = 7.8, 6.8$ Hz, H₂-5), 1.54 (2H, q, $J = 7.8, 7.4$ Hz, H₂-3), 1.43 (9H, s, C(CH₃)₃), 1.30 (2H, m, H₂-4); **¹³C-RMN** (75 MHz) δ 172.86 (CO₂^tBu), 162.87 (CO₂CH₂), 151.90 (CH₃CN), 149.68 (CN), 137.18 (C-2'), 135.90 (C-1''), 129.80 (C-3'', c, $J = 32.1$ Hz), 129.28 (C-5' y C-6''), 128.81 (C-6'), 128.61 (C-5''), 128.49 (C-3'), 127.68 (C-4'), 127.32 (C-1'), 125.62 (C-4'', c, $J = 3.8$ Hz), 123.96 (CF₃, c, $J = 272.6$ Hz), 122.88 (C-2'', c, $J = 3.8$ Hz), 80.07 (C(CH₃)₃), 74.89 (C-6), 65.77 (OCH₂), 63.73 (NOCH₃), 35.28 (C-2), 28.16 (C-5), 28.08 (C(CH₃)₃), 25.23 (C-4), 24.37 (C-3), 12.57 (CH₃); **EM** (IE) m/z (%) 564 (M⁺, 0.2), 533 (2), 509 (1), 491 (8), 322 (35), 192 (79), 186 (42), 172 (5), 145 (12), 132 (8), 116 (94), 115 (43), 97 (19), 69 (32), 57 (100); **EMAR** m/z calculada para C₂₉H₃₅F₃N₂O 564.2447, encontrada 564.2447.

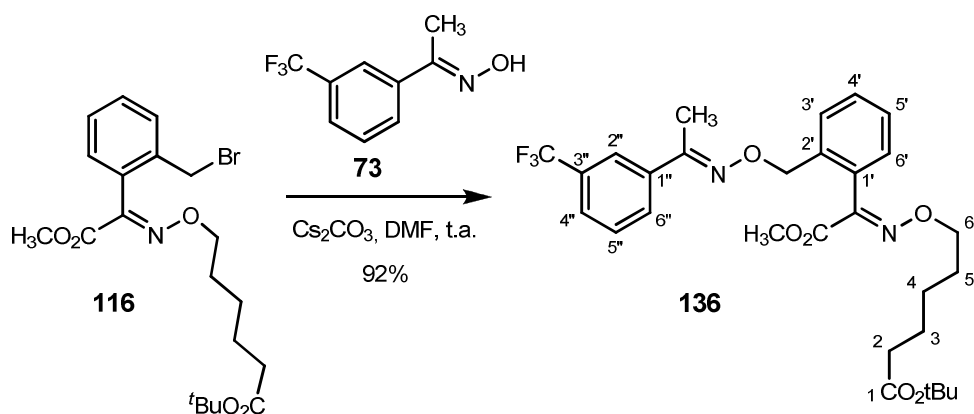


Ácido 6-((*E*)-2-(metoxiimino)-2-(2-(((*E*)-1-(3-trifluorometil) fenil) etilideno)amino)oxi)metil)fenil)acetoxi)hexanoíco (Hapteno TFe6, 82).

Preparado siguiendo el procedimiento descrito para la preparación del hapteno KMa6 (74); la purificación por cromatografía en columna del crudo de reacción obtenido a partir de 32.7 mg (0.079 mmol) del éster *tert*-butílico 135 y 1.6 mL de ácido fórmico, utilizando CHCl₃ como eluyente, proporcionó 30.3 mg del hapteno TFe6 (82, 93%) como un aceite incoloro.

Datos espectroscópicos: IR (NaCl) ν_{\max} (cm⁻¹) 3347m (ancha), 3063d, 2941m, 2859d, 1713f, 1608d, 1586d, 1446d, 1371d, 1341f, 1299f, 1276f, 1216m, 1195m, 1168f, 1126f, 1071f, 1014f, 951d, 804d, 738m, 698m; **¹H-RMN** (300 MHz) δ 7.86 (1H, sa, H-2''), 7.79 (1H, d, $J = 7.8$ Hz, H-6''), 7.59 (1H, d, $J = 7.8$ Hz, H-4''), 7.48 (1H, m, H-6' parcialmente solapado con H-5''), 7.46 (1H, m, H-5'' parcialmente solapado con H-5' y H-6'), 7.42 (1H, m, H-5' parcialmente solapado con H-4' y H-5''), 7.37 (1H, m, H-4' parcialmente solapado con H-5'), 7.18 (1H, dd, $J = 7.6, 1.7$ Hz, H-3'), 5.15 (2H, s, OCH₂), 4.21 (2H, t, $J = 6.7$ Hz, H₂-6), 4.02 (3H, s, NOCH₃), 2.31 (2H, t, $J = 7.4$ Hz, H₂-2) 2.23 (3H, s, CH₃), 1.72–1.52 (4H, m, H₂-5 y H₂-3), 1.31 (2H, m, H₂-4); **¹³C-RMN** (75 MHz) δ 179.28 (CO₂H), 162.83 (CO₂CH₂), 153.66 (CH₃CN), 149.65 (CN), 137.14 (C-2'), 135.87 (C-1''), 130.70 (C-3'', c, $J = 32.2$ Hz), 129.88 (C-1'), 129.28 (C-5' y C-6''), 128.81 (C-6'), 128.63 (C-5''), 128.47 (C-3'), 127.66 (C-4'), 125.61 (C-4'', c, $J = 3.8$ Hz), 123.92 (CF₃, c, $J = 272.5$ Hz), 122.83 (C-2'', c, $J = 3.8$ Hz), 74.86 (C-6), 65.61 (OCH₂), 63.72 (NOCH₃), 33.65 (C-2), 28.04 (C-5), 25.19 (C-4), 24.08 (C-3), 12.57 (CH₃); **EM** (FAB) m/z (%) 509 (M⁺+1, 44), 507 (100), 338 (6), 191 (19), 185 (63), 153 (50), 137 (18), 135 (42), 115 (22), 106 (18); **EMAR** m/z calculada para C₂₅H₂₈F₃N₂O₆ [M+H]⁺ 509.1900, encontrada 509.1901.

5.2.3.5. Síntesis del hapteno TFo6

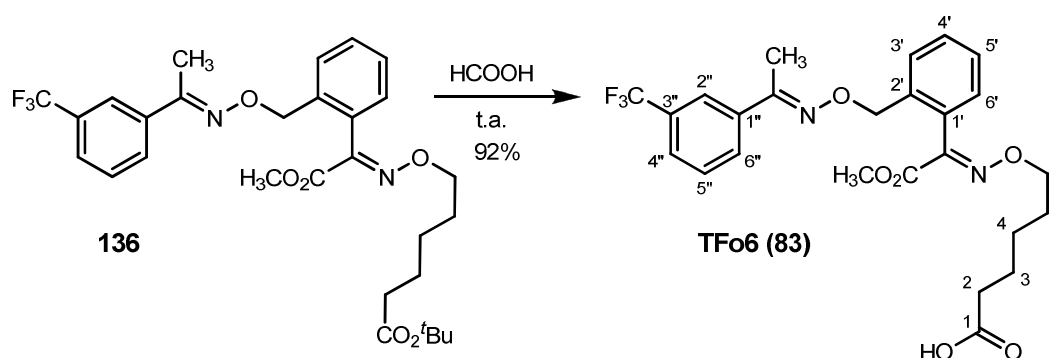


6-(((*E*)-2-Metoxi-2-oxo-1-(2-(((*E*)-1-(3-trifluorometil) fenil) etilideno) amino)oxi)metil)fenil)etilideno)amino)oxi)hexanoato de *terc*-butilo (136).

Preparado siguiendo el procedimiento descrito para la preparación de **99**; el residuo obtenido tras 6 h de reacción a partir de una disolución que contenía 52.2 mg (0.118 mmol) del bromuro bencílico **116**, 25.6 mg (0.118 mmol) de la oxima **73**, 57.6 mg (0.177 mmol) de Cs_2CO_3 y 0.5 mL de DMF seca fue purificado por cromatografía en columna, utilizando hexano-éter etílico (de 9:1 a 8:2) como eluyente, obteniéndose 62.6 mg del éster *terc*-butílico **136** (98%) como un aceite incoloro.

Datos espectroscópicos: IR (NaCl) ν_{max} (cm^{-1}) 2974m, 2938m, 2872d, 1723f, 1608d, 1590d, 1437m, 1368m, 1341f, 1299m, 1275f, 1219m, 1167f, 1127f, 1072f, 1000m, 828d, 804d, 780d, 698m, 672m; **$^1\text{H-RMN}$** (300 MHz) δ 7.86 (1H, sa, H-2''), 7.79 (1H, d, $J = 7.9$ Hz, H-6''), 7.59 (1H, d, $J = 7.9$ Hz, H-4''), 7.48 (1H, m, H-6' parcialmente solapado con H-4', H-5' y H-5''), 7.46 (1H, m, H-5'' parcialmente solapado con H-4', H-5' y H-6') 7.42 (1H, m, H-5' parcialmente solapado con H-4', H-6' y H-5''), 7.38 (1H, m, H-4' parcialmente solapado con H-5', H-6' y H-5''), 7.18 (1H, dd, $J = 7.1, 1.7$ Hz, H-3''), 5.14 (2H, s, OCH_2), 4.23 (2H, t, $J = 6.9$ Hz, H₂-6), 3.80 (3H, s, CO_2CH_3), 2.22 (3H, s, CH_3), 2.11 (2H, t, $J = 7.5$ Hz, H₂-2), 1.66 (2H, q, $J = 7.5, 6.9$ Hz, H₂-5), 1.54 (2H, q, $J = 7.5, 7.5$ Hz, H₂-3), 1.42 (9H, s, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 1.27 (2H, m, H₂-4); **$^{13}\text{C-RMN}$** (75 MHz) δ 172.89 (CO_2^tBu), 163.45 (CO_2CH_3), 153.54 (CH_3CN), 149.24 (CN), 137.17 (C-2'), 135.87 (C-1''), 130.70 (C-3'', c, $J = 32.0$ Hz),

129.99 (C-1'), 129.23 (C-6''), 129.22 (C-5'), 128.79 (C-6'), 128.64 (C-5''), 128.49 (C-3'), 127.69 (C-4'), 125.56 (C-4'', c, $J = 3.8$ Hz), 123.90 (CF₃, c, $J = 272.0$ Hz), 122.82 (C-2'', c, $J = 3.8$ Hz), 79.99 (C(CH₃)₃), 76.13 (C-6), 74.91 (OCH₂), 52.80 (CO₂CH₃), 35.32 (C-2), 28.68 (C-5), 28.05 (C(CH₃)₃), 25.11 (C-4), 24.70 (C-3), 12.50 (CH₃); **EM** (FAB) m/z (%) 565 (M⁺+1, 2), 377 (4), 362 (4), 322 (70), 306 (38), 192 (61), 186 (87), 172 (12), 160 (12), 148 (32), 132 (12), 116 (100), 97 (12), 57 (57); **EMAR** m/z calculada para C₂₉H₃₆F₃N₂O₆ [M+H]⁺ 565.2525, encontrada 565.2526.

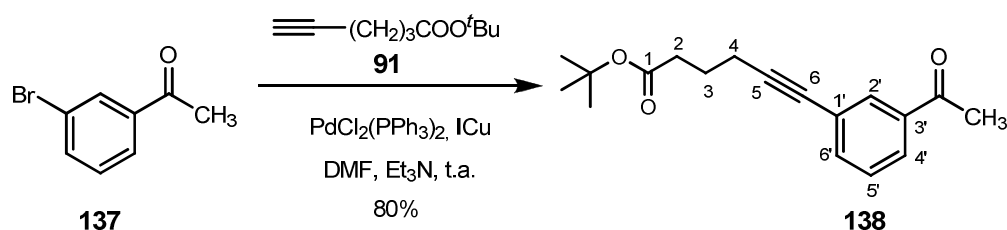


Ácido 6-(((E)-2-metoxi-2-oxo-1-(2-(((E)-1-(3-trifluorometil) fenil) etilideno) amino) oxi) metil) fenil) etilideno) amino) oxi) hexanoíco (Hapteno TFo6, 83). Preparado según las condiciones de hidrólisis utilizadas para la preparación del hapteno KMa6 (74); la purificación por cromatografía en columna del crudo de reacción, empleando cloroformo–metanol (99:1) como eluyente, obtenido a partir de 88.8 mg (0.154 mmol) del éster *tert*-butílico 136 y 3.2 mL de ácido fórmico, utilizando CHCl₃ como eluyente, proporcionó 73.6 mg del hapteno TFo6 (83, 92%) como un aceite incoloro.

Datos espectroscópicos: IR (NaCl) ν_{\max} (cm⁻¹) 3314m (ancha), 2948m, 2880m, 1727f, 1709f, 1608d, 1586d, 1437m, 1371m, 1341f, 1300m, 1275f, 1219m, 1167f, 1120f, 1072f, 1001f, 828d, 804d, 737m, 698m ; **¹H-RMN** (300 MHz) δ 7.86 (1H, sa, H-2''), 7.79 (1H, d, $J = 7.8$ Hz, H-6''), 7.59 (1H, d, $J = 7.8$ Hz, H-4''), 7.48 (1H, m, H-6' parcialmente solapado con H-4', H-5' y H-5''), 7.46 (1H, m, H-5'' parcialmente solapado con H-4', H-5' y H-6') 7.42 (1H, m, H-5' parcialmente solapado con H-4', H-6' y H-5''), 7.37 (1H, m, H-4' parcialmente solapado con H-5', H-6' y H-5''), 7.17 (1H, dd, $J = 7.4, 1.5$ Hz,

H-3'), 5.14 (2H, s, OCH₂), 4.24 (2H, t, $J = 6.7$ Hz, H₂-6), 3.81 (3H, s, CO₂CH₃), 2.29 (2H, t, $J = 7.4$ Hz, H₂-2), 2.22 (3H, s, CH₃), 1.67 (2H, q, $J = 7.4, 6.7$ Hz, H₂-5), 1.59 (2H, q, $J = 7.4, 7.4$ Hz, H₂-3), 1.30 (2H, m, H₂-4); **¹³C-RMN** (75 MHz) δ 179.44 (CO₂H), 163.47 (CO₂CH₃), 153.63 (CH₃CN), 149.31 (CN), 137.13 (C-2'), 135.82 (C-1''), 130.68 (C-3'', c, $J = 32.1$ Hz), 129.95 (C-1'), 129.25 (C-5' y C-6''), 128.80 (C-6'), 128.63 (C-5''), 128.48 (C-3'), 127.70 (C-4'), 125.59 (C-4'', c, $J = 3.8$ Hz), 124.00 (CF₃, c, $J = 272.3$ Hz), 122.81 (C-2'', c, $J = 3.8$ Hz), 75.97 (C-6), 74.88 (OCH₂), 52.82 (CO₂CH₃), 33.71 (C-2), 28.57 (C-5), 25.09 (C-4), 24.21 (C-3), 12.53 (CH₃); **EM** (FAB) m/z (%) 509 (M⁺+1, 20), 322 (4), 306 (6), 185 (59), 153 (39), 147 (5), 135 (30), 116 (100), 106 (13); **EMAR** m/z calculada para C₂₅H₂₈F₃N₂O₆ [M+H]⁺ 509.1899, encontrada 509.1912.

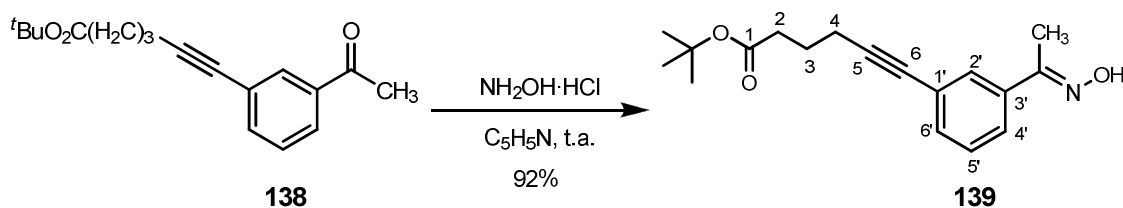
5.2.3.6. Síntesis del hapteno TFt6



6-(3-Acetilfenil)hex-5-inoato de *terc*-butilo (138). Preparado siguiendo el procedimiento descrito para **100**; la purificación por cromatografía en columna, utilizando hexano-éter etílico (9:1) como eluyente, del residuo obtenido tras 6 h de reacción a partir de una disolución que contenía 360.3 mg (1.810 mmol) del bromuro arílico **137**, 10.3 mg (3%) de CuI, 912.7 mg (4.430 mmol) del alquino **91**, 5.5 mL de DMF seca, 3.0 mL de de Et₃N y 38 mg (0.044 mmol) de Pd(PPh₃)₂Cl₂, proporcionó 414.2 mg del alquino **138** (80%) como un aceite amarillo.

Datos espectroscópicos: IR (NaCl) ν_{\max} (cm⁻¹) 2977m, 2934m, 2233d, 1727f, 1687f, 1597d, 1574d, 1478d, 1424m, 1366f, 1219f, 1148f, 1039d, 956d, 916d, 845d, 800m, 688m; **¹H-RMN** (300 MHz) δ 7.96 (1H, t, $J = 1.6$ Hz, H-2'), 7.85 (1H, dt, $J = 7.7, 1.6, 1.6$ Hz, H-6'), 7.56 (1H, dt, $J = 7.7, 1.6, 1.3$ Hz, H-4'), 7.37 (1H, t, $J = 7.7$ Hz, H-5'), 2.59 (3H, s, CH₃), 2.47 (2H, t, $J = 7.0$ Hz, H-4),

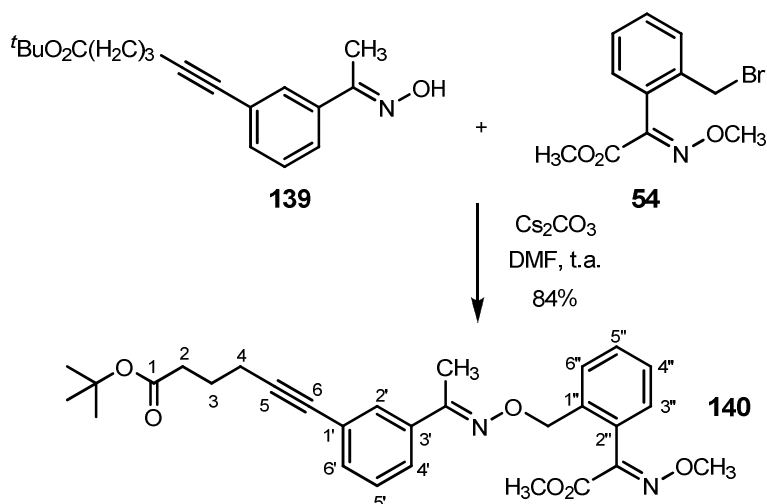
2.40 (2H, t, $J = 7.0$ Hz, H-2), 1.89 (2H, q, $J = 7.0$ Hz, H-3), 1.45 (9H, s, $C(CH_3)_3$); ^{13}C -RMN (75 MHz) 197.45 (CO), 172.40 (CO_2^tBu), 137.07 (C-3'), 135.86 (C-4'), 131.54 (C-2'), 128.52 (C-5'), 127.22 (C-6'), 124.41 (C-1'), 90.36 (C-5), 80.32 (C-6), 80.27 ($C(CH_3)_3$), 34.45 (C-2), 28.06 ($C(CH_3)_3$), 26.59 (CH_3), 23.97 (C-3), 18.81 (C-4); **EMAR** (ES) m/z calculada para $C_{18}H_{22}NaO_3$ $[M+Na]^+$ 309.1467, encontrada 309.1460.



6-(3-(1-((E)-Hidroxiimino)etil)fenil)hex-5-inoato de *terc*-butilo (139).

Preparado siguiendo el procedimiento utilizado para la preparación de **73**; la purificación del crudo de reacción obtenido a partir de 56.4 mg (0.197 mmol) de la cetona **138**, 55 mg (0.788 mmol) de clorhidrato de hidroxilamina y 1.3 mL de piridina seca proporcionó 54.9 mg de la oxima **139** (92%) como un aceite ligeramente coloreado.

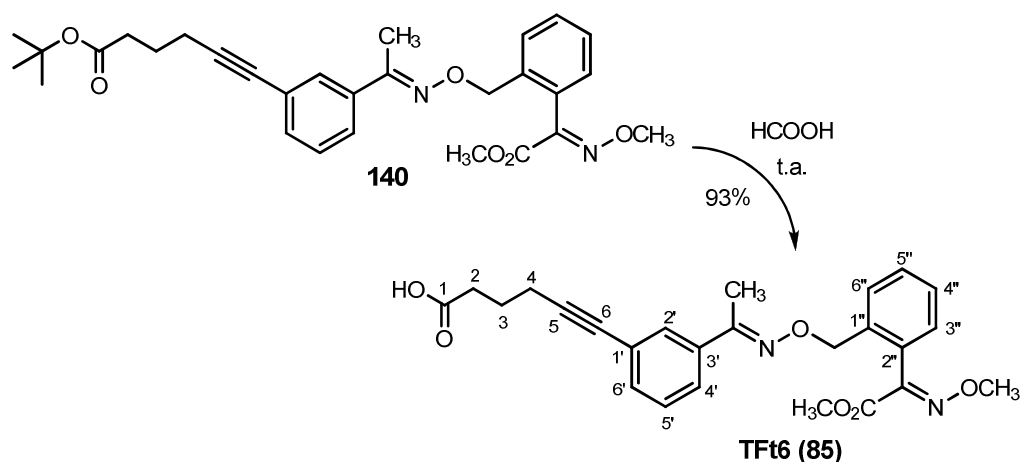
Datos espectroscópicos: IR (NaCl) ν_{max} (cm^{-1}) 3406m, 2975m, 2933m, 2355d, 2219d, 1725f, 1594d, 1368m, 1313m, 1247m, 1149f, 1003m, 911d, 843d, 796d, 693d; 1H -RMN (300 MHz) δ 8.26 (1H, sa, OH), 7.64 (1H, t, $J = 1.5$ Hz, H-2'), 7.55 (1H, dt, $J = 7.7, 1.5, 1.5$ Hz, H-6'), 7.39 (1H, dt, $J = 7.7, 1.5, 1.5$ Hz, H-4'), 7.29 (1H, t, $J = 7.7$ Hz, H-5'), 2.47 (2H, t, $J = 7.0$ Hz, H-4), 2.41 (2H, t, $J = 7.0$ Hz, H-2), 2.27 (3H, s, CH_3), 1.89 (2H, q, $J = 7.0$ Hz, H-3), 1.45 (9H, s, ($C(CH_3)_3$)); ^{13}C -RMN (75 MHz) 172.36 (CO_2^tBu), 155.51 (CN), 136.60 (C-3'), 132.20 (C-4'), 129.30 (C-2'), 128.38 (C-5'), 125.21 (C-6'), 124.11 (C-1'), 89.58 (C-5), 80.85 (C-6), 80.35 ($C(CH_3)_3$), 34.45 (C-2), 28.13 ($C(CH_3)_3$), 24.12 (C-3), 18.84 (C-4), 11.96 (CH_3); **EMAR** (ES) m/z calculada para $C_{18}H_{23}NNaO_3$ $[M+Na]^+$ 324.1576, encontrada 324.1580.



6-(3-((*E*)-1-(((2-((*E*)-2-Metoxi-1-(metoxiimino)-2-oxoetil) bencil) oxi) imino)etil)fenil)hex-5-inoato de *terc*-butilo (140**).** Obtenido siguiendo un procedimiento análogo al descrito para la preparación de **99**; el residuo obtenido tras 15 h de reacción a partir de una disolución que contenía 57.4 mg (0.201 mmol) del bromuro bencílico **54**, 40.3 mg (0.134 mmol) de la oxima **139**, 65.5 mg (0.201 mmol) de Cs_2CO_3 y 0.9 mL de DMF seca fue purificado por cromatografía en columna, utilizando hexano-éter etílico (de 9:1 a 8:2) como eluyente, obteniéndose 57.3 mg del éster *terc*-butílico **140** (84%) como un aceite incoloro.

Datos espectroscópicos: IR (NaCl) ν_{max} (cm^{-1}) 2972d, 2938d, 1727f, 1590d, 1437d, 1367m, 1320d, 1219m, 1147m, 1069f, 1019m, 946d, 861d, 787d; $^1\text{H-RMN}$ (300 MHz) δ 7.62 (1H, t, $J = 1.5$ Hz, H-2'), 7.55–7.47 (2H, m, H-6' y H-3''), 7.46–7.33 (3H, m, H-5'', H-4'' y H-4'), 7.25 (1H, t, $J = 7.7$ Hz, H-5'), 7.18 (1H, dd, $J = 7.3, 1.4$ Hz, H-6''), 5.12 (2H, s, OCH_2), 4.03 (3H, s, NOCH_3), 3.82 (3H, s, CO_2CH_3), 2.46 (2H, t, $J = 7.0$ Hz, H-4), 2.40 (2H, t, $J = 7.0$ Hz, H-2), 2.18 (3H, s, CH_3), 1.89 (2H, q, $J = 7.0$ Hz, H-3), 1.46 (9H, s, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$); $^{13}\text{C-RMN}$ (75 MHz) 172.49 (CO_2^tBu), 163.28 (CO_2CH_3), 154.39 (CH_3CN), 149.77 (CN), 136.51 (C-1''), 136.17 (C-3'), 132.12 (C-6'), 129.36 (C-2'), 128.71 (C-4'), 128.60 (C-5''), 128.50 (C-6''), 128.24 (C-5'), 127.63 (C-4''), 125.34 (C-3'' y C-2''), 123.92 (C-1'), 89.43 (C-5), 80.92 (C-6), 80.29 (C(CH_3)₃), 74.67 (OCH_2), 63.77 (NOCH_3), 52.87 (CO_2CH_3), 34.44 (C-2), 28.10

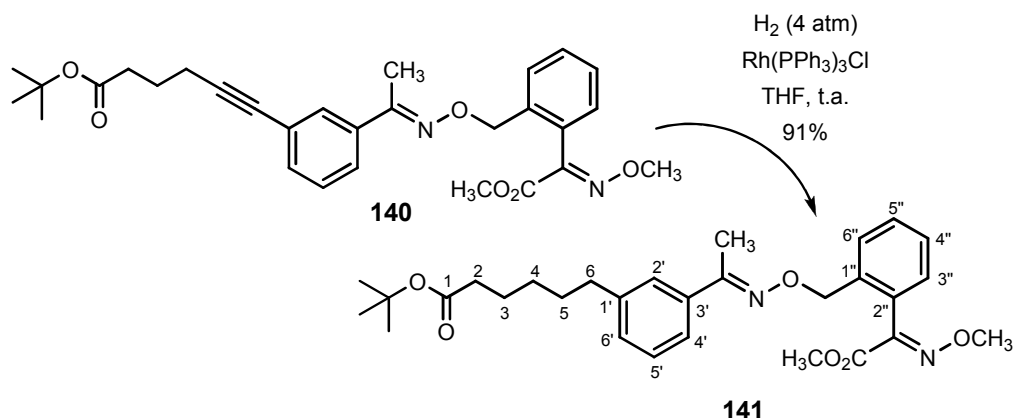
(C(CH₃)₃), 24.05 (C–3), 18.86 (C–4), 12.63 (CH₃); **EMAR** (ES) *m/z* calculada para C₂₉H₃₄N₂NaO₆ [M+Na]⁺ 529.2315, encontrada 529.2319.



Ácido 6-(3-((E)-1-(((2-((E)-2-metoxi-1-(metoxiimino)-2-oxoetil)encil)oxi)imino)etil)fenil)hex-5-inoíco (Hapteno TFt6, 85). Obtenido mediante el mismo procedimiento utilizado para la preparación del hapteno KMa6 (**74**); la purificación por cromatografía en columna del crudo de reacción obtenido a partir de 49.8 mg (0.098 mmol) del éster *terc*-butílico **140** y 2.0 mL de ácido fórmico, proporcionó 40.8 mg del hapteno TFt6 (**85**, 92%) como un aceite incoloro.

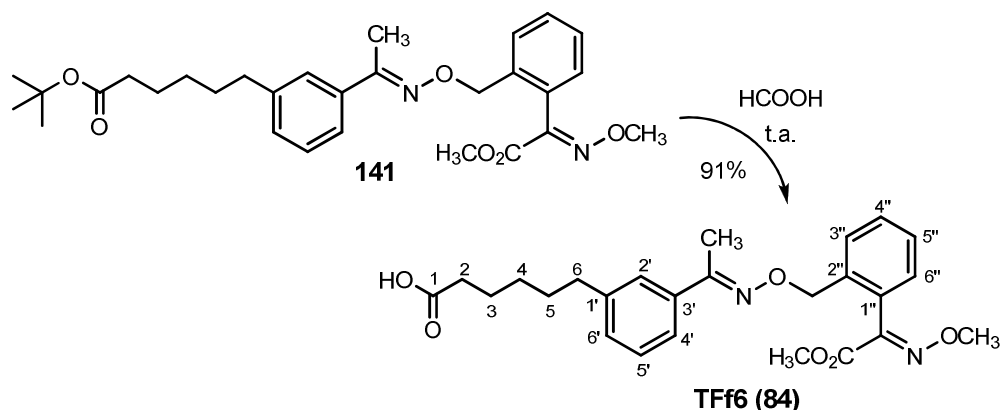
Datos espectroscópicos: IR (NaCl) ν_{\max} (cm⁻¹) 2942m, 1726f, 1590d, 1437m, 1318m, 1219m, 1121d, 1069f, 1019f, 955d, 910m, 732f; ¹H-RMN (300 MHz) δ 7.62 (1H, t, *J* = 1.5 Hz, H–2'), 7.55–7.47 (2H, m, H–6' y H–3''), 7.46–7.33 (3H, m, H–5'', H–4'' y H–4'), 7.25 (1H, t, *J* = 7.7 Hz, H–5'), 7.18 (1H, dd, *J* = 7.3, 1.4 Hz, H–6''), 5.12 (2H, s, OCH₂), 4.03 (3H, s, NOCH₃), 3.81 (3H, s, CO₂CH₃), 2.56 (2H, t, *J* = 7.0 Hz, H–4), 2.51 (2H, t, *J* = 7.0 Hz, H–2), 2.18 (3H, s, CH₃), 1.94 (2H, q, *J* = 7.0 Hz, H–3); ¹³C-RMN (75 MHz) 178.44 (CO₂H), 163.31 (CO₂CH₃), 154.38 (CH₃CM), 149.60 (CN), 136.52 (C–1''), 136.16 (C–3'), 132.07 (C–6'), 129.74 (C–2''), 129.36 (C–2'), 129.23 (C–5''), 128.73 (C–4'), 128.48 (C–6''), 128.24 (C–5'), 127.63 (C–4''), 125.45 (C–3''), 123.75 (C–1'), 89.92 (C–5), 81.30 (C–6), 74.67 (OCH₂), 63.77 (NOCH₃), 52.87 (CO₂CH₃), 32.69 (C–2), 23.54 (C–3), 18.77 (C–4), 12.60 (CH₃); **EMAR** (ES) *m/z* calculada para C₂₅H₂₆N₂NaO₆ [M+Na]⁺ 473.1689, encontrada 473.1687.

5.2.3.7. Síntesis del hapteno TFf6



6-(3-((*E*)-1-(2-((*E*)-2-Metoxi-1-(metoxiimino)-2-oxoetil)bencil)oxi) imino)etil)fenil)hexanoato de *terc*-butilo (141**). Preparado siguiendo el mismo procedimiento descrito para la preparación de **101**; la purificación cromatográfica, utilizando hexano–éter etílico (8:2) como eluyente, del crudo de reacción obtenido a partir de 62.5 mg (0.123 mmol) del alquino **140**, 5.7 mg (0.006 mmol) de $\text{Rh}(\text{PPh}_3)_3\text{Cl}$ y 2.7 mL de THF, proporcionó 57.1 mg del éster *terc*-butílico **141** (91%) como un aceite incoloro.**

Datos espectroscópicos: IR (NaCl) ν_{max} (cm^{-1}) 2976f, 2936f, 2858f, 1731f, 1592d, 1485m, 1437f, 1391m, 1367f, 1218f, 1155f, 1069f, 1020f, 957f, 898m, 790m; $^1\text{H-RMN}$ (300 MHz) δ 7.51 (1H, dd, $J = 7.4, 1.3$ Hz, H-3''), 7.46–7.33 (4H, m, H-2', H-4', H-4'' y H-5''), 7.25 (1H, t, $J = 7.8$ Hz, H-5'), 7.21–7.12 (2H, m, H-6'' y H-6'), 5.13 (2H, s, OCH_2), 4.03 (3H, s, NOCH_3), 3.81 (3H, s, CO_2CH_3), 2.62 (2H, t, $J = 7.5$ Hz, H-6), 2.21 (2H, t, $J = 7.5$ Hz, H-2), 2.20 (3H, s, CH_3), 1.69–1.55 (4H, m, H-5 y H-3), 1.43 (9H, s, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 1.41–1.32 (2H, m, H-4); $^{13}\text{C-RMN}$ (75 MHz) 173.14 (CO_2^tBu), 163.28 (CO_2CH_3), 155.29 (CH_3CN), 149.58 (CN), 142.63 (C-1'), 136.46 (C-1''), 136.24 (C-3'), 129.73 (C-2''), 129.38 (C-6'), 129.16 (C-6''), 128.67 (C-3''), 128.49 (C-5''), 128.23 (C-5'), 127.53 (C-4''), 126.07 (C-2'), 123.58 (C-4'), 79.92 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 74.52 (OCH_2), 63.74 (NOCH_3), 52.82 (CO_2CH_3), 35.62 (C-6), 35.50 (C-2), 31.06 (C-5), 28.68 (C-4), 28.05 ($\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 24.93 (C-3), 12.86 (CH_3); **EMAR** (ES) m/z calculada para $\text{C}_{29}\text{H}_{38}\text{N}_2\text{NaO}_6$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 533.2628, encontrada 533.2630.



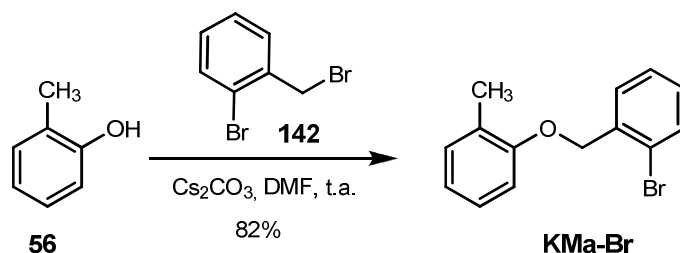
Ácido 6-(3-((*E*)-1-(((2-((*E*)-2-metoxi-1-(metoxiimino)-2-oxoetil)encil)oxi)imino)etil)fenil)hexanoíco (Hapteno TFf6, 84). Preparado siguiendo el procedimiento de hidrólisis descrito para la preparación del hapteno KMa6 (74); la purificación por cromatografía en columna del crudo de reacción obtenido a partir de 26.5 mg (0.052 mmol) del éster *tert*-butílico **141** y 1.0 mL de ácido fórmico, utilizando CHCl_3 como eluyente, proporcionó 21.4 mg del hapteno TFf6 (**84**, 91%) como un sólido blanco.

Datos físicos y espectroscópicos: Pf. 85–87 °C (Hexano–Benceno); IR (KBr) ν_{max} (cm^{-1}) 3060m, 2933f, 1717f, 1595d, 1436m, 1298f, 1231m, 1203m, 1066f, 1010f, 932f, 872d, 773m; $^1\text{H-RMN}$ (300 MHz) δ 7.50 (1H, dd, $J = 7.4, 1.3$ Hz, H–3''), 7.46–7.33 (4H, m, H–2', H–4', H–4'' y H–5''), 7.25 (1H, t, $J = 7.7$ Hz, H–5'), 7.21–7.14 (2H, m, H–6'' y H–6'), 5.13 (2H, s, OCH_2), 4.03 (3H, s, NOCH_3), 3.81 (3H, s, CO_2CH_3), 2.62 (2H, t, $J = 7.5$ Hz, H–6), 2.35 (2H, t, $J = 7.5$ Hz, H–2), 2.20 (3H, s, CH_3), 1.73–1.58 (4H, m, H–5 y H–3), 1.43–1.33 (2H, m, H–4); $^{13}\text{C-RMN}$ (75 MHz) 178.90 (CO_2H), 163.31 (CO_2CH_3), 155.34 (CH_3CN), 149.60 (CN), 142.49 (C–1'), 136.49 (C–1''), 136.25 (C–3'), 129.74 (C–2''), 129.34 (C–6'), 129.17 (C–6''), 128.70 (C–3''), 128.46 (C–5''), 128.28 (C–5'), 127.58 (C–4''), 126.11 (C–2'), 123.69 (C–4'), 74.56 (OCH_2), 63.76 (NOCH_3), 52.86 (CO_2CH_3), 35.60 (C–6), 33.78 (C–2), 30.96 (C–5), 28.57 (C–4), 24.47 (C–3), 12.90 (CH_3); **EMAR** (ES) m/z calculada para $\text{C}_{25}\text{H}_{38}\text{N}_2\text{NaO}_6$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 477.2002, encontrada 477.2005.

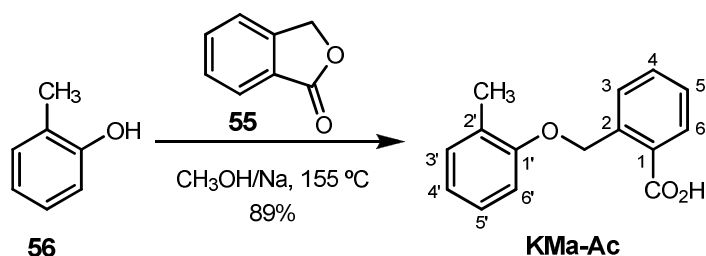
5.3. Síntesis de análogos

5.3.1. Síntesis de análogos de kresoxim–methyl

5.3.1.1. Síntesis de análogos del grupo I



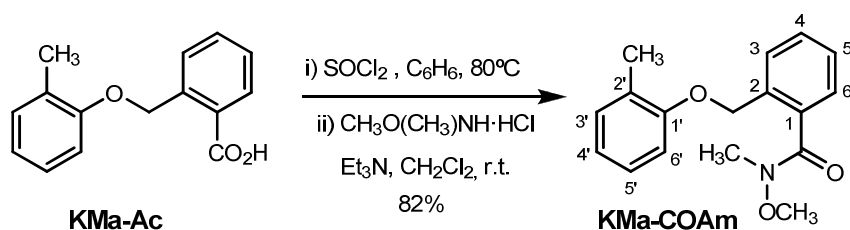
1-Bromo-2-(o-toliloximetil)benzene (KMa-Br). A un matraz que contenía 372.7 mg (1.511 mmol) del bromuro bencílico **142**, 160 μL (1.511 mmol) de o-cresol (**56**) y 740 mg (2.267 mmol) de Cs_2CO_3 se le añadió bajo atmósfera de nitrógeno 6.0 mL de DMF seca. La suspensión resultante se mantuvo a temperatura ambiente durante 6 h. Transcurrido este tiempo, la mezcla de reacción se vertió sobre agua y se extrajo con acetato de etilo. Las fases orgánicas se lavaron con disolución saturada de NaCl, se secaron sobre Na_2SO_4 anhidro y se filtraron. El residuo obtenido después de eliminar el disolvente se purificó por cromatografía de columna con hexano-éter etílico (9:1) para obtener 343.1 mg del análogo **KMa-Br** (82%) como un semisólido amarillo. Este producto ha sido previamente descrito (CAS 5422-50-4). Las propiedades espectroscópicas del producto obtenido coinciden con las anteriormente descritas (Rossi *et al.*, 1999).



Ácido 2-(o-toliloximetil)benzoico (KMa-Ac). A un matraz que contenía 10.5 mL de metanol seco y 400 mg (17.265 mmol) de Na (prelavado con metanol) se le añadió 1.7 mL (17.265 mmol) de o-cresol (**56**). Después de

eliminar el exceso de metanol por destilación a presión reducida se obtuvo el cresolato sódico (sólido blanco). A continuación se añadió, bajo atmósfera de nitrógeno, 1.545 g (11.520 mmol) de ftalida (**55**) y la mezcla de reacción se mantuvo a 155 °C durante 8 h. Transcurrido este tiempo el residuo marrón obtenido se diluyó en agua y se acidificó con HCl 4N hasta pH 1. Finalmente el producto resultante se filtró a vacío obteniéndose 2.488 g del análogo **KMa–Ac** (89%) como un sólido blanco. Este producto ha sido previamente descrito (CAS 108475–90–7). Las propiedades físicas y espectroscópicas del producto obtenido coinciden con las anteriormente descritas (Naveena *et al.*, 2010), a excepción del ^{13}C –RMN y el EM, cuyas asignaciones hasta la fecha no han sido especificadas.

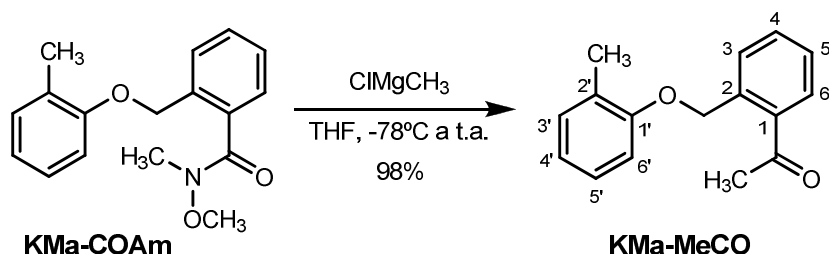
Datos espectroscópicos ^{13}C –RMN (75 MHz) δ 172.07 (CO₂H), 156.65 (C–1'), 141.17 (C–2), 135.70 (C–4), 131.68 (C–6), 130.72 (C–3'), 127.20 (C–5), 127.08 (C–3), 126.89 (C–1), 126.87 (C–5'), 126.15 (C–2'), 120.66 (C–4'), 111.58 (C–6'), 67.99 (OCH₂), 16.51 (CH₃); **EM** (IE) *m/z* (%) 242 (M⁺, 21), 224 (10), 209 (1), 195 (4), 181 (5), 165 (3), 152 (2), 136 (33), 135 (99), 133 (16), 109 (28), 108 (100), 107 (36), 105 (11), 90 (17), 79 (21), 77 (30), 63 (1); **EMAR** *m/z* calculada para C₁₅H₁₄O₃ 242.0943, encontrada 242.0946.



N-Metoxi-N-metil-2-((o-toliloxi)metil)benzamida (KMa–COAm). 506.0 mg (2.090 mmol) del análogo **KMa–Ac** y 0.8 mL (10.450 mmol) de SOCl₂ disueltos en 7.7 mL de benceno seco se refluieron durante 4 h bajo atmósfera de nitrógeno. Pasado el tiempo, se eliminó a vacío el exceso de benceno y SOCl₂. El cloruro de ácido formado se añadió, bajo atmósfera inerte y disuelto en CH₂Cl₂ seco (5 mL), sobre una suspensión de 244 mg (2.508 mmol) de MeO(Me)NH·HCl, 700 μL (5.016 mmol) de Et₃N y 5 mL de CH₂Cl₂ seco. La mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante toda la noche (16 h). Después de este tiempo, la mezcla de reacción se vertió sobre agua y

se extrajo con diclorometano. Las fases orgánicas reunidas se lavaron con disolución saturada de NaCl, se secaron sobre Na₂SO₄ anhidro y se filtraron. El residuo resultante después de eliminar el disolvente a vacío se purificó por cromatografía en columna, usando como eluyente hexano–acetato de etilo (8:2), obteniéndose 468.6 mg del análogo **KMa–COAm** (82%) como un aceite amarillo.

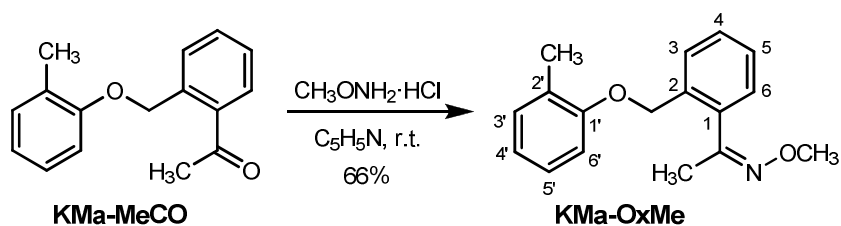
Datos espectroscópicos: IR (NaCl) ν_{\max} (cm⁻¹) 3022d, 2967d, 2933f, 2814d, 1649f, 1601f, 1494f, 1461f, 1379f, 1309d, 1241f, 1191m, 1122f, 1052m, 986m, 751f; ¹H–RMN (300 MHz) δ 7.60 (1H, ddd, $J = 7.7, 1.2, 0.7$ Hz, H–6), 7.47–7.32 (3H, m, H–5, H–3 y H–4), 7.16–7.10 (2H, m, H–3' y H–5'), 6.91–6.84 (2H, m, H–4' y H–6'), 5.16 (2H, s, OCH₂), 3.51 (3H, sa, OCH₃), 3.29 (3H, s, NCH₃), 2.27 (3H, s, CH₃); ¹³C–RMN (75 MHz) δ 164.64 (CO), 156.72 (C–1'), 135.12 (C–2), 133.70 (C–1), 130.70 (C–3'), 129.75 (C–5), 128.06 (C–6), 127.46 (C–3), 127.02 (C–4), 126.89 (C–5'), 126.84 (C–2'), 120.65 (C–4'), 111.45 (C–6'), 67.48 (OCH₂), 61.12 (OCH₃), 30.90 (NCH₃), 16.36 (CH₃); EMAR (ES) m/z calculada para C₁₇H₁₉NNaO₃ [M+Na]⁺ 308.1263, encontrada 308.1260.



1-(2-((o-Toliloxi)metil)fenil)etanona (KMa–MeCO). A una disolución de 389.0 mg (1.365 mmol) del análogo **KMa–COAm** en 8.3 mL de THF seco, previamente enfriada a –78 °C, se añadieron 2.3 mL (6.825 mmol) de una disolución 3 M de CHMgCH₃ en THF bajo atmósfera de nitrógeno. Tras completar la adición, la reacción se agitó a temperatura ambiente durante toda la noche (15 h). Pasado este tiempo, la mezcla de reacción se enfrió a 0 °C, se le añadieron 30 mL de HCl 1 M y posteriormente se extrajo con acetato de etilo. Las fases orgánicas reunidas se lavaron con disolución saturada de NaCl, se secaron sobre Na₂SO₄ anhidro y se filtraron. Después de eliminar el disolvente

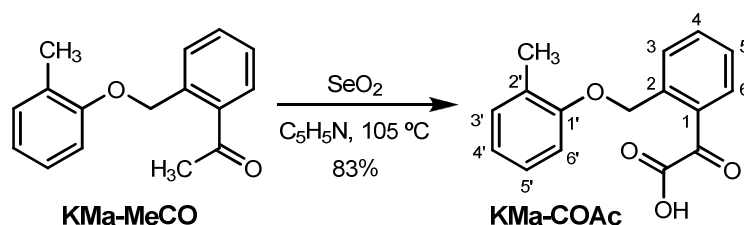
a vacío, el residuo obtenido fue purificado por cromatografía de columna, empleando hexano–acetato de etilo (8:2), obteniéndose 322.2 mg del análogo **KMa–MeCO** (98%) como un aceite amarillo.

Datos espectroscópicos: IR (NaCl) ν_{\max} (cm^{-1}) 3065d, 2922f, 1680f, 1596m, 1494f, 1437m, 1359m, 1293m, 1246f, 1192m, 1124m, 1027m, 955m, 755f; $^1\text{H-RMN}$ (300 MHz) δ 8.24 (1H, dd, $J = 7.8, 0.8$ Hz, H–6), 8.20 (1H, dd, $J = 7.8, 1.3$ Hz, H–3), 7.91 (1H, dt, $J = 7.8, 7.8, 1.3$ Hz, H–5), 7.75 (1H, dt, $J = 7.8, 7.8, 0.8$ Hz, H–4), 7.61–7.48 (2H, m, H–3' y H–5'), 7.28–7.20 (2H, m, H–4' y H–6'), 5.79 (2H, s, OCH_2), 2.98 (3H, s, COCH_3), 2.70 (3H, s, CH_3); $^{13}\text{C-RMN}$ (75 MHz) δ 200.73 (CO), 156.61 (C–1'), 139.49 (C–1), 135.05 (C–2), 132.38 (C–5), 130.57 (C–3'), 129.91 (C–3), 127.18 (C–6), 126.93 (C–4), 126.65 (C–5' y C–2'), 120.43 (C–4'), 111.42 (C–6'), 68.09 (OCH_2), 28.72 (COCH_3), 16.93 (CH_3); **EMAR** (ES) m/z calculada para $\text{C}_{16}\text{H}_{16}\text{NaO}_2$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 263.1048, encontrada 263.1053.



(Z)-1-(2-((o-Toliloxi)metil)fenil)etanona o-metil oxima (KMa–OxMe). Se disolvieron, bajo atmósfera de nitrógeno, 54.9 mg (0.229 mmol) del análogo **KMa–MeCO** y 76.4 mg (0.916 mmol) de clorhidrato de o-metilhidroxilamina en 1.5 mL de piridina seca. La suspensión resultante se agitó a temperatura ambiente durante 15 h. Transcurrido el tiempo, la mezcla de reacción se vertió sobre agua y se extrajo con acetato de etilo. Las fases orgánicas se lavaron con disolución saturada de NaCl, se secaron sobre Na_2SO_4 anhidro y se filtraron. El residuo resultante después de eliminar el disolvente a vacío se purificó por cromatografía de columna, con hexano–éter etílico (9:1) como eluyente, obteniéndose 40.6 mg del análogo **KMa–OxMe** (66%) como un aceite incoloro.

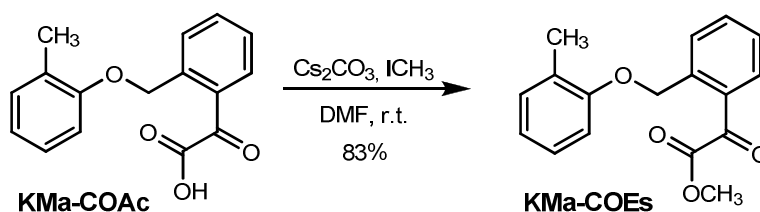
Datos espectroscópicos: IR (NaCl) ν_{\max} (cm^{-1}) 3060d, 2965m, 2870d, 1585m, 1490m, 1432m, 1377d, 1250m, 1121d, 1065f, 978m, 745f; $^1\text{H-RMN}$ (300 MHz) δ 7.64 (1H, dd, $J = 7.7, 1.5$ Hz, H-6), 7.43–7.32 (3H, m, H-5, H-3 y H-4), 7.17–7.11 (2H, m, H-3' y H-5'), 6.90 (1H, dt, $J = 8.0, 8.0, 1.0$ Hz, H-4'), 6.85 (1H, d, $J = 8.0$ Hz, H-6'), 5.23 (2H, s, OCH_2), 3.96 (3H, s, NOCH_3), 2.29 (3H, sa, CH_3), 2.23 (3H, s, CH_3); $^{13}\text{C-RMN}$ (75 MHz); 156.61 (C-1'), 155.21 (CN), 135.66 (C-2), 130.60 (C-3'), 128.90 (C-5), 128.82 (C-1), 128.39 (C-3), 127.46 (C-4), 127.38 (C-6), 126.89 (C-2'), 126.70 (C-5'), 120.51 (C-4'), 111.30 (C-6'), 68.05 (OCH_2), 63.83 (NOCH_3), 19.10 (CH_3), 16.36 (CH_3); EMAR (ES) m/z calculada para $\text{C}_{17}\text{H}_{19}\text{NNaO}_2$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 292.1314, encontrada 292.1314.



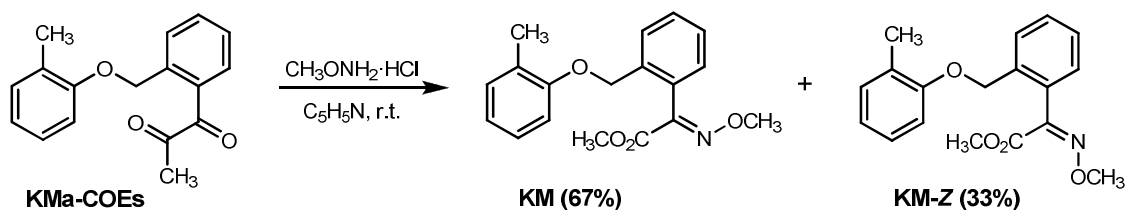
Ácido 2-oxo-2-(2-((*o*-toliloxi)metil)fenil)acético (KMa-COAc). A una disolución que contenía 130.1 mg (0.524 mmol) del análogo **KMa-MeCO** en 2 mL de piridina se le añadieron 90.1 mg (0.813 mmol) de SeO_2 . La suspensión se mantuvo con buena agitación a 105 °C durante 15 h. Transcurrido este tiempo, se dejó que la mezcla de reacción alcanzara temperatura ambiente y se filtró para eliminar el selenio. El filtrado se destiló a vacío (45°C, 60 mmHg) para eliminar la piridina. El residuo obtenido se disolvió en 100 mL de disolución 5% de NaOH y se extrajo con éter etílico. La fase acuosa se acidificó con HCl concentrado hasta pH 1 y se re-extrajo con acetato de etilo. Las fases orgánicas reunidas se lavaron con disolución saturada de NaCl, se secaron sobre Na_2SO_4 anhidro y se filtraron. Después de eliminar el disolvente a vacío se obtuvo 120.8 mg del análogo **KMa-COAc** (83%) como un sólido rosáceo.

Datos físicos y espectroscópicos: Pf. 60–62 °C (Hexano–Benceno); IR (KBr) ν_{\max} (cm^{-1}) 3060d, 3023m, 2909m, 1706f, 1685f, 1598m, 1573d, 1494m, 1433d, 1377d, 1246f, 1211m, 1125m, 1054m, 970m, 945f; $^1\text{H-RMN}$ (300 MHz) δ 8.12 (1H, dd, $J = 7.7, 1.4$ Hz, H-3), 7.73 (1H, dd, $J = 7.7, 0.8$ Hz, H-6), 7.68

(1H, dt, $J = 7.7, 7.7, 1.4$ Hz, H-5), 7.49 (1H, dt, $J = 7.7, 7.7, 0.8$ Hz, H-4), 7.17–7.10 (2H, m, H-3' y H-5'), 6.93–6.83 (2H, m, H-4' y H-6'), 5.68 (2H, s, OCH₂), 2.25 (3H, s, CH₃); ¹³C-RMN (75 MHz) δ 187.90 (CO), 163.60 (CO₂H), 156.20 (C-1'), 140.70 (C-1), 135.05 (C-2), 132.30 (C-5), 130.80 (C-3'), 130.50 (C-3), 127.50 (C-6), 127.40 (C-4), 127.00 (C-5'), 126.90 (C-2'), 121.00 (C-4'), 111.30 (C-6'), 68.02 (OCH₂), 16.40 (CH₃); **EMAR** (ES) m/z calculada para C₁₆H₁₄NaO₄ [M+Na]⁺ 293.0790, encontrada 293.0791.



2-Oxo-2-(2-((*o*-toliloxi)metil)fenil)acetato de metilo (KMa-COEs). A un matraz que contenía 105.5 mg (0.391 mmol) del análogo **KMa-COAc** y 152.9 mg (0.469 mmol) de Cs₂CO₃ se le añadió, bajo atmósfera de nitrógeno, 30 μ L (0.469 mmol) de ioduro de metilo y 1 mL de DMF seca. La mezcla de reacción se mantuvo a temperatura ambiente durante 1.5 h. El residuo resultante se vertió sobre agua y se extrajo con acetato de etilo. Las fases orgánicas reunidas se lavaron primero con NaHCO₃ saturado y posteriormente con salmuera, se secaron sobre Na₂SO₄ anhidro y se filtraron. El residuo obtenido después de eliminar el disolvente a vacío fue purificado por cromatografía en columna empleando hexano-éter etílico (de 9:1 a 8:2) como eluyente, obteniéndose 92.4 mg del análogo **KMa-COEs** (83%) como un sólido blanco. Este producto ha sido previamente descrito (CAS 143211-10-3). Las propiedades físicas y espectroscópicas del producto obtenido coinciden con las anteriormente descritas (Rossi *et al.*, 1999).

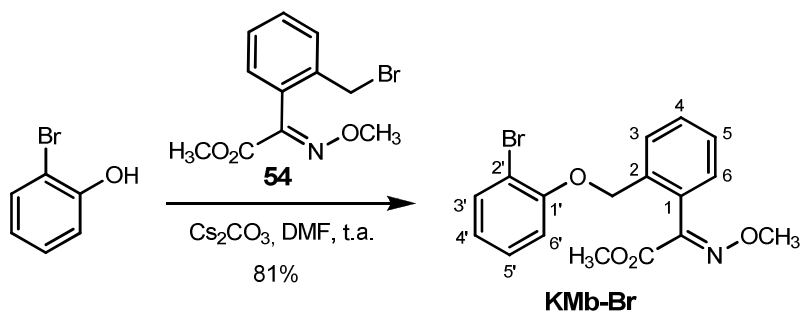


2-(Z)-(Metoxiimino)-2-(2-((o-toliloxi)metil)fenil)acetato de metilo (KM-Z).

Se disolvieron, bajo atmósfera de nitrógeno, 72.8 mg (0.256 mmol) del análogo **KMa-COEs** y 85.5 mg (1.024 mmol) de clorhidrato de *o*-metilhidroxilamina en 1.5 mL de piridina seca. La suspensión resultante se agitó a temperatura ambiente durante toda la noche (19 h). Pasado este tiempo, la mezcla de reacción se vertió sobre agua y se extrajo con acetato de etilo. Las fases orgánicas se lavaron con disolución saturada de NaCl, se secaron sobre Na₂SO₄ anhidro y se filtraron. El residuo resultante después de eliminar el disolvente a vacío se purificó por cromatografía de columna, con hexano-éter etílico (de 9:1 a 8:2) como eluyente. El análogo **KM-Z** fue eluido en primer lugar como un aceite incoloro (26.5 mg, 33%), seguido de **KM** (53.7 mg, 67%) como un sólido blanco. Estos productos han sido previamente descrito (CAS 248582-68-5 para **KM-Z** y CAS 143390-89-0 para **KM**). Las propiedades físicas y espectroscópicas de ambos productos obtenidos coinciden con las anteriormente descritas (Rossi *et al.*, 1999).

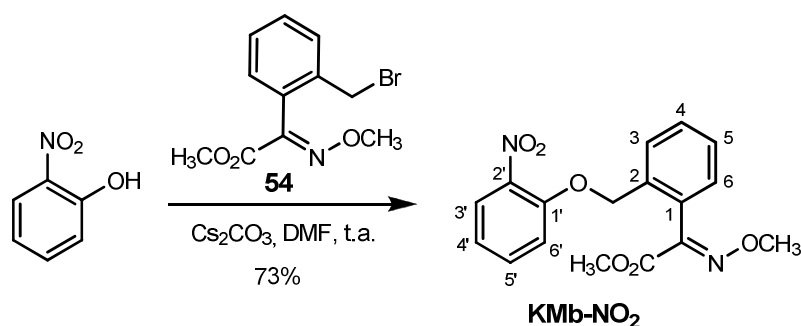
5.3.1.2. Síntesis de análogos del grupo II

Procedimiento general: se disolvieron, bajo atmósfera de nitrógeno, el fenol correspondiente (1 equiv), el bromuro bencílico **54** (1 equiv) y Cs₂CO₃ (1.5 equiv) en DMF seca. La suspensión resultante se agitó a temperatura ambiente durante toda la noche. Transcurrido este tiempo, la mezcla de reacción se vertió sobre agua y se extrajo con acetato de etilo. Las fases orgánicas reunidas se lavaron con disolución saturada de NaCl, se secaron sobre Na₂SO₄ anhidro y se filtraron. El residuo resultante después de eliminar el disolvente, se purificó por cromatografía de columna para obtener el análogo correspondiente.



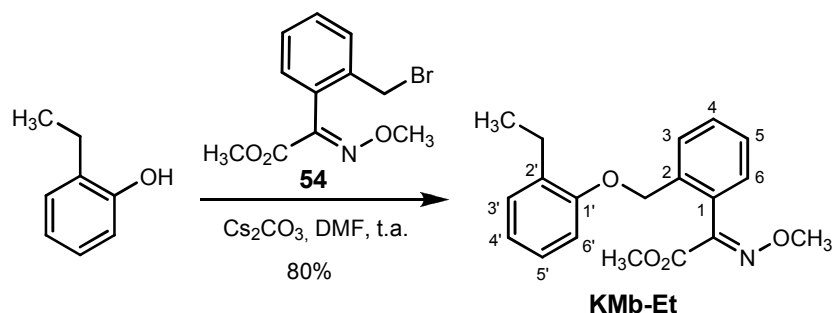
2-(2-((2-Bromofenoxi)metil)fenil)-2-(E)-(metoxiimino)acetato de metilo (KMb-Br). La purificación por cromatografía de columna, usando hexano-éter etílico (de 9:1 a 8:2) como eluyente, del crudo de reacción obtenido a partir de 15.0 μL (0.142 mmol) de 2-bromofenol, 40.6 mg (0.142 mmol) de bromuro bencílico **54**, 69.0 mg (0.213 mmol) de Cs_2CO_3 y 1.0 mL de DMF seca proporcionó 43.5 mg de del análogo **KMb-Br** (81%) como un sólido blanco.

Datos físicos y espectroscópicos: Pf. 95–97 °C (Hexano–Benceno); IR (KBr) ν_{max} (cm^{-1}) 2951d, 2847d, 1736m, 1716f, 1591d, 1579d, 1483m, 1444m, 1279m, 1223m, 1070f, 1030f, 944m, 744f; $^1\text{H-RMN}$ (300 MHz) δ 7.65 (1H, dd, $J = 7.7, 1.2$ Hz, H-6), 7.54 (1H, dd, $J = 7.8, 1.6$ Hz, H-3'), 7.45 (1H, dt, $J = 7.7, 7.6, 1.4$ Hz, H-5), 7.38 (1H, dt, $J = 7.6, 7.4, 1.2$ Hz, H-4), 7.22–7.15 (2H, m, H-3 y H-5'), 6.85–6.80 (2H, m, H-6' y H-4'), 5.08 (2H, s, OCH_2), 4.04 (3H, s, NOCH_3), 3.86 (3H, s, CO_2CH_3); $^{13}\text{C-RMN}$ (75 MHz) δ 163.21 (CO_2CH_3), 154.71 (C-1'), 149.17 (CN), 134.88 (C-2), 133.42 (C-3'), 129.71 (C-5), 128.83 (C-3 y C-1), 128.35 (C-5'), 127.71 (C-4), 127.46 (C-6), 122.18 (C-4'), 113.65 (C-6'), 112.27 (C-2'), 68.83 (OCH_2), 65.85 (NOCH_3), 53.07 (CO_2CH_3); EMAR (ES) m/z calculada para $\text{C}_{17}\text{H}_{17}^{79}\text{BrNO}_4$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 378.0341, encontrada 378.0342.



2-(E)-(Metoxiimino)-2-(2-((2-nitrofenoxi)metil)fenil) acetato de metilo (TFb-NO₂). La purificación por cromatografía en columna, usando hexano-acetato de etilo (de 9:1 a 8:2) como eluyente, del crudo de reacción obtenido a partir de 29.5 (0.212 mmol) de 2-nitrofenol, 60.6 mg (0.212 mmol) de bromuro bencílico **54**, 104.0 mg (0.318 mmol) de Cs_2CO_3 y 1.5 mL de DMF seca proporcionó 53.0 mg de del análogo **KMb-NO₂** (73%) como un sólido blanco.

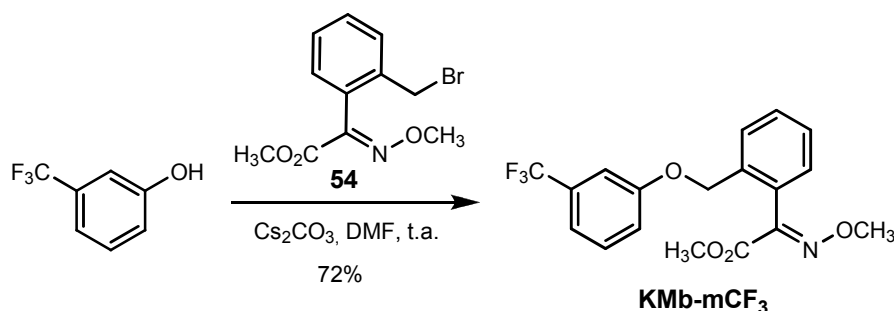
Datos físicos y espectroscópicos: Pf. 109–111 °C (Hexano–Benceno); IR (KBr) ν_{\max} (cm^{-1}) 2947m, 2858d, 1735f, 1719f, 1610f, 1583f, 1529f, 1489f, 1351f, 1237f, 1151m, 1070f, 1048f, 948f, 859f, 771f; $^1\text{H-RMN}$ (300 MHz) δ 7.85 (1H, dd, $J = 7.8, 1.5$ Hz, H–3'), 7.63 (1H, dd, $J = 7.7, 1.0$ Hz, H–6), 7.49–7.37 (3H, m, H–5, H–5' y H–4), 7.20 (1H, dd, $J = 7.5, 1.5$ Hz, H–3), 7.05–7.00 (2H, m, H–4' y H–6'), 5.10 (2H, s, OCH_2), 4.04 (3H, s, NOCH_3), 3.87 (3H, s, CO_2CH_3); $^{13}\text{C-RMN}$ (75 MHz) δ 163.19 (CO_2CH_3), 151.65 (C–1'), 149.06 (CN), 133.99 (C–3' y C–2'), 133.93 (C–2), 129.87 (C–5), 128.79 (C–1), 128.44 (C–3), 128.00 (C–4), 127.44 (C–6), 125.73 (C–5'), 120.68 (C–4'), 114.94 (C–6'), 69.27 (OCH_2), 63.89 (NOCH_3), 53.13 (CO_2CH_3); EMAR (ES) m/z calculada para $\text{C}_{17}\text{H}_{17}\text{N}_2\text{O}_6$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 345.1086, encontrada 345.1082.



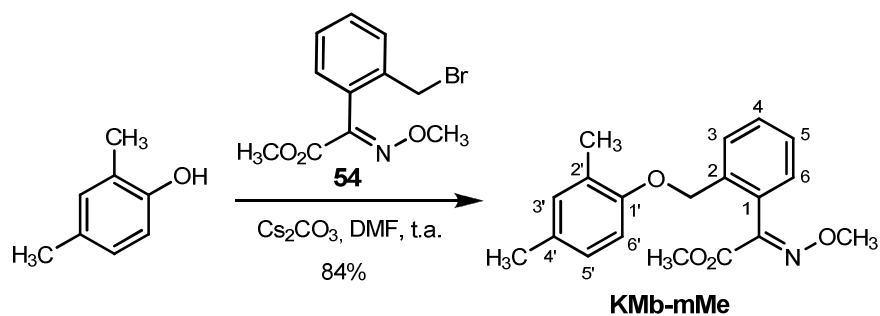
2-(2-((2-Etilfenoxi)metil)fenil)-2-(E)-(metoxiimino) acetato de metilo (KMb–Et). La purificación cromatográfica, usando hexano–éter etílico (8:2) como eluyente, del crudo de reacción obtenido a partir de 20.0 μL (0.189 mmol) de 2–etilfenol, 54.0 mg (0.189 mmol) de bromuro bencílico **54**, 92.0 mg (0.284 mmol) de Cs_2CO_3 y 1.0 mL de DMF seca proporcionó 49.4 mg de del análogo **KMb–Et** (80%) como un sólido blanco.

Datos físicos y espectroscópicos: Pf. 62–64 °C (Hexano–Benceno); IR (KBr) ν_{\max} (cm^{-1}) 3065d, 2966m, 2874d, 1739f, 1603d, 1585m, 1492m, 1435m, 1377d, 1299m, 1249m, 1221m, 1121d, 1066f, 1007m, 978m, 746f; $^1\text{H-RMN}$ (300 MHz) δ 7.59 (1H, dd, $J = 7.7, 1.4$ Hz, H–6), 7.45 (1H, dt, $J = 7.7, 7.8, 1.5$ Hz, H–5), 7.35 (1H, dt, $J = 7.7, 7.7, 1.4$ Hz, H–4), 7.20 (1H, dd, $J = 7.7, 1.5$ Hz, H–3), 7.16 (1H, dd, $J = 8.2, 1.5$ Hz, H–3'), 7.10 (1H, dt, $J = 8.2, 8.2, 1.5$ Hz, H–5'), 6.89 (1H, dt, $J = 8.2, 8.2, 1.5$ Hz, H–4'), 6.79 (1H, d, $J = 8.2$ Hz, H–6'), 4.95 (2H, s, OCH_2), 4.04 (3H, s, NOCH_3), 3.83 (3H, s, CO_2CH_3), 2.68 (2H, c,

$J = 8.0$ Hz, CH₂), 1.21 (3H, t, $J = 8.0$ Hz, CH₃); ¹³C-RMN (75 MHz) δ 163.25 (CO₂CH₃), 156.20 (C-1'), 149.27 (CN), 135.81 (C-2), 132.91 (C-2'), 129.63 (C-3'), 128.93 (C-5), 128.82 (C-1), 128.37 (C-3), 127.46 (C-4), 127.39 (C-6), 126.67 (C-5'), 120.83 (C-4'), 111.46 (C-6'), 67.95 (OCH₂), 63.83 (NOCH₃), 52.97 (CO₂CH₃), 23.08 (CH₂), 14.13 (CH₃); EMAR (ES) m/z calculada para C₁₉H₂₁NNaO₄ [M+Na]⁺ 350.1368, encontrada 350.1368.



2-(E)-(Metoxiimino)-2-(2-((3-(trifluorometil)fenoxi)metil)fenil)acetato de metilo (KMb-mCF₃). La purificación cromatográfica, usando hexano-éter etílico (de 9:1 a 8:2) como eluyente, del crudo de reacción obtenido a partir de 19.0 μ L (0.158 mmol) de 3-trifluorometilfenol, 45.2 mg (0.158 mmol) de bromuro bencílico **54**, 77.0 mg (0.237 mmol) de Cs₂CO₃ y 1.0 mL de DMF seca proporcionó 41.7 mg de del análogo **KMb-mCF₃** (72%) como un sólido blanco. Este producto ha sido previamente descrito (CAS 248582-69-6). Las propiedades físicas y espectroscópicas del producto obtenido coinciden con las anteriormente descritas (Rossi *et al.*, 1999).



2-(2-((2,4-Dimetilfenoxi)metil)fenil)-2-(E)-(metoxiimino) acetato de metilo (KMb-mMe). La purificación por cromatografía en columna, usando hexano-acetato de etilo (9:1) como eluyente, del crudo de reacción obtenido a partir de 19.0 μ L (0.163 mmol) de 2,4-dimetilfenol, 46.7 mg (0.163 mmol) de

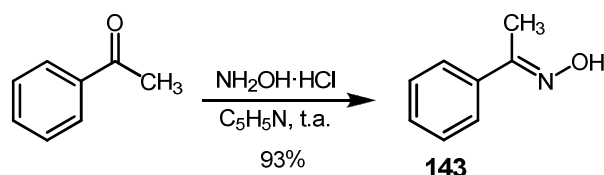
bromuro bencílico **54**, 80.0 mg (0.245 mmol) de CS_2CO_3 y 1.0 mL de DMF seca proporcionó 44.6 mg de del análogo **KMb-mMe** (84%) como un sólido blanco.

Datos físicos y espectroscópicos: Pf. 92–93 °C (Hexano–Benceno); IR (KBr) ν_{max} (cm^{-1}) 2949f, 2817d, 1727f, 1608d, 1590d, 1503f, 1437f, 1379m, 1305f, 1252f, 1220f, 1133f, 1068f, 1045f, 957f, 802m, 759m; **^1H -RMN** (300 MHz) δ 7.57 (1H, dd, $J = 7.7, 1.2$ Hz, H–6), 7.43 (1H, dt, $J = 7.7, 7.6, 1.5$ Hz, H–5), 7.37 (1H, dt, $J = 7.6, 7.5, 1.2$ Hz, H–4), 7.19 (1H, dd, $J = 7.5, 1.5$ Hz, H–3), 6.96 (1H, s, H–3'), 6.87 (1H, dd, $J = 7.5, 1.5$ Hz, H–5'), 6.66 (1H, d, $J = 7.5$ Hz, H–6'), 4.92 (2H, s, OCH_2), 4.05 (3H, s, NOCH_3), 3.82 (3H, s, CO_2CH_3), 2.24 (3H, s, CH_3), 2.22 (3H, s, CH_3); **^{13}C -RMN** (75 MHz) δ 163.25 (CO_2CH_3), 154.48 (C–1'), 149.36 (CN), 135.94 (C–2), 131.54 (C–3'), 129.82 (C–4'), 129.57 (C–5), 128.94 (C–1), 128.44 (C–3), 127.51 (C–4), 127.45 (C–6), 126.83 (C–5'), 126.72 (C–2'), 111.29 (C–6'), 68.21 (OCH_2), 63.79 (NOCH_3), 53.93 (CO_2CH_3), 20.41 (CH_3), 16.15 (CH_3); **EMAR** (ES) m/z calculada para $\text{C}_{19}\text{H}_{21}\text{NNaO}_4$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 350.1368, encontrada 350.1370.

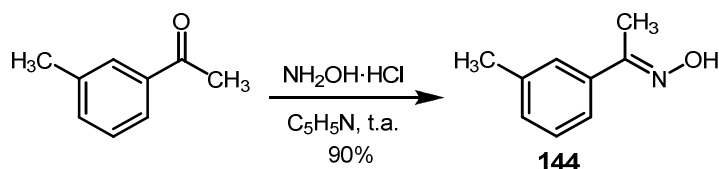
5.3.2. Síntesis de análogos de trifloxystrobin

5.3.2.1. Preparación de oximas

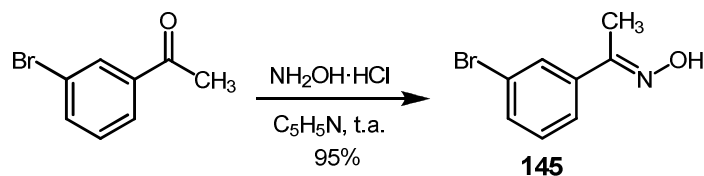
Procedimiento general: a un matraz que contenía la cetona apropiada (1 equiv) y $\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$ (4 equiv) se le añadió, bajo atmósfera de nitrógeno, piridina seca. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante toda la noche, tiempo después del cuál se vertió sobre agua y se extrajo con acetato de etilo. Las fases orgánicas reunidas se lavaron con disolución saturada de NaCl , se secaron sobre Na_2SO_4 anhidro y se filtraron. El residuo obtenido después de eliminar el disolvente se purificó mediante cromatografía de columna, utilizando como eluyente hexano–éter etílico (9:1), para obtener la correspondiente oxima.



(E)-Acetofenona oxima (143). La purificación cromatográfica del crudo de reacción obtenido a partir de 181.4 mg (1.510 mmol) de acetofenona, 420 mg (6.240 mmol) de $\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$ y 6 mL de piridina proporcionó 190.1 mg de la oxima **143** (93%) como un sólido blanco. Este producto ha sido previamente descrito (CAS 10341–75–0). Las propiedades físicas y espectroscópicas del producto obtenido coinciden con las anteriormente descritas (Ngwerume y Camp, 2010).

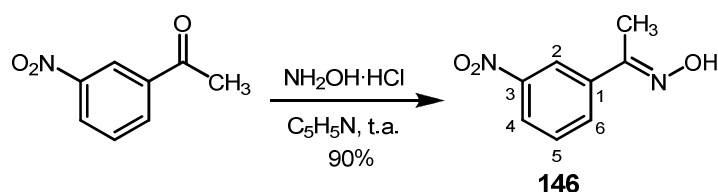


(E)-1-(*m*-Tolil)etanona oxima (144). La purificación por cromatografía de columna del crudo de reacción obtenido a partir de 262.1 mg (1.953 mmol) de 3-metilacetofenona, 543 mg (6.812 mmol) de $\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$ y 6 mL de piridina proporcionó 262.9 mg de la oxima **144** (90%) como un sólido blanco. Este producto ha sido previamente descrito (CAS 23040–54–2). Las propiedades físicas y espectroscópicas del producto obtenido coinciden con las anteriormente descritas (Neufeldt y Sanford, 2010).



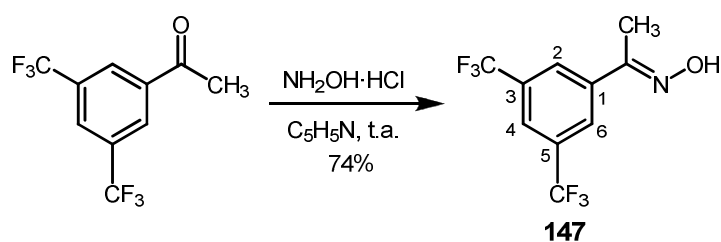
(E)-1-(3-Bromofenil)etanona oxima (145). La purificación cromatográfica del crudo de reacción obtenido a partir de 56.2 mg (0.282 mmol) de 3-bromoacetofenona, 78 mg (0.738 mmol) de $\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$ y 1.1 mL de piridina proporcionó 57.7 mg de la oxima **145** (95%) como un sólido blanco. Este producto ha sido previamente descrito (CAS 24280–05–5). Las propiedades

físicas y espectroscópicas del producto obtenido coinciden con las anteriormente descritas (Neufeldt y Sanford, 2010).



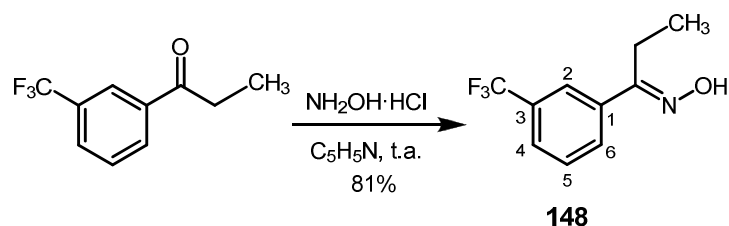
(E)-1-(3-Nitrofenil)etanona oxima (146). La purificación cromatográfica del crudo de reacción obtenido a partir de 103 mg (0.624 mmol) de 3-nitroacetofenona, 173.4 mg (2.496 mmol) de $\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$ y 2.5 mL de piridina proporcionó 101.1 mg de la oxima **146** (90%) como un sólido blanco.

Datos físicos y espectroscópicos: Pf. 132–134 °C (Hexano); IR (KBr) ν_{max} (cm^{-1}) 3237m, 3071d, 1526f, 1476d, 1352f, 1263d, 1016m, 947m, 908d, 793d, 737m, 679d; $^1\text{H-RMN}$ (300 MHz) δ 8.50 (1H, t, $J = 1.9$ Hz, H-2), 8.23 (1H, ddd, $J = 8.0, 1.9, 1.0$ Hz, H-4), 8.00 (1H, ddd, $J = 8.0, 1.9, 1.0$ Hz, H-6), 7.75 (1H, s, OH), 7.56 (1H, t, $J = 8.0$ Hz, H-5), 2.33 (3H, s, CH_3); $^{13}\text{C-RMN}$ (75 MHz) δ 154.09 (CN), 150.17 (C-3), 138.20 (C-1), 131.70 (C-6), 129.40 (C-5), 123.79 (C-4), 121.03 (C-2), 11.76 (CH_3); EMAR (ES) m/z calculada para $\text{C}_8\text{H}_9\text{N}_2\text{O}_3$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 181.0613, encontrada 181.0618.



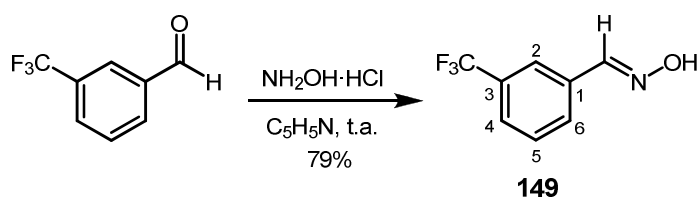
(E)-1-(3,5-bis(Trifluorometil)fenil)etanona oxima (147). La purificación cromatográfica del crudo de reacción obtenido a partir de 65 mg (0.260 mmol) de 3,5-bis(trifluorometil)acetofenona, 72 mg (1.040 mmol) de $\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$ y 1.0 mL de piridina proporcionó 51.0 mg de la oxima **147** (74%) como un sólido blanco.

Datos físicos y espectroscópicos: Pf. 104–106 °C (Hexano); **IR** (KBr) ν_{\max} (cm^{-1}) 3355m, 3109d, 2978d, 1384m, 1284f, 1185f, 1130f, 1009d, 896m, 841d, 682m; **^1H -RMN** (300 MHz) δ 8.32 (1H, s, H-2), 8.08 (1H, s, H-6), 7.88 (1H, s, H-4), 2.34 (3H, s, CH_3); **^{13}C -RMN** (75 MHz) δ 153.79 (CN), 138.51 (C-1), 131.98 (C-3 y C-5, c, $J = 33.4$ Hz), 126.05 (C-2 y C-6), 123.71 (2CF_3 , c, $J = 272.7$ Hz), 122.65 (C-4), 11.81 (CH_3); **EMAR** (ES) m/z calculada para $\text{C}_{10}\text{H}_8\text{F}_6\text{NO}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 272.0510, encontrada 272.0513.



(E)-1-(3-(Trifluorometil)fenil)propan-1-ona oxima (148). La purificación por cromatografía en columna del crudo de reacción obtenido a partir de 65 mg (0.321 mmol) de cetona, 89 mg (1.248 mmol) de $\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$ y 1.2 mL de piridina proporcionó 56.3 mg de la oxima **148** (81%) como un sólido blanco.

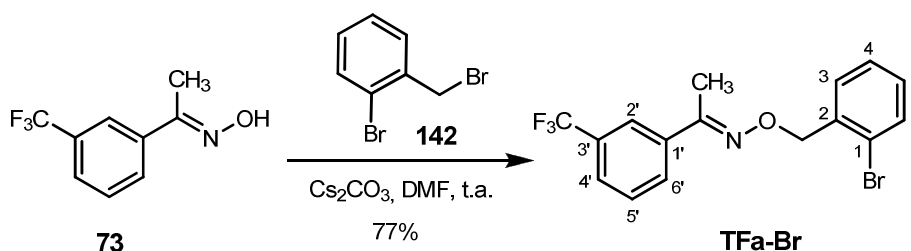
Datos físicos y espectroscópicos: Pf. 59–61 °C (Hexano); **IR** (KBr) ν_{\max} (cm^{-1}) 3251m, 3082m, 2956m, 1465m, 1416d, 1345f, 1328f, 1296m, 1275f, 1177f, 1166f, 1074f, 936m, 800f, 735m, 691f; **^1H -RMN** (300 MHz) δ 8.34 (1H, s, OH), 7.88 (1H, s, H-2), 7.80 (1H, d, $J = 7.8$ Hz, H-6), 7.64 (1H, d, $J = 7.8$ Hz, H-4), 7.52 (1H, t, $J = 7.8$ Hz, H-5), 2.84 (2H, c, $J = 7.6$ Hz, CH_2), 1.18 (3H, t, $J = 7.6$ Hz, CH_3); **^{13}C -RMN** (75 MHz) δ 159.81 (CN), 136.33 (C-1), 129.82 (C-3, c, $J = 32.5$ Hz), 129.46 (C-6), 129.03 (C-5), 125.76 (C-4, c, $J = 3.8$ Hz), 123.50 (CF_3 , c, $J = 272.2$ Hz), 123.05 (C-2, c, $J = 3.8$ Hz), 19.32 (CH_2), 10.80 (CH_3); **EMAR** (ES) m/z calculada para $\text{C}_{10}\text{H}_{11}\text{F}_3\text{NO}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 218.0793, encontrada 218.0791.



(E)-3-(Trifluorometil)benzaldehído oxima (149). La purificación por cromatografía en columna del crudo de reacción obtenido a partir de 96.9 mg (0.556 mmol) de 3-trifluorometilbenzaldehído, 155 mg (2.224 mmol) de $\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$ y 2 mL de piridina proporcionó 82.7 mg de la oxima **149** (79%) como un aceite incoloro.

Datos espectroscópicos: IR (NaCl) ν_{max} (cm^{-1}) 3347f, 2983d, 1732d, 1656m, 1454m, 1333f, 1274m, 1170f, 1128f, 1066m, 973m, 804m; $^1\text{H-RMN}$ (300 MHz) δ 8.82 (1H, sa, OH), 8.20 (1H, s, CH), 7.84 (1H, s, H-2), 7.76 (1H, d, $J = 7.5$ Hz, H-6), 7.64 (1H, d, $J = 7.5$ Hz, H-4), 7.51 (1H, t, $J = 7.5$ Hz, H-5); $^{13}\text{C-RMN}$ (75 MHz) δ 149.14 (CN), 132.74 (C-1), 131.30 (C-3, c, $J = 32.3$ Hz), 130.10 (C-6), 129.17 (C-5), 126.53 (C-4, c, $J = 3.8$ Hz), 123.80 (CF_3 , c, $J = 272.5$ Hz), 123.75 (C-2, c, $J = 3.8$ Hz); **EMAR** (ES) m/z calculada para $\text{C}_8\text{H}_6\text{F}_3\text{NNaO}$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 212.0299, encontrada 212.0290.

5.3.2.2. Síntesis de análogos del grupo I

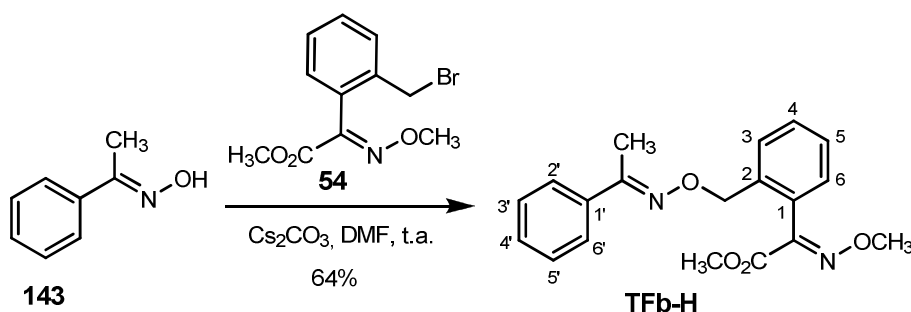


(E)-1-(3-(Trifluorometil)fenil)etanona o-2-bromobencil oxima (TFa-Br). A un matraz que contenía 226.8 mg (0.907 mmol) del bromuro bencílico **142**, 184 mg (0.907 mmol) de la oxima **73** y 443 mg (1.361 mmol) de Cs_2CO_3 se le añadió bajo atmósfera de nitrógeno 3.5 mL de DMF seca. La suspensión resultante se mantuvo a temperatura ambiente durante 3 h. Transcurrido este tiempo, la mezcla de reacción se vertió sobre agua y se extrajo con acetato de etilo. Las fases orgánicas se lavaron con disolución saturada de NaCl, se secaron sobre Na_2SO_4 anhidro y se filtraron. El residuo obtenido después de eliminar el disolvente se purificó por cromatografía de columna con hexano-éter etílico (9:1) para obtener el análogo **TFa-Br** como un aceite amarillo limón (373.4 mg, 77%).

Datos espectroscópicos: IR (NaCl) ν_{\max} (cm^{-1}) 3071d, 2929d, 2880d, 1623d, 1590d, 1569d, 1439f, 1370f, 1341f, 1275f, 1167f, 1124f, 1072f, 1025f, 944m, 890m, 801f, 747f, 696f, 670f; **$^1\text{H-RMN}$** (300 MHz) δ 7.94 (1H, s, H-2'), 7.85 (1H, d, $J = 7.8$ Hz, H-6'), 7.62 (1H, d, $J = 7.8$ Hz, H-4'), 7.59 (1H, dd, $J = 7.7, 1.1$ Hz, H-6), 7.48 (1H, t, $J = 7.8$ Hz, H-5'), 7.47 (1H, dd, $J = 7.6, 1.2$ Hz, H-3), 7.33 (1H, dt, $J = 7.6, 7.6, 1.1$ Hz, H-4), 7.18 (1H, dt, $J = 7.7, 7.6, 1.2$ Hz, H-5), 5.37 (2H, s, OCH_2), 2.34 (3H, s, CH_3); **$^{13}\text{C-RMN}$** (75 MHz) δ 153.99 (CN), 137.23 (C-2), 137.17 (C-1'), 132.66 (C-3), 130.79 (C-3', c, $J = 32.4$ Hz), 129.65 (C-6'), 129.24 (C-5'), 129.18 (C-6), 128.84 (C-5), 127.30 (C-4), 125.04 (C-4', c, $J = 3.9$ Hz), 123.95 (CF_3 , c, $J = 272.4$ Hz), 123.04 (C-1), 122.87 (C-2', c, $J = 3.9$ Hz), 75.70 (OCH_2), 1266 (CH_3); **EMAR** (ES) m/z calculada para $\text{C}_{16}\text{H}_{14}\text{BrF}_3\text{NO}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 372.0211, encontrada 372.0214.

5.3.2.3. Síntesis de análogos del grupo II y III

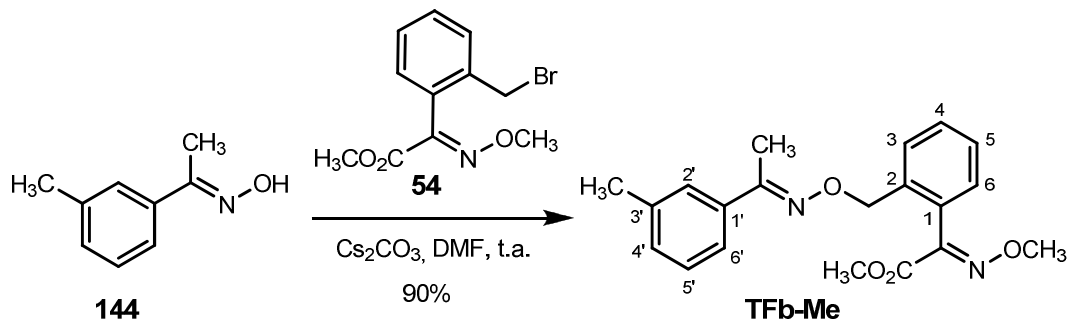
Procedimiento general: La oxima correspondiente (1 equiv), el bromuro bencílico **54** (1 equiv) y Cs_2CO_3 (1.5 equiv) se disolvieron en DMF seca bajo atmósfera de nitrógeno. La suspensión resultante se agitó a temperatura ambiente durante 5 h. Transcurrido este tiempo, la mezcla de reacción se vertió sobre agua y se extrajo con acetato de etilo. Las fases orgánicas se lavaron con disolución saturada de NaCl, se secaron sobre Na_2SO_4 anhidro y se filtraron. El residuo resultante después de eliminar el disolvente se purificó por cromatografía de columna para obtener el análogo correspondiente.



((E)-2-(Metoxiimino)-2-(2-(((E)-1-feniletilideno) amino) oxi) metil) fenil) acetato de metilo (TFb-H). La purificación cromatográfica, utilizando hexano-éter etílico (de 9:1 a 8:2) como eluyente, del crudo de reacción

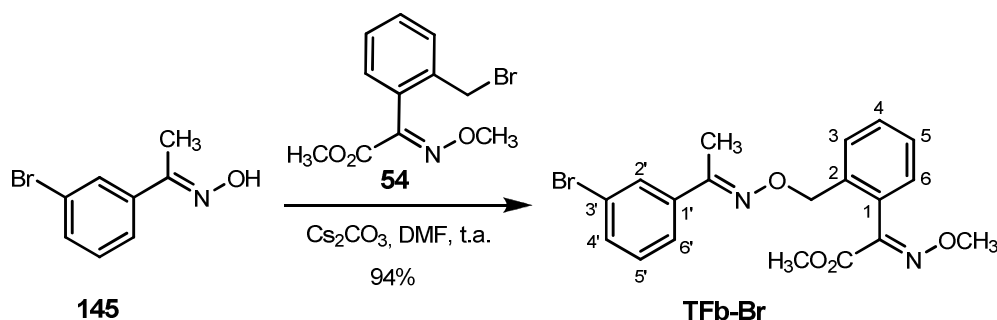
obtenido a partir de 22 mg (0.178 mmol) de la oxima **143**, 51 mg (0.178 mmol) del bromuro bencílico **54**, 87 mg (0.265 mmol) de CS_2CO_3 y 1.0 mL de DMF seca proporcionó 38.9 mg del análogo **TFb-H** (64%) como un sólido blanco.

Datos físicos y espectroscópicos: Pf. 82–83 °C (Hexano–Benceno); **IR** (KBr) ν_{max} (cm^{-1}) 3049d, 2940d, 1739f, 1612d, 1585m, 1492m, 1438f, 1368m, 1302f, 1226f, 1208m, 1115d, 1067f, 1034f, 1009f, 928f, 898f, 696m; **$^1\text{H-RMN}$** (300 MHz) δ 7.62–7.56 (2H, m, H–6' y H–2'), 7.50 (1H, dd, $J = 7.4, 1.3$ Hz, H–6), 7.46–7.31 (5H, m, H–4, H–5, H–4', H–5' y H3'), 7.19 (1H, dd, $J = 7.4, 1.3$ Hz, H–3), 5.12 (2H, s, OCH_2), 4.03 (3H, s, NOCH_3), 3.81 (3H, s, CO_2CH_3), 2.21 (3H, s, CH_3); **$^{13}\text{C-RMN}$** (75 MHz) δ 161.25 (CO_2CH_3), 152.39 (CH_3CN), 149.61 (CN), 136.48 (C–2), 136.28 (C–1'), 129.36 (C–4'), 128.75 (C–6), 128.50 (C–4), 128.33 (C–3' y C–5'), 128.21 (C–1), 127.60 (C–5), 126.13 (C–2' y c–6'), 124.05 (C–3), 74.68 (OCH_2), 63.77 (NOCH_3), 52.86 (CO_2CH_3), 12.73 (CH_3); **EMAR** (ES) m/z calculada para $\text{C}_{19}\text{H}_{20}\text{N}_2\text{NaO}_4$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 363.1321, encontrada 363.1321.



(E)-2-(Metoxiimino)-2-(2-(((E)-1-(*m*-tolil)etilideno) amino) oxi) metil) fenil) acetato de metilo (TFb-Me). La purificación por cromatografía en columna, utilizando hexano–éter etílico (de 8:2 a 7:3) como eluyente, del crudo de reacción obtenido a partir de 21 mg (0.157 mmol) de la oxima **144**, 45 mg (0.157 mmol) del bromuro bencílico **54**, 76 mg (0.235 mmol) de Cs_2CO_3 y 1.0 mL de DMF seca proporcionó 39.9 mg del análogo **TFb-Me** (90%) como un sólido blanco.

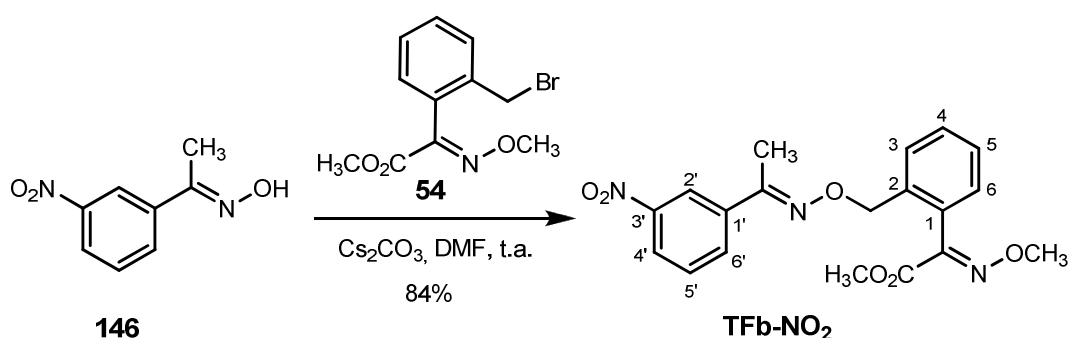
Datos físicos y espectroscópicos: Pf. 103–105 °C (Hexano–Benceno); **IR** (KBr) ν_{\max} (cm^{-1}) 2940d, 2922m, 1730f, 1589d, 1487d, 1436d, 1365m, 1315m, 1223m, 1067f, 1009f, 981f, 785f, 773f; **^1H -RMN** (300 MHz) δ 7.51 (1H, dd, $J = 7.5, 1.2$ Hz, H–6), 7.45–7.35 (4H, m, H–2', H–6', H–5 y H–4), 7.33 (1H, t, $J = 7.9$ Hz, H–5'), 7.19 (1H, dd, $J = 7.5, 1.2$ Hz, H–3), 7.15 (1H, d, $J = 7.9$ Hz, H–4'), 5.13 (2H, s, OCH_2), 4.03 (3H, s, NOCH_3), 3.82 (3H, s, CO_2CH_3), 2.36 (3H, s, CH_3), 2.20 (3H, s, CH_3); **^{13}C -RMN** (75 MHz) δ 163.31 (CO_2CH_3), 155.31 (CH_3CN), 149.61 (CN), 137.93 (C–3'), 136.44 (C–2), 136.26 (C–1'), 129.84 (C–4), 129.74 (C–1), 129.35 (C–4'), 128.69 (C–6), 128.47 (C–2'), 128.22 (C–5'), 127.58 (C–5), 126.71 (C–6'), 123.30 (C–3), 74.54 (OCH_2), 63.77 (NOCH_3), 52.86 (CO_2CH_3), 21.43 (CH_3), 12.86 (CH_3); **EMAR** (ES) m/z calculada para $\text{C}_{20}\text{H}_{23}\text{N}_2\text{O}_4$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ 355.1658, encontrada 355.1661.



2-(2-(((E)-1-(3-Bromofenil) etilideno) amino) oxi) metil) fenil)-2-(E)-(metoxiimino)acetato de metilo(TFb-Br). La purificación cromatográfica, utilizando hexano–éter etílico (8:2) como eluyente, del crudo de reacción obtenido a partir de 27.4 mg (0.128 mmol) de la oxima **145**, 44 mg (0.128 mmol) del bromuro bencílico **54**, 63 mg (0.192 mmol) de Cs_2CO_3 y 1.0 mL de DMF seca proporcionó 50.2 mg del análogo **TFb-Br** (94%) como un sólido blanco.

Datos físicos y espectroscópicos: Pf. 92–94 °C (Hexano–Benceno); **IR** (KBr) ν_{\max} (cm^{-1}) 2935d, 2875d, 1738f, 1587d, 1436m, 1299f, 1226m, 1070f, 1010f, 929f, 894d, 773m, 682d; **^1H -RMN** (300 MHz) δ 7.76 (1H, t, $J = 1.8$ Hz, H–2'), 7.52 (1H, d, $J = 7.8$ Hz, H–6'), 7.50–7.44 (2H, m, H–4' y H–6), 7.43 (1H, dt, $J = 7.5, 7.4, 1.5$ Hz, H–5), 7.38 (1H, dt, $J = 7.5, 7.4, 1.5$ Hz, H–4), 7.21 (1H, t, $J = 7.8$ Hz, H–5'), 7.19 (1H, dd, $J = 7.5, 1.5$ Hz, H–3), 5.13 (2H, s, OCH_2),

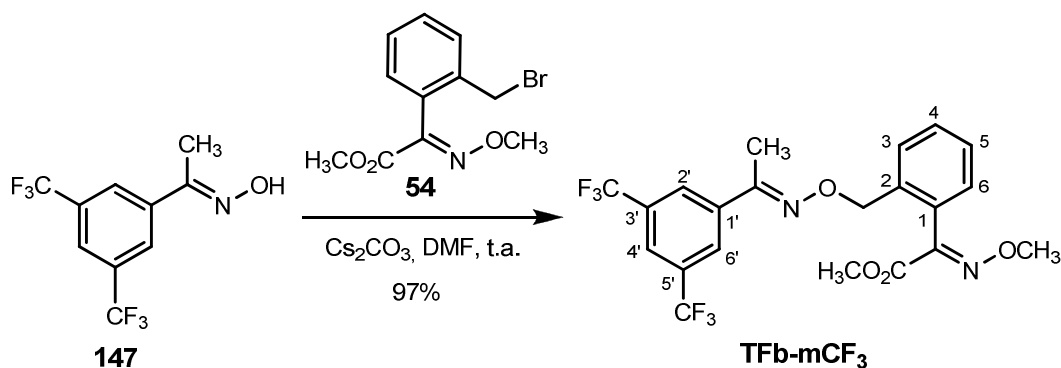
4.03 (3H, s, NOCH₃), 3.83 (3H, s, CO₂CH₃), 2.17 (3H, s, CH₃); ¹³C-RMN (75 MHz) δ 163.29 (CO₂CH₃), 153.66 (CH₃CN), 149.55 (CN), 138.45 (C-1'), 136.01 (C-2), 131.95 (C-4'), 129.82 (C-1 y C-6), 129.38 (C-5'), 129.06 (C-2'), 128.74 (C-5), 128.51 (C-3), 127.71 (C-4), 124.66 (C-6'), 122.54 (C-3'), 74.81 (OCH₂), 63.80 (NOCH₃), 52.90 (CO₂CH₃), 12.54 (CH₃); **EMAR** (ES) *m/z* calculada para C₁₉H₂₀⁷⁹BrN₂O₄ [M+H]⁺ 419.0606, encontrada 419.0621.



(*E*)-2-(Metoxiimino)-2-(2-(((*E*)-1-(3-nitrofenil)etilideno)amino)oxi)metil)fenil)acetato de metilo (TFb-NO₂). La purificación por cromatografía en columna, utilizando hexano-éter etílico (8:2) como eluyente, del crudo de reacción obtenido a partir de 24.0 mg (0.150 mmol) de la oxima **146, 43.0 mg (0.150 mmol) del bromuro bencílico **54**, 73.0 mg (0.225 mmol) de CS₂CO₃ y 1.0 mL de DMF seca proporcionó 35.0 mg del análogo **TFb-NO₂** (84%) como un sólido blanco.**

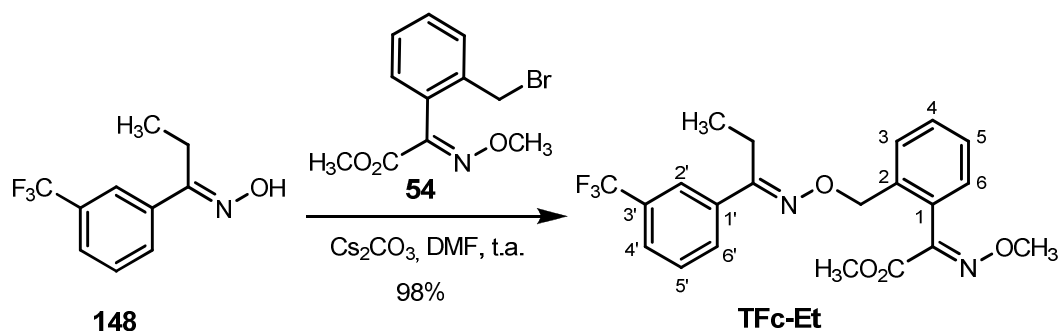
Datos físicos y espectroscópicos: Pf. 126–128 °C (Hexano–Benceno); **IR** (KBr) ν_{\max} (cm⁻¹) 2956d, 2934d, 2863d, 1733f, 1612d, 1530f, 1435m, 1350f, 1301m, 1222m, 1070f, 1003f, 916m, 774m, 737m, 681m; ¹H-RMN (300 MHz) δ 8.45 (1H, t, *J* = 2.0 Hz, H-2'), 8.18 (1H, ddd, *J* = 8.0, 2.0, 1.0 Hz, H-4'), 7.95 (1H, ddd, *J* = 8.0, 2.0, 1.0 Hz, H-6'), 7.51 (1H, t, *J* = 8.0 Hz, H-5'), 7.49 (1H, dd, *J* = 7.5, 1.5 Hz, H-6), 7.45 (1H, dt, *J* = 7.5, 7.4, 1.2 Hz, H-5), 7.39 (1H, dt, *J* = 7.5, 7.4, 1.5 Hz, H-4), 7.19 (1H, dd, *J* = 7.4, 1.2 Hz, H-3), 5.16 (2H, s, OCH₂), 4.04 (3H, s, NOCH₃), 3.83 (3H, s, CO₂CH₃), 2.25 (3H, s, CH₃); ¹³C-RMN (75 MHz) δ 163.29 (CO₂CH₃), 152.75 (CH₃CN), 149.51 (CN), 148.34 (C-3'), 138.08 (C-2), 135.76 (C-1'), 131.70 (C-6'), 129.85 (C-1), 129.42

(C-5'), 129.26 (C-6), 128.82 (C-5), 128.55 (C-3), 127.87 (C-4), 123.63 (C-4'), 120.96 (C-2'), 75.13 (OCH₂), 63.82 (NOCH₃), 52.92 (CO₂CH₃), 12.40 (CH₃); **EMAR** (ES) *m/z* calculada para C₁₉H₂₁N₃NaO₆ [M+Na]⁺ 408.1172, encontrada 408.1171.



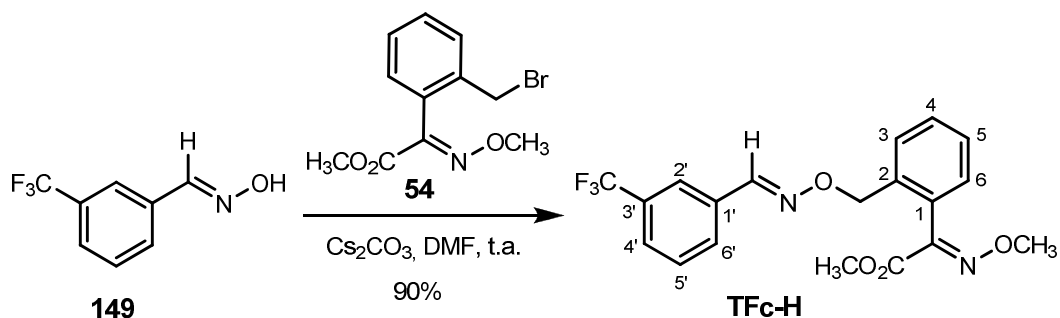
2-(2-(((E)-1-(3,5-bis(Trifluorometil)fenil)etilideno)amino)oxi)metil)fenil-(E)-2-(metoxiimino)acetato de metilo (TFb-mCF₃). La purificación del crudo de reacción, utilizando hexano-éter etílico (8:2) como eluyente, obtenido a partir de 27.8 mg (0.105 mmol) de la oxima **147**, 36.0 mg (0.105 mmol) del bromuro bencílico **54**, 51.0 mg (0.158 mmol) de Cs₂CO₃ y 1.0 mL de DMF seca proporcionó 48.2 mg del análogo **TFb-mCF₃** (97%) como un sólido blanco.

Datos físicos y espectroscópicos: Pf. 84–85 °C (Hexano–Benceno); **IR** (KBr) ν_{max} (cm⁻¹) 3011d, 2951d, 1723f, 1629d, 1590d, 1441d, 1390d, 1319d, 1280f, 1173f, 1128f, 1064m, 956m, 897m, 856d, 763d; **¹H-RMN** (300 MHz) δ 8.05 (2H, sa, H-2' y H-6'), 7.84 (1H, s, H-4'), 7.51–7.36 (3H, m, H-6, H-5 y H-4), 7.20 (1H, dd, *J* = 7.5, 1.5 Hz, H-3), 5.17 (2H, s, OCH₂), 4.04 (3H, s, NOCH₃), 3.84 (3H, s, CO₂CH₃), 2.24 (3H, s, CH₃); **¹³C-RMN** (75 MHz) δ 163.30 (CO₂CH₃), 152.22 (CH₃CM), 149.28 (CN), 138.45 (C-2), 135.61 (C-1'), 131.95 (C-3' y C-5', c, *J* = 33.0 Hz), 129.82 (C-1), 129.45 (C-6), 128.82 (C-5), 128.58 (C-3), 127.95 (C-4), 126.42 (C-2' y C-6'), 125.40 (C-4', c, *J* = 3.8 Hz), 123.75 (2CF₃, c, *J* = 272.1 Hz), 75.29 (OCH₂), 63.81 (NOCH₃), 52.90 (CO₂CH₃), 12.32 (CH₃); **EMAR** (ES) *m/z* calculada para C₂₁H₁₉F₆N₂O₄ [M+H]⁺ 477.1249, encontrada 477.1250.



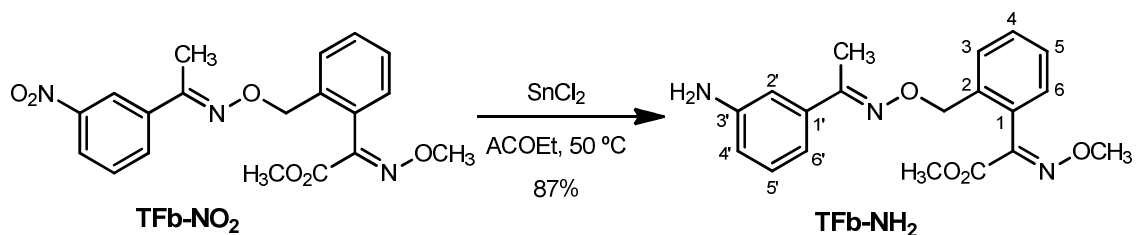
(E)-2-(Metoxiimino)-2-(2-(((E)-1-(3-(trifluorometil) fenil) propilideno) amino)oxi)metil)fenil)acetato de metilo (TFc-Et). La purificación por cromatografía en columna, utilizando hexano-éter etílico (85:15) como eluyente, del crudo de reacción obtenido a partir de 31.4 mg (0.145 mmol) de la oxima **148**, 50.0 mg (0.145 mmol) del bromuro bencílico **54**, 71.0 mg (0.218 mmol) de Cs_2CO_3 y 1.0 mL de DMF seca proporcionó 60.0 mg del análogo **TFc-Et** (98%) como un aceite marrón viscoso.

Datos espectroscópicos: IR (NaCl) ν_{max} (cm^{-1}) 2978d, 2934d, 1722m, 1630d, 1558d, 1432d, 1323m, 1295m, 1213m, 1170m, 1126f, 1071f, 1017f, 957d; $^1\text{H-RMN}$ (300 MHz) δ 7.86 (1H, s, H-2'), 7.77 (1H, d, $J = 7.5$ Hz, H-6'), 7.59 (1H, d, $J = 7.5$ Hz, H-4'), 7.51 (1H, dd, $J = 7.6, 1.2$ Hz, H-6), 7.47 (1H, t, $J = 7.5$ Hz, H-5'), 7.43 (1H, dt, $J = 7.6, 7.5, 1.5$ Hz, H-5), 7.38 (1H, dt, $J = 7.5, 7.5, 1.2$ Hz, H-4), 7.19 (1H, dd, $J = 7.5, 1.5$ Hz, H-3), 5.15 (2H, s, OCH_2), 4.04 (3H, s, NOCH_3), 3.82 (3H, s, CO_2CH_3), 2.74 (2H, c, $J = 7.6$ Hz, CH_2), 1.11 (3H, t, $J = 7.6$ Hz, CH_3); $^{13}\text{C-RMN}$ (75 MHz) δ 163.29 (CO_2CH_3), 158.64 (CH_2CN), 149.42 (CN), 136.20 (C-2), 136.01 (C-1'), 130.83 (C-3', c, $J = 32.5$ Hz), 129.68 (C-1), 129.50 (C-6'), 129.37 (C-6), 128.87 (C-5'), 128.70 (C-5), 128.46 (C-3), 127.70 (C-4), 125.50 (C-4', c, $J = 3.8$ Hz), 123.89 (CF_3 , c, $J = 272.2$ Hz), 123.03 (C-2', c, $J = 3.8$ Hz), 74.70 (OCH_2), 63.80 (NOCH_3), 52.89 (CO_2CH_3), 19.81 (CH_2), 10.97 (CH_3); **EMAR** (ES) m/z calculada para $\text{C}_{21}\text{H}_{21}\text{F}_3\text{N}_2\text{NaO}_4$ $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 445.1351, encontrada 445.1354.



(E)-2-(Metoxiimino)-2-(2-(((E)-3-(trifluorometil)benzilideno) amino) oxi) metil)fenil)acetato de metilo (TFc-H). La purificación cromatográfica, utilizando hexano–acetato de etilo (9:1) como eluyente, del crudo de reacción obtenido a partir de 29.2 mg (0.154 mmol) de la oxima **149**, 44.0 mg (0.154 mmol) del bromuro bencílico **54**, 75.0 mg (0.231 mmol) de Cs₂CO₃ y 1.0 mL de DMF seca proporcionó 54.6 mg del análogo **TFc-H** (90%) como un aceite amarillo.

Datos espectroscópicos: IR (NaCl) ν_{\max} (cm⁻¹) 3065d, 2943m, 2820d, 1728f, 1585d, 1437m, 1350m, 1322f, 1278m, 1219f, 1127f, 1079f, 1019f, 957m, 766m, 668m; ¹H-RMN (300 MHz) δ 8.06 (1H, s, CH), 7.81 (1H, s, H-2'), 7.71 (1H, d, $J = 7.8$ Hz, H-6'), 7.60 (1H, d, $J = 7.8$ Hz, H-4'), 7.51–7.35 (4H, m, H-6, H-5', H-5 y H-4), 7.19 (1H, dd, $J = 7.3, 1.5$ Hz, H-3), 5.12 (2H, s, OCH₂), 4.02 (3H, s, NOCH₃), 3.84 (3H, s, CO₂CH₃); ¹³C-RMN (75 MHz) δ 163.31 (CO₂CH₃), 149.60 (HCM), 147.70 (CN), 135.60 (C-2), 132.93 (C-1'), 130.22 (C-3', c, $J = 32.5$ Hz), 130.21 (C-6'), 130.20 (C-1), 129.43 (C-6), 129.13 (C-5'), 128.79 (C-5), 128.54 (C-3), 127.89 (C-4), 126.30 (C-4', c, $J = 3.8$ Hz), 123.70 (C-2', c, $J = 3.8$ Hz), 115.12 (CF₃, c, $J = 272.0$ Hz), 74.89 (OCH₂), 63.78 (NOCH₃), 52.90 (CO₂CH₃); **EMAR** (ES) m/z calculada para C₁₉H₁₈F₃N₂O₄ [M+H]⁺ 395.1219, encontrada 395.1222.



2-(2-(((E)-1-(3-Aminofenil) etilideno) amino) oxi) metil) fenil)-2-(E)-(metoxiimino)acetato de metilo (TFb–NH₂). A un matraz que contenía 24 mg (0.062 mmol) del análogo **TFb–NO₂** y 59 mg (0.310 mmol) de SnCl₂ se añadieron 2 mL de acetato de etilo bajo atmósfera de nitrógeno. La suspensión resultante se mantuvo a 50 °C durante toda la noche (17 h). Transcurrido el tiempo, la mezcla de reacción se dejó enfriar a temperatura ambiente y luego se diluyó en agua y se extrajo con acetato de etilo. Las fases orgánicas se lavaron con una disolución de NaOH al 10% y posteriormente con salmuera, se secaron sobre Na₂SO₄ anhidro y se filtraron. El residuo resultante, después de eliminar el disolvente, se purificó por cromatografía de columna con hexano–acetato de etilo (8:2) para obtener el análogo **TFb–NH₂** como un aceite ligeramente coloreado (19.1 mg, 87%).

Datos espectroscópicos: IR (NaCl) ν_{max} (cm⁻¹) 3459d, 3374d, 2938d, 1727f, 1624d, 1580d, 1439d, 1368m, 1219m, 1069f, 1017f, 957d, 861d, 781m; **¹H–RMN** (300 MHz) δ 7.51 (1H, dd, $J = 7.5, 1.3$ Hz, H–6), 7.42 (1H, dt, $J = 7.5, 7.5, 1.5$ Hz, H–5), 7.38 (1H, dt, $J = 7.5, 7.5, 1.3$ Hz, H–4), 7.19 (1H, dd, $J = 7.5, 1.5$ Hz, H–3), 7.12 (1H, t, $J = 8.0$ Hz, H–5'), 6.97–6.92 (2H, m, H–2' y H–6'), 6.67 (1H, ddd, $J = 8.0, 2.3, 1.0$ Hz, H–4'), 5.10 (2H, s, OCH₂), 4.03 (3H, s, NOCH₃), 3.81 (3H, s, CO₂CH₃), 2.17 (3H, s, CH₃); **¹³C–RMN** (75 MHz) δ 163.72 (CO₂CH₃), 155.32 (CH₃CM), 149.78 (CN), 146.78 (C–3'), 137.92 (C–2), 136.76 (C–1'), 129.38 (C–1), 129.35 (C–6), 129.22 (C–5'), 128.73 (C–5), 128.45 (C–3), 127.51 (C–4), 116.68 (C–6'), 115.95 (C–4'), 112.53 (C–2'), 74.47 (OCH₂), 63.72 (NOCH₃), 52.85 (CO₂CH₃), 12.82 (CH₃); **EMAR** (ES) m/z calculada para C₁₉H₂₂N₃O₄ [M+H]⁺ 356.1610, encontrada 356.1615.

5.4. Preparación de conjugados proteína–hapteno

5.4.1. Preparación de los conjugados inmunogénicos con BSA

Todos los haptenos empleados para la inmunización de ratones y conejos se conjugaron a BSA, previa activación de los mismos a través de la formación de un éster de succinimidilo que posteriormente se hizo reaccionar con los restos amino libres (lisinas) de la BSA. La conjugación se llevó a cabo con los haptenos KMa6, KMb6, KMc6, KMe6 y KMo6 de kresoxim–methyl y TF0, TFa6, TFb6, TFc6, TFe6, TFo6, TFf6 y TFt6 de trifloxystrobin.

Activación de TF0: el hapteno TF0 fue activado mediante *DCC/NHS/dioxano* (**Esquema 3.43** en **apartado 3.2** de resultados y discusión). La activación se llevó a cabo disolviendo 50 mg (0.127 mmol) del hapteno, 31.4 mg (0.152 mmol) de DCC y 17.5 mg (0.152 mmol) de NHS en 1.7 mL de dioxano. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente, bajo atmósfera inerte, durante toda la noche. Transcurrido este tiempo, la mezcla se vertió sobre agua y se extrajo con acetato de etilo. Las fases orgánicas reunidas se lavaron con disolución saturada de NaHCO₃ y con salmuera, se secaron sobre Na₂SO₄ y se filtraron. El residuo obtenido, después de eliminar el disolvente a vacío, se purificó por cromatografía de columna, empleando CHCl₃ como eluyente, obteniéndose así 42.5 mg (68%) del hapteno activado, como un aceite incoloro.

Activación del resto de haptenos: la activación se llevó a cabo empleando *DSC/Et₃N/CH₃CN* (**Esquema 3.42** en **apartado 3.2** de resultados y discusión). Procedimiento representativo para el hapteno KMa6; 31.5 mg (0.074 mmol) del hapteno KMa6 y 25 mg (0.096 mmol) de DSC se disolvieron en 730 µL de acetonitrilo seco. A continuación se añadieron 40 µL (0.281 mmol) de Et₃N y la mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente bajo atmósfera inerte durante toda la noche. Transcurrido este tiempo, la mezcla se diluyó con cloroformo y se lavó con NaHCO₃ saturado y con salmuera, se secó sobre Na₂SO₄ y se filtró. El residuo obtenido después de eliminar el disolvente en el rotavapor se purificó por cromatografía de columna usando como eluyente CHCl₃, obteniéndose 34 mg (88%) del éster activo puro (comprobado por RMN

de ^1H), como un aceite incoloro. La activación del resto de los haptenos se realizó siguiendo el mismo procedimiento experimental obteniéndose todos los ésteres activos con buenos rendimientos (KMb6, 70%; KMc6, 99%; KMe6, 99%; KMo6, 98%; TFa6, 86%; TFb6, 80%; TFc6, 60%; TFe6, 84%; Tfo6, 95%; Tff6, 88%; Tft6, 75%).

Una vez obtenido el éster activo de succinimidilo para cada uno de los haptenos, se procedió a la conjugación con la proteína BSA.

Conjugación a BSA: 100 μl de una disolución 50 mM del éster activo del hapteno en DMF se añadieron lentamente y con agitación constante sobre 1 mL de una disolución de BSA (15 mg/mL) en tampón carbonato 50 mM, pH 9.6. La reacción de conjugación se incubó durante 4 h con agitación a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo, los conjugados se purificaron por exclusión molecular en 3 columnas acopladas de 5 mL HiTrap Desalting Columns, utilizando como tampón de elución fosfato sódico 100 mM, pH 7.4. Finalmente, tras el proceso de purificación, las fracciones recogidas que contenían los conjugados de BSA se llevaron a una concentración final de 1 mg/mL con tampón de elución, almacenándose a $-20\text{ }^\circ\text{C}$.

El número de moléculas de hapteno acopladas por molécula de proteína se determinó por espectrofotometría UV, asumiendo que los coeficientes de extinción molar de ambos componentes no se modifican con la conjugación. Teniendo en cuenta esto, la absorbancia a una determinada longitud de onda para el conjugado proteína–hapteno se puede considerar como la suma de las la absorbancia del hapteno más la de la proteína a esa longitud de onda (Ecuación 1).

$$A_\lambda = C^P l \varepsilon_\lambda^P + C^H l \varepsilon_\lambda^H \quad \text{Ecuación 1}$$

A_λ = absorbancia a una determinada longitud de onda

C^P = concentración de la proteína

C^H = concentración del hapteno unido a la proteína

ε_λ^P = coeficiente de extinción molar de la proteína a una determinada longitud de onda

ε_λ^H = coeficiente de extinción molar del hapteno a una determinada longitud de onda

l = longitud de paso de luz de la celda

Si se asume que no hay pérdidas de proteína, la concentración de la proteína es conocida y el coeficiente de extinción molar de la proteína a una determinada longitud de onda también es conocido. El coeficiente de extinción del hapteno se determina mediante regresión lineal de la recta de absorbancia vs concentración a una determinada longitud de onda midiendo la absorbancia de disoluciones del hapteno a concentraciones conocidas. De este modo, conociendo la absorbancia de la disolución del conjugado proteína–hapteno a una determinada longitud de onda se puede conocer la concentración del hapteno conjugado y finalmente calcular la relación molar (RM), o lo que es lo mismo, el número de moléculas de hapteno ancladas a la proteína (Ecuación 2).

$$RM = C^H / C^P = (A_\lambda - C^P l \varepsilon_\lambda^P) / C^P l \varepsilon_\lambda^H \quad \text{Ecuación 2}$$

Para hacer el cálculo de las RM se tomaron las longitudes de onda 250, 260, 270 y 280 nm, por estar en la zona de máxima absorción del hapteno y de la proteína.

5.4.2. Preparación de los conjugados competidores de ensayo

5.4.2.1. Preparación de conjugados de tapizado con OVA

Para la preparación de los conjugados de tapizado empleados en el formato de conjugado inmovilizado, todos los haptenos fueron acoplados covalentemente con la proteína OVA, previa activación de los mismos por el método del éster activo (**apartado 5.4.1**).

Conjugación a OVA: a partir de una disolución 30 mM en DMF del hapteno activado, se tomaron 100 μ L y se añadieron lentamente y con agitación constante a un volumen de 2 mL de una disolución de OVA (15 mg/mL) en tampón carbonato 50 mM, pH 9.6. Tras 2.5 h se procedió a la purificación de los conjugados, siguiendo la metodología descrita en la conjugación con BSA. Las fracciones recogidas se llevaron a una concentración final de 1 mg/mL en tampón de elución con timerosal al 0.01% (v/v), y se almacenaron a -20 °C.

Tras la purificación de los conjugados, se determinaron las relaciones molares tal y como se ha descrito para los conjugados de BSA.

5.4.2.2. Preparación de trazadores enzimáticos con HRP

Para la preparación de los trazadores enzimáticos empleados en el formato de anticuerpo inmovilizado se conjugaron todos los haptenos con la enzima HRP, previa activación de los mismos según **apartado 5.4.1**.

Conjugación a HRP: a partir de una disolución 10 mM del hapteno activado en DMF, se tomaron 100 μ L y se añadieron lentamente y con agitación constante sobre 1 mL de una disolución de HRP a una concentración de 2.2 mg/mL en tampón carbonato 50 mM, pH 7.4. La reacción de conjugación se incubó durante 4 h a temperatura ambiente. A continuación, los trazadores enzimáticos se purificaron siguiendo el procedimiento previamente descrito en el apartado anterior. Una vez recogidas las fracciones correspondientes a los conjugados, y calculadas las RM por espectrofotometría UV, los trazadores se llevaron a 500 μ g/mL en tampón PBS con BSA al 1% (p/v) y timerosal al 0.01% (p/v) y se almacenaron a 4°C.

5.5. Producción de anticuerpos policlonales de conejo

5.5.1. Inmunización de conejos

La estabulación y manipulación de los animales se realizó de acuerdo con las leyes y las directrices del Ministerio Español de Ciencia y Innovación (**RD 1201/2005** y la **Ley 32/2007**) y de acuerdo con la **Directiva 2003/65/CE** de la Unión Europea relativa a la protección de los animales utilizados con fines experimentales o científicos. Para la inmunización se utilizaron hembras de conejos *New Zealand* de aproximadamente 2 kg. En total se inocularon 26 conejos, dos con cada conjugado BSA–hapteno: BSA–KMa6, BSA–KMb6, BSA–KMc6, BSA–KMe6, BSA–KMo6, BSA–TF0, BSA–TFa6, BSA–TFb6, BSA–TFc6, BSA–TFe6, BSA–TFo6, BSA–TFf6 y BSA–TFt6. En la primera inmunización se administraron por inyección subcutánea 300 μ g de conjugado BSA–hapteno por conejo en un volumen total de 1 mL de una emulsión

1:1 (v/v) con adyuvante de Freund completo, distribuyéndose en varias dosis a lo largo de la zona dorsal del animal. A intervalos de tres semanas, los conejos recibieron tres inmunizaciones adicionales con la misma cantidad de conjugado, en estos casos emulsionando los conjugados 1:1 con adyuvante de Freund incompleto.

5.5.2. Obtención de antisueros de conejo

Diez días después de la cuarta inmunización, los conejos fueron exanguinados por punción intracardiaca. Las muestras de sangre así obtenidas se mantuvieron a 4 °C durante 24 h para favorecer la coagulación. Al día siguiente, el suero conteniendo los anticuerpos policlonales se separó del coágulo centrifugando 2 veces a 2880×g durante 15 minutos. Una alícuota del antisuero obtenido se diluyó 1/5 con PBS–timerosal 0.01% (p/v) y se almacenó a 4 °C en viales ámbar para su uso diario.

El resto del antisuero se purificó parcialmente mediante doble precipitación con sulfato amónico saturado [1:1, (v/v)] y se almacenó a 4 °C para su mantenimiento a largo plazo.

5.6. Producción de anticuerpos monoclonales de ratón

5.6.1. Inmunización de ratones

Para la inmunización se emplearon hembras de ratón *BALB/c*, con una edad al inicio del proceso comprendida entre 6 y 8 semanas. En total se inmunizaron 52 ratones, cuatro con cada uno de los conjugados BSA–hapteno. En cada dosis se administraron por vía intraperitoneal 100 µg de conjugado por ratón, siendo el volumen total administrado de 200 µL. En la primera inmunización se suministró el conjugado en una emulsión preparada con adyuvante de Freund completo [1:1, (v/v)]. En intervalos de 3 semanas, los ratones recibieron dos inmunizaciones adicionales, en estos casos emulsionando los conjugados con adyuvante de Freund incompleto. Diez días después de la 3ª inmunización, como control del proceso se extrajo una muestra de sangre de los ratones inmunizados mediante sangrado submandibular. Cuatro días antes de cada

fusión celular, el ratón seleccionado recibió una última dosis de 100 µg del correspondiente conjugado diluido en PBS [1:1, (v/v)].

5.6.2. Obtención de antisueros de ratón

Las muestras de sangre extraídas a los ratones después de la 3ª inmunización se mantuvieron a 4 °C durante 24 horas para facilitar la coagulación de la sangre. Tras este tiempo, las muestras se centrifugaron 2 veces a 12000 rpm en una microcentrífuga Eppendorf durante 15 minutos. El antisuero recogido se diluyó 1/10 en PBS con timerosal al 0.01% (p/v) y se almacenó a 4 °C.

5.6.3. Fusiones celulares para la obtención de hibridomas

Las fusiones celulares con los ratones inmunizados se llevaron a cabo básicamente siguiendo la metodología descrita por Nowinski *et al.* (1979), que introduce ligeras modificaciones respecto a la técnica original desarrollada por Köhler y Milstein en 1975.

Inicialmente, después del sacrificio de los ratones, se extrajo el bazo, que se homogeneizó con el émbolo de un jeringa estéril. Tras lisar los glóbulos rojos por choque osmótico con 1 mL de tampón de lisis durante un minuto en frío, los linfocitos se lavaron 2 veces con medio frío y se filtraron para eliminar los coágulos formados.

La línea de mieloma P3–X63–Ag8.653 (Kearney *et al.*, 1979) había sido cultivada los días previos a la fusión en medio DMEM suplementado [2 mM L-alanina–L–glutamina, 1 mM aminoácidos no esenciales, 25 µg/mL gentamicina, SBF 10 % (v/v)], manteniendo las células en fase de crecimiento exponencial, de manera que el día de la fusión se dispusiese de un número suficiente de las mismas.

Tras dos lavados con medio sin suero, ambas poblaciones celulares (linfocitos y mielomas) se reunieron a una relación linfocito:mieloma 4:1. A continuación, las células se centrifugaron, para inmediatamente después llevar a cabo la fusión celular. Para ello, se empleó PEG 1500 como agente fusionante (1 mL por bazo, 1 minuto), que al disolver parcialmente las

membranas permite la fusión de las células. Una vez fusionadas ambas poblaciones, las células se re-suspendieron en medio DMEM suplementado [SBF 15% (v/v)] y se sembraron en placas de cultivo de 96 pocillos (100 μ L por pocillo) a una densidad celular comprendida entre 150×10^3 y 200×10^3 linfocitos por pocillo, y se incubaron a 37 °C en atmósfera de 5% de CO₂ y un 90% de humedad. 24 horas después de la fusión, se añadieron 100 μ L por pocillo de medio HAT para la selección de hibridomas [DMEM suplementado con 100 μ M hipoxantina, 0.4 μ M aminopterina, 16 μ M timidina, HFCS 1% (v/v), SBF 20 % (v/v)].

5.6.4. Selección, clonación y conservación de hibridomas

Aproximadamente 10–12 días después de la fusión celular, se llevó a cabo la evaluación de los sobrenadantes de los pocillos sembrados para identificar cuáles contenían hibridomas productores de anticuerpos capaces de reconocer a KM o a TF (dependiendo de la fusión realizada) tanto en su forma conjugada como libre (hibridomas competitivos). Previamente se determinó por inspección visual la eficiencia de la fusión, definida como el porcentaje de pocillos que presentaban al menos un clon claramente visible.

La identificación de los hibridomas de interés se llevó a cabo mediante ELISA diferencial (Abad y Montoya, 1994), que consiste en analizar cada sobrenadante de cultivo mediante ELISA indirecto tanto en ausencia de analito como en presencia de una concentración preestablecida. Para ello, las placas se tapizaron con el conjugado homólogo a una concentración de 1 μ g/mL. El ensayo sin analito se realizó añadiendo 50 μ L/pocillo de PBS más 50 μ L del sobrenadante de cultivo, y el ensayo competitivo se realizó añadiendo 50 μ L/pocillo de una disolución 200 nM de KM o TF más 50 μ L del mismo sobrenadante de cultivo. De esta forma, la concentración final de analito en el ensayo fue de 100 nM. Las condiciones para el formato de ELISA indirecto se detallan en el **apartado 5.7.1.1**.

A continuación, se seleccionaron aquellos pocillos que contenían hibridomas productores de anticuerpos que proporcionaran una señal de absorbancia igual o superior a 0.5 en ELISA no competitivo (pocillos positivos) e inhibición de la

señal igual o superior al 50% en el ELISA competitivo (pocillos competitivos). Adicionalmente, para todos los pocillos positivos se llevó a cabo un segundo ensayo más exhaustivo en modo bidimensional competitivo con el fin de garantizar la selección de los mejores hibridomas (Mercader *et al.*, 2008c). Para ello, el sobrenadante de cada hibridoma se ensayó a 4 diluciones (1/8, 1/32, 1/128 y 1/512) en placas tapizadas con el conjugado homólogo a 0.1 y 1 µg/mL, y utilizando como competidor KM o TF a 10 y 100 nM (en ensayo). Así, 200 µL del sobrenadante de cultivo se diluyeron en 600 µL de PBST y las siguientes diluciones se hicieron de forma seriada a partir de esta primera. El ensayo se realizó añadiendo 50 µL/pocillo de la correspondiente dilución de sobrenadante y 50 µL de la disolución de KM o TF en PBS a la concentración de 200, 20 y 0 nM.

Las células de los pocillos finalmente seleccionados se clonaron por el método de dilución límite, sembrando a partir de cada pocillo una nueva placa de 96 pocillos a 2 células/pocillo en medio HT.

Generalmente, 7–10 días después de la primera clonación celular, se identificaron por inspección visual los pocillos que contenían un solo clon, evaluándose de nuevo los sobrenadantes de cultivo de la misma forma que se ha descrito previamente para los sobrenadantes de fusión. Este proceso se realizó tantas veces como fue necesario (mínimo dos) para asegurar el carácter monoclonal de los hibridomas seleccionados, así como su estabilidad.

Finalmente, se procedió a la expansión de las líneas celulares seleccionadas, de forma que el hibridoma se cultivó progresivamente en placas de mayor capacidad volumétrica. Una vez crecido el clon, las células se congelaron en nitrógeno líquido a una concentración de 10^7 células/vial (3–4 viales/hibridoma) en una disolución de SBF con DMSO 10% (v/v) como agente crioprotector.

5.6.5. Producción y purificación de anticuerpos monoclonales

En la última fase de la expansión de los hibridomas, éstos se dividieron progresivamente en placas de cultivo hasta alcanzarse un volumen final comprendido entre 100 y 150 mL de sobrenadante. Se dejaron crecer las células hasta alcanzar la confluencia celular, y una vez agotados los nutrientes del medio se procedió a recoger el contenido de las placas. El volumen recogido se centrifugó para eliminar los restos celulares y el sobrenadante se precipitó mediante la adición de un volumen de una disolución saturada de sulfato amónico, manteniéndose a 4 °C hasta su purificación.

La purificación de los anticuerpos se realizó por cromatografía de afinidad con columnas de proteína G siguiendo las instrucciones del fabricante. Con este propósito, el anticuerpo precipitado se centrifugó durante 20 minutos a 4000×g y se desechó el sobrenadante. El precipitado que contenía los anticuerpos monoclonales se re-disolvió con tampón fosfato sódico 20 mM, pH 7.4 y se filtró con membranas de nitrocelulosa (diámetro de poro 0.45 µm) para eliminar partículas en suspensión. A modo de control se recogieron 500 µL de la disolución filtrada sin purificar y se almacenaron a 4 °C (en caso de ausencia de actividad del anticuerpo tras la purificación, el análisis de esta fracción no purificada podría indicar si tal pérdida habría sido consecuencia de dicho proceso). La elución del anticuerpo de la columna se realizó con tampón citrato sódico 100 mM, pH 2.5. Las fracciones que contenían el anticuerpo se unieron y la disolución se neutralizó adicionando Tris-HCl 1M, pH 9.5. Finalmente, se determinó por espectrofotometría UV la concentración del anticuerpo purificado [$A_{280} (1 \text{ mg/mL IgG}) = 1.4$] y se preparó una disolución de trabajo a una concentración de 500 µg/mL en PBS con BSA al 1% (p/v) y timerosal al 0.01% (p/v), que se almacenó a 4 °C. La disolución restante se precipitó con sulfato amónico saturado [1:1, (v/v)], lo que garantiza su estabilidad a 4 °C durante años (Montoya y Castell, 1987).

5.7. Inmunoensayos para la detección de KM y TF

5.7.1. Formatos de ELISA competitivos

A continuación se describen las condiciones generales empleadas para los dos formatos de ELISA aplicados en el presente trabajo.

5.7.1.1. ELISA de conjugado inmovilizado (formato indirecto)

En primer lugar, las placas de ELISA de 96 pocillos se tapizaron con 100 μL /pocillo del conjugado OVA–hapteno correspondiente (homólogo y/o heterólogo) en tampón de tapizado, a temperatura ambiente durante toda la noche. Las concentraciones de tapizado se indican específicamente en cada apartado de la sección de resultados y discusión, siendo habitualmente 1 o 0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Al día siguiente, las placas se lavaron 4 veces con disolución de lavado. A continuación se añadieron 50 μL /pocillo de una disolución de KM o TF (o analito competidor en los estudios selectividad) diluida de manera seriada en PBS (curva patrón), más 50 μL /pocillo de una disolución de anticuerpo primario (mAb o pAb) en PBST. Tras 1 h de reacción a temperatura ambiente, las placas se lavaron como se ha descrito previamente. A continuación, se añadieron 100 μL /pocillo de la disolución del anticuerpo secundario–HRP en PBST. En el caso de los inmunoensayos desarrollados con anticuerpos de ratón, se empleó una disolución 1/2000 de RAM–HRP. Para los ensayos desarrollados con los anticuerpos de conejo se utilizó una disolución 1/10000 de GAR–HRP. Esta etapa tuvo lugar durante 1 hora, tiempo tras el cual se lavaron de nuevo las placas. La generación de la señal se llevó a cabo mediante la adición de 100 μL /pocillo de disolución de revelado, preparada inmediatamente antes de ser utilizada. La reacción enzimática se detuvo a los 10 min por adición de 100 μL /pocillo de la disolución de parada.

5.7.1.2. ELISA de anticuerpo inmovilizado (formato directo)

En este formato los anticuerpos se inmovilizaron directamente sobre las placas de poliestireno mediante la adición de 100 μL /pocillo de una disolución de anticuerpo (mAb o pAb) en tampón de tapizado. En el caso de los mAbs, las

concentraciones empleadas fueron de 0.3 y 1 µg/mL. En el caso de los rAs de conejo, se evaluaron tres diluciones diferentes de antisuero para el tapizado; 1/3000, 1/10000 y 1/30000. Las placas se incubaron durante toda la noche a temperatura ambiente y al día siguiente se lavaron. A continuación, se adicionaron 50 µL/pocillo de la curva estándar de analito en PBS y 50 µL/pocillo de una disolución de trazador enzimático en PBST (homólogo y/o heterólogo). Tras un periodo de incubación de 1 h se lavaron las placas y se generó la señal como se ha descrito en el apartado anterior para el formato indirecto.

5.7.2. Procesamiento de la señal y curvas de inhibición

La señal del ensayo se monitorizó espectrofotométricamente en modo dual a 492 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 8.0 a la siguiente ecuación sigmoide de cuatro parámetros (Rodbard, 1974):

$$y = (A - D) / [1 + (x / C)^B] + D \quad \text{Ecuación 3}$$

donde **y** es el valor de absorbancia obtenida frente a una concentración **x** de analito, **A** es la asíntota máxima [absorbancia obtenida en ausencia de analito (**A_{max}**)], **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 [el ruido de fondo (**A_{min}**)]. El parámetro **C**, también denominado **IC₅₀** por coincidir habitualmente con la concentración de analito que produce una inhibición de la señal máxima del 50%, es uno de los parámetros más importantes de la curva, puesto que se suele adoptar como estimación de la afinidad del anticuerpo hacia el analito o de la sensibilidad del ensayo, siendo éste tanto más sensible cuanto menor sea el valor de este parámetro (**Figura 5.1**).

El límite de detección de los inmunoensayos (**LOD**) se estableció como la concentración de analito que generó un 10% de inhibición de la señal máxima (**IC₁₀**). El intervalo de trabajo para la determinación de la concentración de analito se estableció entre los valores de **IC₂₀** e **IC₈₀**, valores de concentración

de analito que produjeron un 20 y un 80% de inhibición de la A_{max} , respectivamente (**Figura 5.1**).

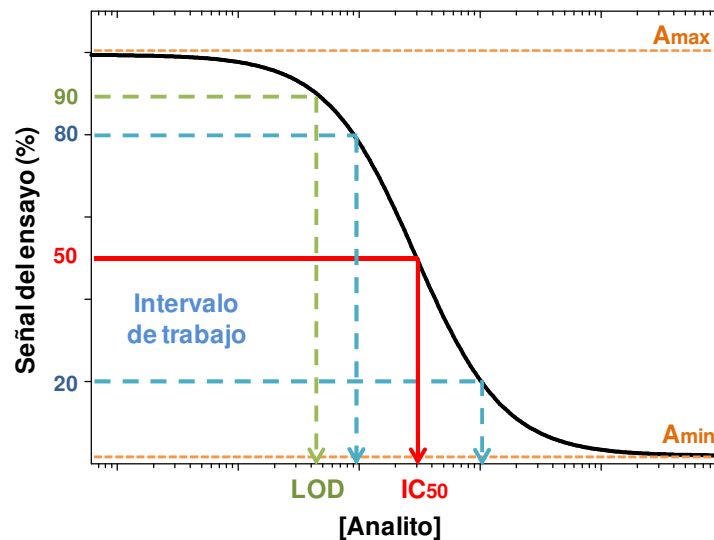


Figura 5.1. Curva de inhibición donde se muestran los parámetros analíticos que determinan la detectabilidad y el intervalo de cuantificación de un inmunoensayo de tipo competitivo.

En aquellos casos en los que se consideró necesario, los valores de absorbancia de cada curva particular se normalizaron con respecto al valor de la absorbancia experimental obtenido en ausencia de analito (A_0), para facilitar la comparación de diferentes inmunoensayos. Las señales de absorbancia normalizadas se calcularon como:

$$A_{norm} = (A_{experimental}/A_0) \times 100 \quad \text{Ecuación 4}$$

5.7.3. Evaluación de la especificidad de los anticuerpos

5.7.3.1. Estudios de reactividad cruzada

El análisis de especificidad o selectividad de los anticuerpos se llevó a cabo mediante estudios de RC en el formato de ELISA indirecto utilizando el conjugado de tapizado homólogo. Así, se evaluó el reconocimiento mostrado por los anticuerpos hacia una batería de distintos analitos competidores análogos a KM y/o TF: análogos sintéticos, estrobilurinas, metabolitos, productos de degradación y otros fungicidas. Con este propósito se prepararon curvas estándar en PBS de cada uno de los compuestos analizados,

manteniéndose el resto de condiciones tal y como se ha indicado para dicho formato (**apartado 5.7.1.1**) y se determinaron los valores de IC₅₀ para cada analito de la misma forma que se habían determinado para KM y/o TF. La RC para cada compuesto, indicativa del grado de interacción con los anticuerpos hacia el mismo, se calculó mediante la siguiente expresión:

$$RC = [(IC_{50} (\text{analito}) / IC_{50} (\text{análogo})) \times 100] \quad \text{Ecuación 5}$$

5.7.3.2. Análisis de agrupación jerárquica

La clasificación de los anticuerpos en base a su especificidad se llevó a cabo a partir de los perfiles de unión a la batería de competidores análogos evaluados. Con este objetivo, los resultados de los estudios de RC fueron sometidos a análisis de agrupación jerárquica (Hierarchical CLustering, **HCL**) empleando el programa de libre acceso MultiExperiment Viewer (**MeV**) versión 4.7.4 (Mar *et al.*, 2011).

En primer lugar se generó la matriz de datos, en la que se representaron los valores de RC, normalizados a la unidad, obtenidos para cada anticuerpo (objeto, eje de ordenadas) frente a cada uno de los análogos estructurales (condición o variable, eje de abscisas). De esta manera se generó la matriz ($n \times i$) de n vectores (siendo n el número de anticuerpos). A continuación, esta matriz se representó con el MeV en un *mapa de calor*, aplicando la transformación logarítmica en base 2 a los datos normalizados, procediéndose por último al análisis de los mismos mediante el algoritmo aglomerativo de clasificación jerárquica. El correspondiente dendograma (árbol de agrupación) se obtuvo empleando la métrica de similitud no paramétrica Tau de Kendall (Kendall, 1938) y el método de agregación de encadenamiento completo o vecino más lejano.

Brevemente, el procedimiento en el que se basa este método de agrupación computacional consiste en la generación de la matriz de similitud entre los anticuerpos ($n \times n$), seguida de la aplicación del algoritmo aglomerativo. En base a la métrica de similitud seleccionada, en primer lugar se transforma la matriz de datos en una matriz de rango ($n \times i$), en la que en los vectores se sustituye cada valor de RC (normalizado y transformado logarítmicamente) por

su rango, es decir la posición de su valor absoluto en el vector (los rangos son asignados en sentido creciente). A continuación se genera la matriz de similitud ($n \times n$) en la que se representan los coeficientes de correlación o similitud, τ en este caso, correspondiente a cada pareja de anticuerpos. Este coeficiente se calcula comparando todas las parejas de rangos (x_1, y_1) y (x_i, y_i) para cada pareja de anticuerpos (x e y) entre sí, mediante la siguiente expresión:

$$\tau = (n_c - n_d) / [n(n-1)/2] \quad \text{Ecuación 6}$$

donde n_c el número de pares concordantes (si $x_1 < x_i$ e $y_1 < y_i$; o $x_1 > x_i$ e $y_1 > y_i$), n_d el número de pares discordantes (si $x_1 < x_i$ e $y_1 > y_i$; o $x_1 > x_i$ e $y_1 < y_i$), y n el número de parejas de rangos (es decir, el número de condiciones, análogos en este caso). El coeficiente de Tau de Kendall está comprendido entre -1 y 1 , representando la mínima y máxima similitud, respectivamente. Por último se aplica el algoritmo sobre la matriz, de manera que los anticuerpos se van agrupando en *clusters* en función de su similitud o menor distancia. Cada vez que un anticuerpo se incorpora a un *cluster* se genera una nueva matriz reducida en la que cada nuevo grupo es sustituido por un nuevo vector al que se le asigna un valor de similitud con cada uno de los anticuerpos restantes correspondientes a la menor similitud que presentaba cada uno de sus miembros con dicho anticuerpo (método de agregación del vecino más lejano). Este procedimiento se repite $n-1$ veces, hasta que se genera el árbol completo.

5.7.4. Caracterización y optimización de los inmunoensayos

Los ensayos finalmente seleccionados en ambos formatos de ELISA fueron sometidos a estudios de caracterización de factores que habitualmente pueden influir en la señal y sensibilidad de un inmunoensayo. Los factores evaluados fueron la fuerza iónica, el pH, la concentración de Tween 20 y la tolerancia a disolventes orgánicos.

5.7.4.1. Influencia del pH, fuerza iónica y concentración de Tween 20

La influencia del pH y la fuerza iónica sobre los parámetros de los ensayos se evaluó mediante una aproximación bi-paramétrica utilizando el software estadístico Minitab (Minitab Inc., State College, PA). Esta herramienta informática permite realizar un análisis de superficie de la respuesta producida combinando múltiples factores de ensayo, mediante un diseño experimental simplificado. Para la evaluación de la influencia de estos parámetros, se llevaron a cabo ensayos competitivos siguiendo la metodología descrita en el **apartado 5.7.1**, con la particularidad de que en este caso la curva estándar de KM o TF se preparó en agua destilada y la disolución de cada inmunorreactivo empleado en la etapa competitiva (anticuerpo o trazador enzimático, dependiendo del formato) se preparó en tampones con diferente pH y fuerza iónica, cubriendo un rango de pH entre 5.5 y 9.5 y entre 50 y 300 mM para la fuerza iónica (**Tabla 5.9.1**). Cada combinación se ensayó por triplicado.

Tabla 5.9.1. Fuerza iónica (*I*) y pH de los tampones empleados en la caracterización fisicoquímica de los inmunoensayos seleccionados.

Tampón	<i>I</i> (mM) ^a	pH	Tween 20 (%)
Tp#1	175	5.5	0.025
Tp#2	86.6	6.1	0.025
Tp#3	263.4	6.1	0.025
Tp#4	50	7.5	0.025
Tp#5	175	7.5	0.025
Tp#6	300	7.5	0.025
Tp#7	86.6	8.9	0.025
Tp#8	263.4	8.9	0.025
Tp#9	175	9.5	0.025

^a Los valores de fuerza iónica y pH de los tampones se muestran tal y como quedan en ensayo. En negrita se ha resaltado el tampón correspondiente al valor central de cada uno de los parámetros analizados.

Los distintos tampones se prepararon de la siguiente manera: i) se preparó una disolución de partida 40 mM citrato sódico, 40 mM fosfato hidrógeno disódico y 40 mM Tris (pH 9.9); ii) se ajustó el pH al valor requerido en cada caso mediante la adición de volúmenes conocidos de HCl 5 N; iii) se calculó la fuerza iónica de cada disolución (I) de la siguiente manera:

$$I = \frac{1}{2} \sum c_i \cdot z_i^2 \quad \text{Ecuación 7}$$

siendo **c** la concentración de cada ión (i) en el equilibrio, y **z** su carga, considerando la disolución inicial y el volumen añadido de HCl. A continuación se añadió el volumen necesario de una disolución de NaCl 2M a cada tampón para obtener la fuerza iónica final requerida; por último se añadió Tween 20 y se ajustó el volumen mediante la adición de agua desionizada de forma que los tampones finales contuvieron un 0.05% de Tween 20. La concentración de Tween 20 y la fuerza iónica de cada tampón se prepararon al doble de la concentración en ensayo.

Para el estudio de la influencia de la concentración de Tween 20 se siguió también la metodología del **apartado 5.7.1**, preparando esta vez las curvas de KM o TF en tampón PBS y las disoluciones de anticuerpos (formato indirecto) y trazadores enzimáticos (formato directo) en tampón PBS con diferentes proporciones de Tween 20 (0, 0.005, 0.01, 0.025, 0.05 y 0.1% en ensayo). Cada proporción de Tween 20 se ensayó por duplicado.

5.7.4.2. Tolerancia a disolventes orgánicos

Se llevó a cabo un estudio para evaluar la influencia ejercida por disolventes orgánicos sobre los parámetros de ensayo (A_{max} e IC_{50}). Los disolventes evaluados fueron metanol, etanol y acetonitrilo. Los inmunoensayos seleccionados en cada formato de ELISA se evaluaron siguiendo la metodología descrita en el **apartado 5.7.1**, con la particularidad de que en este caso se prepararon las curvas estándar de KM o TF en mezclas de PBS con distintas proporciones de cada disolvente [0.5, 1, 2, 5 y 10 % (v/v) en ensayo] y las disoluciones de los anticuerpos y los trazadores enzimáticos en PBST.

5.7.5 Aplicación de los inmunoensayos al análisis de muestras vegetales

5.7.5.1. Determinación del efecto matriz

Se analizó la influencia de distintas matrices hortofrutícolas sobre los parámetros analíticos de los inmunoensayos seleccionados. Las matrices evaluadas fueron tomate, pepino y fresa, obtenidas de campos de cultivos sin tratar.

Para llevar a cabo este estudio fue necesario procesar las muestras vegetales no adulteradas. Para ello, las muestras de tomate, pepino y fresa fueron trituradas y homogeneizadas empleando una licuadora DeLonghi. Una vez homogeneizadas, las muestras se almacenaron a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su procesado. Para la obtención de los extractos se empleó el método QuEChERS (Método Oficial AOAC 2007.01) (Anastasiades *et al.*, 2003; Lehotay, 2007; Paya *et al.*, 2007). A continuación se detalla el protocolo de extracción concreto empleado:

Se tomaron 20 g de la muestra vegetal (tomate, pepino o fresa) homogeneizada y se mezclaron con 2 g de acetato sódico y 8 g de sulfato magnésico anhidro. A continuación se añadieron 20 mL de acetonitrilo (1% de ácido acético) y la mezcla se agitó vigorosamente con un vortex. Posteriormente, la muestra se centrifugó durante 5 minutos a $2200\times g$ y se recogió la fase orgánica. Se tomaron 8 mL del extracto crudo y se almacenaron a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ (extracto sin purificar). A los otros 10 mL del extracto crudo se les añadió 500 mg de PSA y 1.5 g de sulfato magnésico anhidro seguidamente se centrifugó la mezcla durante 5 minutos a $2200\times g$ y se recogió el extracto purificado, almacenándose también a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su análisis.

Para evaluar el efecto matriz, se prepararon diluciones en PB de los extractos purificados para obtener una dilución final en ensayo de las matrices de 1/10, 1/30, 1/100, 1/300 y 1/1000. Se prepararon curvas estándar de KM o TF en las distintas diluciones de las matrices y en PB como control. Las disoluciones de anticuerpos o trazadores enzimáticos se realizaron en PBT. La dilución mínima requerida para la determinación precisa de ambos analitos de

estudio se determinó comparando los parámetros analíticos (A_{\max} e IC_{50}) de las curvas de inhibición obtenidas en las matrices diluidas con los de la curva control.

5.7.5.2. Análisis de muestras vegetales fortificadas

La exactitud y precisión de los ensayos seleccionados fue evaluada mediante el análisis de muestras vegetales fortificadas. Con este objetivo, los extractos purificados de tomate, pepino y fresa mencionados en el apartado anterior fueron dopados con diferentes niveles de KM o TF, cubriendo un amplio rango de concentraciones. Los valores de fortificación empleados para KM fueron de 10, 30, 100 y 300 $\mu\text{g}/\text{kg}$, y para TF de 10, 30, 50, 100, 300 y 500 $\mu\text{g}/\text{kg}$. A continuación, las muestras fueron convenientemente diluidas en PB para evitar el efecto matriz y permitir que la concentración de analito entrara en el intervalo de cuantificación de los inmunoensayos (generalmente a 1/100, 1/300 y 1/1000 en ensayo), y se analizaron mediante ELISA por triplicado. Como control del efecto matriz se incluyó también una muestra de cada matriz no fortificada igualmente diluida. Las disoluciones de los anticuerpos y de los trazadores enzimáticos en la etapa competitiva se prepararon en PBT. Finalmente, el valor promedio de la absorbancia proporcionado por cada muestra diluida se interpoló en una curva estándar de KM o TF preparado en PB e incluida por triplicado en la misma placa y se calculó la concentración de KM o TF en cada muestra fortificada mediante la aplicación del correspondiente factor de dilución. Los valores de recuperación se calcularon con la siguiente fórmula:

$$\text{Recuperación} = ([\text{KM o TF}]_{\text{ELISA}} / [\text{KM o TF}]_{\text{fortificada}}) \times 100 \quad \text{Ecuación 8}$$

5.7.6. Análisis de muestras de campo: estudio comparativo con GC–MS

5.7.6.1. Obtención de muestras de campo de tomate, pepino y fresa

Las disoluciones de KM para aplicación en campo se prepararon diluyendo la cantidad apropiada de producto comercial (Stroby (GD), 50% KM) en 1 L de agua y 4 mL de mojante Inagra (alquil poliglicol éter 20 %). Las disoluciones de

TF para la aplicación en campo se llevaron a cabo de la misma manera que para KM, utilizando en este caso la cantidad apropiada del producto comercial de TF (Flint (GD), 50% TF).

Para la validación de los inmunoensayos desarrollados se tomó como método de referencia el análisis por GC–MS. Para llevar a cabo este estudio se emplearon muestras procedentes de cultivos de tomate, pepino y fresa tratados con los fungicidas objeto de estudio. Los cultivos de tomate y pepino se fumigaron con Strobry (100 mg/L KM) y Flint (125 mg/L TF) utilizando un nebulizador manual, recogiéndose muestras los días 1, 3, 6, 10 y 15. En el caso de las muestras de fresa, éstas se obtuvieron tras aplicar a los cultivos tres tratamientos diferentes. Este estudio se llevó a cabo solamente con KM. En el tratamiento 1 (T1) se aplicó Strobry a la concentración recomendada (125 mg/L) con un nebulizador manual y se recogieron muestras los días 1, 4 y 8. En el tratamiento 2 (T2) se aplicó Strobry de la misma forma a una concentración el doble de la recomendada (250 mg/L) y se recogieron muestras los días 1, 2, 4, 8 y 16. Por último, en el tratamiento 3 (T3) se aplicó Strobry nuevamente a la concentración recomendada (125 mg/L), se recogieron los frutos al día siguiente y se almacenaron a 4 °C. Las muestras se fueron tomando de la cámara fría y procesando los días 1, 2, 4, 6, 8 y 10. En todos los tratamientos se dejaron muestras sin fumigar como control y se recogieron en las mismas condiciones. Estas muestras control fueron las que se utilizaron para llevar a cabo la determinación del efecto matriz y los estudios de recuperación.

5.7.6.2. Procedimiento de extracción para el análisis por GC–MS

El procedimiento de extracción de KM y TF para la determinación por GC–MS a partir de las muestras homogeneizadas se llevó a cabo también según el método QuEChERS de la AOAC. A continuación se detalla el protocolo de extracción empleado:

Se tomaron 5 g de muestra homogeneizada (tomate, pepino o fresa), se les añadió 25 µL de una disolución de patrón interno en acetonitrilo a una concentración de 100 mg/L y se mezclaron con 0.5 g de acetato sódico y 5 mL de acetonitrilo (1% de ácido acético). A continuación se añadieron 2 g de

sulfato magnésico anhidro y se procedió a la extracción de la muestra mediante agitación vigorosa durante 1 min. La muestra se centrifugó 5 minutos a 2200×g y se recogió la fracción orgánica. Se tomó 1 mL de este extracto crudo y se agitó vigorosamente en un eppendorf con 50 mg de PSA y 150 mg de MgSO₄; seguidamente se centrifugó la mezcla a 2200×g durante 5 minutos y se recogió el extracto purificado. Por último, dicho extracto se filtró con un filtro de teflón (0.2 µm) y se almacenó a -20 °C hasta su análisis por GC-MS. En base al volumen de acetonitrilo empleado en la extracción, la concentración de patrón interno en el extracto final es de 500 µg/L.

5.7.6.3. Análisis de las muestras por GC-MS

Los extractos obtenidos siguiendo el procedimiento descrito anteriormente se analizaron por GC-MS empleando una columna capilar HP-5MS (30 m × 0.25 mm × 0.25 µm) y helio como gas portador a un flujo constante de 1 mL/min. Se inyectó 1 µL de extracto en modo *splitless*, operando el inyector a 280 °C. El horno cromatográfico se programó con la siguiente secuencia de temperaturas: 110 °C durante 1 minuto y a continuación una rampa de 15 °C/min hasta 280 °C, temperatura que se mantuvo durante 15 minutos. La temperatura de la fuente de iones fue de 225 °C y se empleó ionización por impacto electrónico a 70 eV.

En primer lugar se analizaron los patrones individuales de KM y TF en modo *Full Scan* para identificar sus tiempos de retención y seleccionar las masas más adecuadas para la cuantificación de los mismos (116 y 131 m/z en ambos casos). De esta forma el tiempo de retención para KM y TF fue de 11.0 y 11.8 minutos, respectivamente, y de 14.0 minutos para el patrón interno. A continuación se analizaron patrones de ambos fungicidas en modo SIM (Selective Ion Monitoring) para obtener una mayor sensibilidad.

La concentración de KM o TF en las muestras se calculó interpolando el cociente de las áreas de los picos integrados de KM o TF y de patrón interno ($A_{(KM \text{ o } TF)} / A_{PI}$) en una curva de calibrado de 7 puntos (50, 100, 200, 500, 1000, 2000 y 5000 µg/L) preparada para cada analito en acetonitrilo con una

concentración constante de patrón interno de 500 µg/L para cada estándar, la misma concentración final presente en los extractos medidos (**Figura 5.2**).

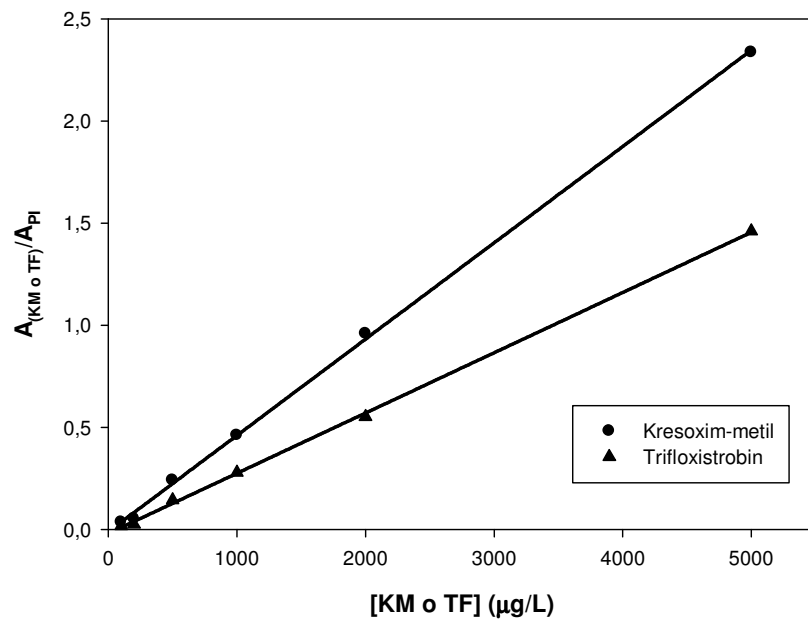


Figura 5.2. Rectas de calibrado empleadas en la cuantificación por GC-MS. (●) Kresoxim-methyl, $y = -0.01 + 4.71e^{-4}x$, $r^2 = 0.994$. (▲) Trifloxystrobin, $y = -0.02 + 2.95e^{-4}x$, $r^2 = 0.996$.

5.7.6.4. Análisis de muestras por ELISA

Tanto los extractos crudos como los extractos purificados con PSA obtenidos por el procedimiento QuEChERS se analizaron empleando los inmunoensayos seleccionados de manera equivalente a como se ha descrito anteriormente para las muestras fortificadas.

La exactitud de los inmunoensayos desarrollados se determinó por comparación de los resultados obtenidos en la cuantificación de KM o TF en las muestras vegetales de tomate, pepino y fresa con los proporcionados por GC-MS, empleando una regresión Deming. En aquellos casos en los que la recta de regresión obtenida proporcionó una ordenada en el origen igual a 0 y una pendiente igual a 1, se consideró que ambos métodos de análisis fueron estadísticamente comparables.

6. Bibliografía

- Abad, A.; Montoya, A. Production of Monoclonal Antibodies for Carbaryl from a Hapten Preserving the Carbamate Group. *J. Agric. Food Chem.* **1994**, *42*, 1818–1823.
- Abad, A.; Montoya, A. Application of a Monoclonal Antibody–Based ELISA to the Determination of Carbaryl in Apple and Grape Juices. *Anal. Chim. Acta* **1995**, *311*, 365–370.
- Abad, A.; Primo, J.; Montoya, A. Development of an Enzyme–Linked Immunosorbent Assay to Carbaryl. Antibody Production from Several Haptens and Characterization in Different Immunoassay Formats. *J. Agric. Food Chem.* **1997a**, *45*, 1486–1494.
- Abad, A.; Manclús, J. J.; Mojarrad, F.; Mercader, J. V.; Miranda, M. A.; Primo, J.; Guardiola, V.; Montoya, A. Hapten Synthesis and Production of Monoclonal Antibodies to DDT and Related Compounds. *J. Agric. Food Chem.* **1997b**, *45*, 3694–3702.
- Abad, A.; Moreno, M. J.; Montoya, A. (1998). Hapten Synthesis and Production of Monoclonal Antibodies to the *N*–Methylcarbamate Pesticide Methiocarb. *J. Agric. Food Chem.* **1998**, *46*, 2417–2426.
- Abad, A.; Moreno, M. J.; Montoya, A. Development of Monoclonal Antibody–Based Immunoassay to the *N*–Methylcarbamate Pesticide Carbofuran. *J. Agric. Food Chem.* **1999**, *47*, 2475–2485.
- Abad, A.; Moreno, M.J.; Pelegrí, R.; Martínez, M. I.; Sáez, A.; Gamón, M.; Montoya, A. Monoclonal Enzyme Immunoassay for the Analysis of Carbaryl in Fruits and Vegetables without Sample Cleanup. *J. Agric. Food Chem.* **2001**, *49*, 1707–1712.
- Abreu, S.; Corriea, M.; Herbert, P.; Santos, L.; Alves, A. Screening of Grapes and Wine for Azoxystrobin, Kresoxim–methyl and Trifloxystrobin Fungicides by HPLC with Diode Array Detection. *Food Addit. Contam.* **2005**, *22*, 549–556.
- Abuknesha, R. A.; Luk, C. Paraquat Enzyme–Immunoassays in Biological Samples: Assessment of the Effects of Hapten–Protein Bridge Structures on Assay Sensitivity. *Analyst* **2005**, *130*, 956–963.
- Adamczyk, M.; Buko, A.; Chen, Y. Y.; Fishpough, J. R.; Gebler, J. C. Characterization of Protein–Hapten Conjugates. 1. Matrix–Assisted Laser Desorption Ionization Mass Spectrometry of Immuno BSA–Hapten Conjugates and Comparison with Other Characterization Methods. *Bioconjugate Chem.* **1994**, *5*, 631–635.
- Adrian, J.; Pinacho, D. G.; Granier, B.; Diserens, J. M.; Sánchez–Baeza, F.; Marco, M. P. A Multianalyte ELISA for Immunochemical Screening of Sulfonamide, Fluoroquinolone and β –Lactam Antibiotics in Milk Samples Using Class–Selective Bioreceptors. *Anal. Bioanal. Chem.* **2008**, *391*, 1703–1712.
- Adrian, J.; Font, H.; Diserens, J. M.; Sánchez–Baeza, F.; Marco, M. P. Generation of Broad Specificity Antibodies for Sulfonamide Antibiotics and Development of an Enzyme–Linked Immunosorbent Assay (ELISA) for the Analysis of Milk Samples. *J. Agric. Food Chem.* **2009**, *57*, 385–394.

- AENSA (Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición). Planes Nacionales Específicos de Control Oficial. Programa de Plaguicidas en Alimentos de Origen Vegetal. Resultados Año 2009. **2011**.
[http://www.aensa.msps.es/AENSA/docs/docs/controloficial/planesnacionalesespecificos/Resultado 2009 plaguicidas.pdf](http://www.aensa.msps.es/AENSA/docs/docs/controloficial/planesnacionalesespecificos/Resultado%202009%20plaguicidas.pdf)
- Ahn, K. C.; Watanabe, T.; Gee, S. J.; Hammonck, B. D. Hapten and Antibody Production for a Sensitive Immunoassay Determining a Human Urinary Metabolite of the Pyrethroid Insecticide Permethrin. *J. Agric. Food Chem.* **2004**, *52*, 4583–4594.
- Ahn, K. C.; Lohstroh, P.; Gee, S. J.; Gee, N. A.; Lasley, B.; Hammock, B. D. High-Throughput Automated Luminescent Magnetic Particle-Based Immunoassay to Monitor Human Exposure to Pyrethroid Insecticides. *Anal. Chem.* **2007**, *79*, 8883–8890.
- Ahn, K. C.; Gee, S. J.; Tsai, H. J.; Bennett, D.; Nishioka, M. G.; Blum, A.; Fishman, E.; Hammock, B. D. Immunoassay for Monitoring Environmental and Human Exposure to the Polybrominated Diphenyl Ether BDE-47. *Environ. Sci. Technol.* **2009**, *43*, 7784–7790.
- Algar, W. R.; Tavares, A. J.; Krull, U. J. Beyond Labels: A Review of the Application of Quantum Dots as Integrated Components of Assays, Bioprobes, and Biosensors Utilizing Optical Transduction. *Anal. Chim. Acta* **2010**, *673*, 1–25.
- Alister, C.; Lopez, R.; Kogan, M. Simazine Dynamics in a Vineyard Soil at Casablanca Valley, Chile. *Pest. Manag. Sci.* **2005**, *61*, 1083–1088.
- Alvarez, M.; Calle, A.; Tamayo, J.; Lechuga, L. M.; Abad, A.; Montoya, A. Development of Nanomechanical Biosensors for Detection of the Pesticide DDT. *Biosens. Bioelectron.* **2003**, *18*, 649–653.
- Amat, M.; Ponzo, V.; Llor, N.; Bassas, O.; Escolano, C.; Bosch, J. Cyclocondensation Reactions of Racemic and Prochiral γ -Oxo-Acid Derivatives with (R)-Phenylglycinol. *ARKIVOC* **2003**, 69–81.
- Amijs, C.; Van Klink, G.; Van Koten, G. Carbon Tetrachloride Free Benzylic Brominations of Methyl Aryl Halides. *Green Chem.* **2003**, *5*, 470–474.
- Anastassiades, M.; Lehotay, S. J.; Stajnbaher, D.; Schenck, F. J. Fast and Easy Multiresidue Method Employing Acetonitrile Extraction/Partitioning and “Dispersive Solid-Phase Extraction” for the Determination of Pesticide Residues in Produce. *J. AOAC Int.* **2003**, *86*, 412–431.
- Anfossi, L.; Baggiani, C.; Giovannoli, C.; Giraudi, G. Homogeneous Immunoassay Based on Gold Nanoparticles and Visible Absorption Detection. *Anal. Bioanal. Chem.* **2009**, *394*, 507–512.
- Anfossi, L.; D’Arco, G.; Baggiani, C.; Giovannoli, C.; Giraudi, G. A lateral Flow Immunoassay for Measuring Ochratoxin A: Development of a Single System for Maize, Wheat and Durum Wheat. *Food Control* **2011**, *22*, 1965–1970.
- Anke, T.; Oberwinkler, F.; Steglich, W.; Schramm, G. The Strobilurins—New Antifungal Antibiotics from the Basidiomycetes *Strobilurus tenacellus* (Pers. ex Fr.) Sing. *J. Antibiot.* **1977**, *30*, 806–810.
- Anke, T.; Hecht, H. G.; Schramm, G.; Steglich, W. Antibiotics from Basidiomycetes. IX. Oudemansin, an Antifungal Antibiotic from *Oudemansiella mucida* (Scharader Ex Fr.) Hoehnel (Agaricales). *J. Antibiot.* **1979**, *32*, 1112–1117.

- Anke, T.; Besl, H.; Mocek, U.; Steglich, W. Antibiotics from Basidiomycetes. XVIII. Strobilurin C and Oudemansin B, Two New Antifungal Metabolites from *Xerula* species (Agaricales). *J. Antibiot.* **1983**, *36*, 661–666.
- Anke, T.; Werle, A.; Bross, M.; Steglich, W. Antibiotics from Basidiomycetes. XXXIII. Oudemansin X, a New Antifungal (*E*)- β -Methoxyacrylate from *Oudemansilla radicata* (Relhan ex Fr.) Sing. *J. Antibiotic.* **1990**, *43*, 1010–1011.
- Anke, T. The Antifungal Strobilurins and their Possible Ecological Role. *Can. J. Bot.* **1995**, *73*, 940–945.
- Anklam, E.; Stroka, J.; Boenke A. Acceptance of Analytical Methods for Implementation of EU Legislation with a Focus on Mycotoxins. *Food Control* **2002**, *13*, 173–183.
- APVMA (Australian Pesticides and Veterinary Medicines Authority). Evaluation of the New Active KRESOXIM–METHYL in the Product STROBY WG FUNGICIDE. *National Registration Authority for Agricultural and Veterinary Chemicals*, PO Box E240, Kingston ACT 2604 Australia. **2000a**.
<http://www.apvma.gov.au/registration/assessment/public/index.php>
- APVMA (Australian Pesticides and Veterinary Medicines Authority). Evaluation of the New Active TRIFLOXYSTROBIN in the Product FLINT FUNGICIDE. *National Registration Authority for Agricultural and Veterinary Chemicals*, PO Box E240, Kingston ACT 2604 Australia. **2000b**.
<http://www.apvma.gov.au/registration/assessment/public/index.php>
- Aargarate, N.; Arestin, M.; Ramón–Azcón, J.; Alfaro, B.; Barranco, A.; Sánchez–Baeza, F.; Marco, M. P. Evaluation of Immunoassays as an Alternative for the Rapid Determination of Pesticides in Wine and Grape Samples. *J AOAC Int.* **2010**, *93*, 2–11.
- Armarego, W. L.; Perrin, D. D. *Purification of Laboratory Chemicals*, 4th Ed. Armarego, W. L.; Perrin, D. D., Eds. Butterworth Heinemann Press: Oxford, **1996**.
- Arnone, A.; Bernardi, R.; Blasco, F.; Cardillo, R.; Resnati, G.; Gerus, I. I.; Kukhar, V. P. Trifluoromethyl vs. Methyl Ability to Direct Enantioselection in Microbial Reduction of Carbonyl Substrates. *Tetrahedron* **1998**, *54*, 2809–2818.
- Arrebola, F. J.; Martínez Vidal, J. L.; González–Rodríguez, M. J.; Garrido–Frenich, A.; Sánchez–Morito, N. Reduction of Analysis Time in Gas Chromatography: Application of Low–Pressure Gas Chromatography–Tandem Mass Spectrometry to the Determination of Pesticide Residues in Vegetables. *J. Chromatogr., A* **2003**, *1005*, 131–141.
- Assercq, J.M.; Schneiner, H.D.; Pflfner, A.; Plaff, W. Process for the Preparation of O–Chloromethyl–Phenylglyoxylic Acid Derivates. US5756811. **1998**.
- Avrameas, S.; Uriel, J. Méthode de Marquage d'Antigènes et d'Anticorps avec des Enzymes et son Application en Immuno–Diffusion. *C. R. Acad. Sci.* **1966**, *262*, 2543–2545.
- Balba, H. Review of Strobilurin Fungicide Chemicals. *J. Environ. Sci. Health, Part B* **2007**, *42*, 441–451.
- Ballesteros, B.; Barceló, D.; Sánchez–Baeza, F.; Camps, F.; Marco, M. P. Influence of the Hapten Design on the Development of a Competitive ELISA for the Determination of the Antifouling Agent Irgarol 1051 at Trace Levels. *Anal. Chem.* **1998**, *70*, 4004–4014.
- Banerjee, K.; Ligon, A. P.; Spitteller, M. Environmental Fate of Trifloxystrobin in Soils of Different Geographical Origins and Photolytic Degradation in Water. *J. Agric. Food Chem.* **2006**, *54*, 9479–9487.

- Bao, H.; Fang, S.; Liu, Z.; Shi, H.; Ye, Y.; Wang, M. Development of an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for the Rapid Detection of Haloxyfop-P-Methyl. *J. Agric. Food Chem.* **2010**, *58*, 8167–8170.
- Baran, E. J. La Nueva Farmacoterapia Inorgánica. XIV. Compuestos Orgánicos Fluorados. *Acta Farm. Bonaerense* **1992**, *11*, 103–110.
- Barrachina R.; Coscollá, R.; Badía, V.; Fabado F. Lucha contra el Oídio y Mildiu de la Vid con Estrobilurinas. *Portada Agraria* **1999**, 48–58.
- Bartlett, D. W.; Clough, J. M.; Godfrey, C. R. A.; Godwin, J. R.; Hall, A. A.; Heaney, S. P.; Maund, S. J. Understanding the Strobilurin Fungicides. *Pesticide Outlook* **2001**, *12*, 143–148.
- Bartlett, D.W.; Clough, J.M.; Godwin, J.R.; Hall, A. A.; Hamer, M.; Parr-Dobrzanski, B. The Strobilurin Fungicides. *Pest. Manag. Sci.* **2002**, *58*, 649–662.
- Bayer. Bayer Annual Report 2010. **2010**.
<http://www.annualreport2010.bayer.com/en/cropscience.aspx>
- Beebe, X.; Nilius, A.; Merta, P.; Soni, N.; Bui, M.; Wagner, R.; Beutel, B. Synthesis and SAR Evaluation of Oxadiazolopyrazines as Selective Haemophilus influenzae Antibacterial Agents. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2003**, *13*, 3133–3136.
- Beier, R.C.; Staker, L.H. 4,4'-Dinitrocarbanilide Hapten Development Utilizing Molecular Models. *Anal. Chim. Acta* **1998**, *376*, 139–143.
- Beier, R. C.; Ripley, L. H.; Young, C. R.; Kaiser, C. M. Production, Characterization, and Cross-Reactivity Studies of Monoclonal Antibodies against the Coccidiostat Nicarbazin. *J. Agric. Food Chem.* **2001**, *49*, 4542–4552.
- Bekheit, H. K. M.; Lucas, A. D.; Szurdoki, F.; Gee, S. J.; Hammock, B. D. An Enzyme Immunoassay for the Environmental Monitoring of the Herbicide Bromacil. *J. Agric. Food Chem.* **1993**, *41*, 2220–2227.
- Bennetau-Pelissero, C.; Le Houérou, C.; Lamothe, V.; Le Menn, F. Synthesis of Haptens and Conjugates for ELISAs of Phytoestrogens. Development of the Immunological Tests. *J. Agric. Food Chem.* **2000**, *48*, 305–311.
- Beyer, A.; Biziuk, M. Methods for Determining Pesticides and Polychlorinated Biphenyls in Food Samples—Problems and Challenges. *Crit. Rev. Food Sci.* **2008**, *48*, 888–904.
- Biswas; B.; Venkateswaran, R. V. Synthesis of Sporochinol A, a Marine Fish Deterrent. *Synth. Commun.* **2005**, *35*, 1769–1779.
- Boden, N.; Bushby, R. J.; Liu, Q.; Evans, S. D.; Jenkins, A.; Knowles, P. F.; Miles, R. E. *N,N'*-Disuccinimidyl Carbonate as a Coupling Agent in the Synthesis of Thiophospholipids Used for Anchoring Biomembranes to Gold Surfaces. *Tetrahedron* **1998**, *54*, 11537–11548.
- Bonneau, P.; Deroy, P. Alkynyl Compounds as Non Nucleoside Reverse Transcriptase Inhibitors. US7300948. **2006**.
- Bourne, A.; Roy, S.; Wiley, J. L.; Martin, B. R.; Thomas, B. F.; Mahadevan, A.; Razdan, R. K. Novel, Potent THC/Anandamide (Hybrid) Analogs. *Bioorg. Med. Chem.* **2007**, *15*, 7850–7864.
- Brady, J. F.; Turner, J.; Skinner, D. Application of a Triasulfuron Enzyme Immunoassay to the Analysis of Incurred Residues in Soil and Water Samples. *J. Agric. Food Chem.* **1995**, *43*, 2542–2547.

- Bravo, J. C.; Garcinuno, R. M.; Fernández, P.; Durand, J. S. Selective Solid–Phase Extraction of Ethynylestradiol from River Water by Molecularly Imprinted Polymer Microcolumns. *Anal. Bioanal. Chem.* **2009**, *393*, 1763–1768.
- Breen, L. E.; Schepp, N. P.; Edmund Tan, C. H. Photochemical Generation and ¹H NMR Detection of Alkyl Allene Oxides in Solution. *Can. J. Chem.* **2005**, *83*, 1347–1351.
- Brun, E. M.; Garcés–García, M.; Puchades, R.; Maquieira, A. Enzyme–Linked Immunosorbent Assay for the Organophosphorus Insecticide Fenthion. Influence of Hapten Structure. *J. Immunol. Methods* **2004**, *295*, 21–35.
- Brun, E. M.; Garcés–García, M.; Puchades, R.; Maquieira, A. Highly Sensitive Enzyme–Linked Immunosorbent Assay for Chlorpyrifos. Application to Olive Oil Analysis. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53*, 9352–9360.
- Buchanan, M. S.; Steglich, W.; Anke, T. Strobilurin N and Two Metabolites Related to Chorismic Acid from the Fruit Bodies of *Mycena crocata* (Agaricales). *Z. Naturforsch. C.* **1999**, *54*, 463–468.
- Cabras, P.; Angioni, A.; Garau, V.L.; Pirisi, R.M.; Brandolini, V. Gas Chromatographic Determination of Azoxystrobin, Fluazinam, Kresoxim–methyl, Mepanipyrim, and Tetraconazole in Grapes, Must, and Wine. *J. AOAC. Int.* **1998**, *81*, 1185–1189.
- Campillo, N.; Vinas, P.; Aguinaga, N.; Ferez, G.; Hernandez–Cordoba, M. Stir Bar Sorptive Extraction Coupled to Liquid Chromatography for the Analysis of Strobilurins Fungicides in Fruit Samples. *J. Chromatogr., A* **2010**, *1217*, 4529–2534.
- Cao, L.; Kong, D.; Sui, J.; Jiang, T.; Li, Z.; Ma, L.; Lin, H. Broad–Specific Antibodies for a Generic Immunoassay of Quinolone: Development of a Molecular Model for Selection of Haptens Based on Molecular Field–Overlapping. *Anal. Chem.* **2009**, *81*, 3246–3251.
- Carlomagno, M.; Mathó, C.; Cantou, G.; Sanborn, J. R.; Last, J. A.; Hammock, B. D.; Roel, A.; González, D.; González–Sapienza, G. A Clomazone Immunoassay To Study the Environmental Fate of the Herbicide in Rice (*Oryza sativa*) Agriculture. *J. Agric. Food Chem.* **2010**, *58*, 4367–4371.
- Casino, P.; Morais, S.; Puchades, R.; Maquieira, A. Evaluation of Enzyme–Linked Immunoassays for the Determination of Chloroacetanilides in Water and Soils. *Environ. Sci. Technol.* **2001**, *35*, 4111–4119.
- Caturla, F.; Jiménez, J–M; Godessart, N.; Amat, M.; Cárdenas, A.; Soca, L.; Beleta, J.; Ryder, H.; Crespo, M. Synthesis and Biological Evaluation of 2–Phenylpyran–4–ones: A New Class of Orally Active Cyclooxygenase–2 Inhibitors. *J. Med. Chem.* **2004**, *47*, 3874–3886.
- Cháfer–Pericás, C.; Maquieira, A.; Puchades, R.; Miralles, J.; Moreno, A. Fast Screening Immunoassay of Sulfonamides in Commercial Fish Samples. *Anal. Bioanal. Chem.* **2010**, *396*, 911–921.
- Chacón–García, L.; Martínez, R. Synthesis and *in vitro* Cytotoxic Activity of Pyrrolo[2,3–e]indole Derivatives and a Dihydro Benzoinidole Analogue. *Eur. J. Med. Chem.* **2002**, *37*, 261–266.
- Chen, X.; Kremmer, E.; Gouzy, M. F.; Clausen, E.; Starke, M.; Wöllner, K.; Pfister, G.; Hartmann, A.; Krämer, P. M. Development and Characterization of Rat Monoclonal Antibodies for N–Acylated Homoserine Lactones. *Anal. Bioanal. Chem.* **2010**, *398*, 2655–2667.

- Chinchilla, R.; Najera, C. The Sonogashira Reaction: A Booming Methodology in Synthetic Organic Chemistry. *Chem. Rev.* **2007**, *107*, 874–922.
- Christensen, H. B.; Granby, K. Method Validation of Strobilurin Fungicides in Cereals and Fruit. *Food Addit. Contam.*, **2001**, *18*, 866–874.
- Cliquet, P.; Cox, E.; Haasnoot, W.; Schacht, E.; Goddeeris, B. M. Generation of Group-Specific Antibodies Against Sulfonamides. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, *51*, 5835–5842.
- Clive, D. J. L.; Wang, J. Synthesis of (+/–)-Hamigeran B, (–)-Hamigeran B, and (+/–)-1-epi-Hamigeran B: Use of Bulky Silyl Groups to Protect a Benzylic Carbon–Oxygen Bond from Hydrogenolysis. *J. Org. Chem.* **2004**, *69*, 2773–2784.
- Clough, J. M. The Strobilurins, Oudemansins, and Myxothiazols, Fungicidal Derivatives of β -Methoxyacrylic Acid. *Nat. Prod. Rep.* **1993**, *10*, 565–574.
- Clough, J. M.; Dube, H.; Martin, B. J.; Pattenden, G.; Reddy, K. S.; Waldron, I. R. Total Synthesis of Myxothiazols, Novel Bis-Thiazole β -Methoxyacrylate Based Anti-Fungal Compounds from Myxobacteria. *Org. Biomol. Chem.* **2006**, *4*, 2906–2911.
- Codex Alimentarius. Manual de procedimiento 20° Ed. **2011**.
http://www.codexalimentarius.net/web/procedural_manual_es.jsp
- Cotton, F. A.; Wilkinson, G. *Advanced Inorganic Chemistry*, 3rd ed.; Interscience: New York, pp 728–769. 1972.
- Coulter, C.; Tuyay, J.; taruc, M.; Moore, C. Semi-Quantitative Analysis of Drugs of Abuse, Including Tetrahydrocannabinol in Hair Using Aqueous Extraction and Immunoassay. *Forensic Sci. Int.* **2010**, *196*, 70–73.
- Crotti, P.; Di Bussolo, V.; Favero, L.; Macehla, F.; Plneschi, M.; Napolitano, E. Regio- and Stereoselectivity in the Cyclization of Enolates Derived from 4,5-, 5,6-, and 6,7-Epoxy-1-phenyl-1-alkanones. Competition Between C- and O-Alkylation. *Tetrahedron* **1999**, *55*, 5853–5866.
- Cui, Y.; Nan, T.; Tan, G.; Li, Q. X.; Wang, B.; Liu, S. Production of Monoclonal Antibody to Herbicide Fenoxaprop-ethyl. *Hybridoma (Larchmt)*. **2011**, *30*, 463–467.
- Daferner, M.; Anke, T.; Hellwig, V.; Steglich, W.; Sterner, O. Strobilurin M, Tetrachloropyrocatechol and Tetrachloropyrocatechol Methyl Ether: New Antibiotics from a *Mycena* species. *J. Antibiot.* **1998**, *51*, 816–822.
- Dankwardt, A. Immunochemical Assays in Pesticide Analysis. *Encyclopedia of Analytical Chemistry* **2001**, 1–27.
- De Fraine, P. J.; Martín, A. Fungicidas. ES2118769–T3. **1989**.
- De Fraine, P. J.; Bowden, M.; McNeilly, P. Chemical Process. GB2305174. **1997**.
- Degelmann, P.; Wenger, J.; Niessner, R.; Knopp, D. Development of a Class-Specific ELISA for Sulfonylurea Herbicides (Sulfuron Screen). *Environ. Sci. Technol.* **2004**, *38*, 6795–6802.
- Deschamps, R. A. J.; Hall, J. C.; McDermott, M. R. Polyclonal and Monoclonal Enzyme Immunoassays for Picloram Detection in Water, Soil, Plants, and Urine. *J. Agric. Food Chem.* **1990**, *38*, 1881–1886.
- Devadas, B.; Adams, S. P.; Gordon, J. I. Synthesis of Novel Tritium Labeled Oxamyristic Acids. *J. Labelled Comp. Rad.* **1991**, *29*, 157–164.

- Dewen, T.; Yang, H.; Jinyi, W. Recent Advances in the Synthesis of Artificial Antigen and Its Application in the Detection of Pesticide Residue. *Am. J. Agri. & Bio. Sci.* **2007**, *2*, 88–93.
- Díaz–González, M.; González–García, M. B.; Costa–García, A. Recent Advances in Electrochemical Enzyme Immunoassays. *Electroanalysis* **2005**, *17*, 1901–1918.
- Dueno, E., Chu, F., Kim, S.–I., & Jung, K. Cesium Promoted O–Alkylation of Alcohols for the Efficient Ether Synthesis. *Tetr. Lett.* **1999**, *40*, 1843–1846.
- Ebeling, M.; Heimann, K. G.; Schoefer, S.; Sonder, K. The Human and Environmental Safety Aspects of Trifloxystrobin. *Pflanzenschutz–Nachrichten Bayer* **2003**, *56*, 231–245.
- EC (European Commission). Review Report for the Active Substance Kresoxim–methyl. 7583/VI/97–Final. **1998**.
http://ec.europa.eu/food/plant/protection/evaluation/new_subs_rep_en.print.htm
- EC (European Commission). Review Report for the Active Substance Trifloxystrobin. SANCO/4339/2000–Final. **2003**.
http://ec.europa.eu/food/plant/protection/evaluation/new_subs_rep_en.print.htm
- EC (European Commission). Monitoring of Pesticide Residues in Products of Plant Origin in the European Union, Norway, Iceland and Liechtenstein 2006. Noviembre **2008**.
http://ec.europa.eu/food/fvo/specialreports/pesticides_index_en.htm
- EFSA (European Food Safety Authority). Statement of EFSA on Risks for Public Health Due to the Presences of Melamine in Infant Milk and Other Milk Products in China. *EFSA Journal* **2008**, *807*, 1–10.
- EFSA (European Food Safety Authority). 2007 Annual Report on Pesticide Residues. *EFSA Scientific Report* **2009**, *305*, 1–106.
- EFSA (European Food Safety Authority). Conclusion on the Peer Review of the Pesticide Risk Assessment of the Active Substance Kresoxim–methyl. *EFSA Journal* **2010a**, *8*, 1891 (88 pp).
- EFSA (European Food Safety Authority). 2008 Annual Report on Pesticide Residues. *EFSA Journal* **2010b**, *8*, 1646 (442 pp).
- EFSA (European Food Safety Authority). 2009 Annual Report on Pesticide Residues. *EFSA Journal* **2011**, *9*, 2430 (529 pp).
- Eisen, M. B.; Spellman, P. T.; Brown, P. O.; Botstein, D. Cluster Analysis and Display of Genome–Wide Expression Patterns. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1998**, *95*, 14863–14868.
- El–Gendy, K. S.; Aly, N. M.; Mosallam, E. M.; Salama, A. K. Preparation of Antibodies and Development of an Enzyme Immunoassay for Determination of Atrazine in Environmental Samples. *J. Environ. Sci. Health B.* **2011**, *46*, 321–327.
- Ellmark, P.; Högerkorp, C. M.; Ek, S.; Belov, L.; Berglund, M.; Rosenquist, R.; Christopherson, R. I.; Borrebaeck, C. A. Phenotypic Protein Profiling of Different B Cell Sub–Populations Using Antibody CD–Microarrays. *Cancer Lett.* **2008**, *265*, 98–106.
- Engler, M.; Anke, T.; Klostermeyer, D.; Steglich, W. Hydroxystrobilurin A, a New Antifungal (E)– β –Methoxyacrylate from a *Pterula* species. *J. Antibiot.* **1995**, *48*, 884–885.
- Engvall, E.; Perlmann, P. Enzyme–Linked Labelled Immunosorbent, Assay (ELISA). III. Quantitation of Specific Antibodies by Enzyme Labelled Antiimmunoglobulin in Antigen–Coated Tubes. *J. Immunol. Meth.* **1971**, *10*, 161–170.

- EPA (Environmental Protection Agency). Kresoxim–methyl. Pesticide Fact Sheet. **1998**.
[http:// www.epa.gov/opprd001/factsheets/kresoxim.pdf](http://www.epa.gov/opprd001/factsheets/kresoxim.pdf)
- EPA (Environmental Protection Agency). Trifloxystrobin. Pesticide Fact Sheet. **1999**
<http://www.epa.gov/opprd001/factsheets/trifloxystrobin.pdf>
- Ercegovich, C. D. Analysis of Pesticide Residues: Immunological Techniques. *Pesticides Identification*, American Chemical Society: Washington, D. C. **1971**, 104, 162–178.
- Ercegovich, C.D.; Vallejo, R.P.; Gettig, R.R.; Woods, L.; Bogus, E.R.; Mumma, R.O. Development of a Radioimmunoassay for Parathion. *J. Agric. Food Chem.* **1981**, 29, 559–563.
- Eremin, S. A; Smith, D. S. Fluorescence Polarization Immunoassays for Pesticides. High Throughput Screening. *Comb. Chem.* **2003**, 6, 257–266.
- Esteve–Turrillas, F.; Parra, J.; Abad–Fuentes, A.; Agulló, C.; Abad–Somovilla, A.; Mercader, J. V. Hapten Synthesis, Monoclonal Antibody Generation, and Development of Competitive Immunoassays for the Analysis of Picoxystrobin in Beer. *Anal. Chim. Acta* **2010**, 682, 93–103.
- Esteve–Turrillas, F. A.; Abad–Fuentes, A.; Mercader, J. V. Determination of Fenhexamid Residues in Grape Must, Kiwifruit, and Strawberry Samples by Enzyme–Linked Immunosorbent Assay. *Food Chem.* **2011a**, 124, 1727–1733.
- Esteve–Turrillas, F. A.; Mercader, J. V.; Agulló, C.; Abad–Somovilla, A.; Abad–Fuentes, A. Development of Immunoaffinity Columns for Pyraclostrobin Extraction from Fruit Juices and Analysis by Liquid Chromatography with UV Detection. *J. Chromatogr., A* **2011b**, 1218, 4902–4909.
- Estévez–Alberola, M. C.; Marco, M. P. Immunochemical Determination of Xenobiotics with Endocrine Disrupting Effects. *Anal. Bioanal. Chem.* **2004**, 378, 563–575.
- Estévez, M. C.; Kreuzer, M.; Sánchez–Baeza, F.; Marco, M. P. Analysis of Nonylphenol: Advances and Improvements in the Immunochemical Determination Using Antibodies Raised Against the Technical Mixture and Hydrophilic Immunoreagents. *Environ. Sci. Technol.* **2006**, 40, 559–568.
- Estévez, M. C.; Galve, R.; Sánchez–Baeza, F.; Marco, M. P. Disulfide Symmetric Dimers as stable pre–Hapten forms for Bioconjugation: a Strategy to Prepare Immunoreagents for the Detection of Sulfophenyl Carboxylate Residues in Environmental Samples. *Chemistry* **2008**, 14, 1906–1917.
- Famulok, M.; Hartig, J.S.; Mayer, G. Functional Aptamers and Aptazymes in Biotechnology, Diagnostics, and Therapy. *Chem. Rev.* **2007**, 107, 3715–3743.
- Fan, A. P.; Cao, Z. J.; Li, H. A.; Kai, M.; Lu, J. Z. Chemiluminescence Platforms in Immunoassay and DNA Analyses. *Anal. Sci.* **2009**, 25, 587–597.
- Fang, S.; Zhang, B.; Ren, K. W.; Cao, M. M.; Shi, H. Y.; Wang, M. H. Development of a Sensitive Indirect Competitive Enzyme–Linked Immunosorbent Assay (ic–ELISA) Based on the Monoclonal Antibody for the Detection of the Imidacloprid Residue. *J. Agric. Food Chem.* **2011**, 59, 1594–1597.
- FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación). Manual "Buenas prácticas agrícolas para la agricultura familiar". Plan departamental de la seguridad alimentaria y nutricional. Proyecto TCP/3101/COL–UFT/COL/027/COL, **2007**.

- Fatori, D.; Hunter, W. M. Radioimmunoassay for Serum Paraquat. *Clin. Chim. Acta* **1980**, *100*, 81–90.
- Fernández-Alba, A. R.; Valverde, A.; Aguera, A.; Contreras, M.; Rodriguez, D. Determination of Procyimdone in Vegetables by a Commercial Competitive Inhibition Enzyme Immunoassay. *Anal. Chim. Acta* **1995**, *311*, 371–376.
- Ferrer, I.; Thurman, E. M. Multi-Residue Method for the Analysis of 101 Pesticides and their Degradates in Food and Water Samples by Liquid Chromatography/Time-of-Flight Mass Spectrometry. *J. Chromatogr., A* **2007**, *1175*, 24–37.
- Fodey, T.; Leonard, P.; O'Mahony, J.; O'Kennedy, R.; Danaher, M. Developments in the Production of Biological and Synthetic Binders for Immunoassay and Sensor-Based Detection of Small Molecules. *Trends in Anal. Chem.* **2011**, *30*, 254–269.
- Font, H.; Adrian, J.; Galve, R.; Estévez, M. C.; Castellari, M.; Gratacós-Cubarsí, M.; Sánchez-Baeza, F.; Marco, M. P. Immunochemical Assays for Direct Sulfonamide Antibiotic Detection In Milk and Hair Samples Using Antibody Derivatized Magnetic Nanoparticles. *J. Agric. Food Chem.* **2008**, *56*, 736–743.
- Fontana, A. R.; Rodríguez, I.; Ramil, M.; Altamirano, J. C.; Cela, R. Liquid Chromatography Time-of-Flight Mass Spectrometry Following Sorptive Microextraction for the Determination of Fungicide Residues in Wine. *Anal. Bioanal. Chem.* **2011**, *401*, 767–775.
- Forysth, C.; Xu, J.; Nguyen, S.; Samdal, I.; Briggs, L. R.; Rundberget, T.; Sandvik, M.; Miles, C. O. Antibodies with Broad Specificity to Azaspiracids by Use of Synthetic Haptens. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128*, 15114–15116.
- Fredenhagen, A.; Kuhn, A.; Peter, H. H.; Cuomo, V.; Giuliano, U. Strobilurins F, G and H, Three New Antifungal Metabolites from *Bolinea lutea*. I. Fermentation, Isolation and Biological Activity. *J. Antibiot.* **1990a**, *43*, 655–660.
- Fredenhagen, A.; Hug, P.; Peter, H.H. Strobilurins F, G y H, Three New Antifungal Metabolites from *Bolinea lutea*. II. Structure Determination. *J. Antibiot.* **1990b**, *43*, 661–667.
- Gabaldon, J. A.; Maquierira, A.; Puchades, R. Development of a simple extraction procedure for chlorpyrifos determination in food samples by immunoassay. *Talanta* **2007**, *71*, 1001–1010.
- Galve, R.; Sánchez-Baeza, F.; Camps, F.; Marco, M. P. Indirect Competitive Immunoassay for Trichlorophenol Determination. Rational Evaluation of the Competitor Heterology Effect. *Anal. Chim. Acta* **2002a**, *452*, 191–206.
- Galve, R.; Nichkova, M.; Camps, F.; Sanchez-Baeza, F.; Marco, M. P. Development and Evaluation of an Immunoassay for Biological Monitoring Chlorophenols in Urine as Potential Indicators of Occupational Exposure. *Anal. Chem.* **2002b**, *74*, 468–478.
- Garcés-García, M.; Morais, S.; González-Martínez, M. A.; Puchades, R.; Maquieira, A. Rapid Immunoanalytical Method for the Determination of Atrazine Residues in Olive Oil. *Anal. Bioanal. Chem.* **2004**, *378*, 484–489.
- Garet, E.; González-Fernández, A.; Lago, J.; Vieites, J. M.; Cabado, A. G. Comparative Evaluation of Enzyme-Linked Immunoassay and Reference Methods for the Detection of Shellfish Hydrophilic Toxins in Several Presentations of Seafood. *J. Agric. Food Chem.* **2010**, *58*, 1410–1415.

- Garrido Frenich, A.; Fernández Moreno, J. L.; Martínez Vidal, J. L.; Arrebola Liébanas, F.J. Application of Gas Chromatography Coupled to Triple Quadrupole Mass Spectrometry for the Multiresidue Analysis of Pesticides in Olive Oil. *J. Agric. Food Chem.* **2007**, *55*, 8346–8352.
- Gasel, J. A.; Borer, P. N. NMR Studies of Flexible Opiate Conformations at Monoclonal–Antibody Binding Sites. 1. Transferred Nuclear Overhauser Effects Show Bound Conformations. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1986**, *141*, 1267–1273.
- Girotti, S.; Maiolini, E.; Ghini, S.; Ferri, E.; Fini, F. Quantification of Thiram in Honeybees: Development of a Chemiluminescent ELISA. *Anal. Lett.* **2008**, *41*, 46–55.
- Girotti, S.; Eremin, S.; Montoya, A.; Moreno, M. J.; Caputo, P.; D'Elia, M.; Ripani, L.; Romolo, F. S.; Maiolini, E. Development of a Chemiluminescent ELISA and a Colloidal Gold–Based LFIA for TNT Detection. *Anal. Bioanal. Chem.* **2010**, *396*, 687–695.
- Giza, I.; Sztwiertnia, U. Gas Chromatographic Determination of Azoxystrobin and Trifloxystrobin Residues in Apples. *Acta Chromatogr.* **2003**, *13*, 226–229.
- González–Álvarez, M.; Noguero–Pato, R.; González–Barreiro, C.; Cancho–Grande, B.; Simal–Gándara, J. Changes of the Sensorial Attributes of White Wines with the Application of New Anti–Mildew Fungicides under Critical Agricultural Practices. *Food Chem.* **2012**, *130*, 139–146.
- González–Tejera, A.; Varell, L.; Last, J. A.; Hammock, B. D.; González–Sapienza, G. Phage Anti–Immune Complex Assay: General Strategy for Non Competitive Immunodetection of Small Molecules. *Anal. Chem.* **2007**, *79*, 7799–7806.
- Gooßen, L. Pd–catalyzed Synthesis of Arylacetic Acid Derivatives from Boronic Acids. *Chem. Commun.* **2001**, *7*, 669–670.
- Goodrow, M. H.; Sanborn, J. R.; Stoutamire, D. W.; Gee, S. J.; Hammock, B. D. Strategies for Immunoassay Hapten Design. *Immunoanalysis of Agrochemicals* **1995**, Capítulo 9, pp 119–139.
- Goodrow, M. H.; Hammock, B. D. Hapten Design for Compound–Selective Antibodies: ELISAS for Environmentally Deleterious Small Molecules. *Anal. Chim. Acta* **1998**, *376*, 83–91.
- Goryancheva, I. Y.; Rusanova, T. Y.; Burmistrova, N. A.; Saeger, S. Immunochemical Methods for the Determination of Mycotoxins. *J. Anal. Chem.* **2009**, *64*, 768–785.
- Gosh, A. T.; Duong, T. T.; McKee, S. P.; & Thompson, W. J. *N,N'*–Succinimidyl Carbonate: A Useful Reagent for Alkoxyacylation of Amines. *Tetrahedron Lett.* **1992**, *33*, 2781–2784.
- Grammenos, W.; Steglich, W.; Oberdorf, K.; Mueller, B.; Sauter, H.; Doetzer, R. Preparation of 4–Alkanoylaryl Benzyl Esters. US5430172. **1995**.
- Gray, J. C.; Corran, P. H.; Mangia, E.; Gaunt, M. W.; Li, Q.; Tetteh, K. K.; Polley, S. D.; Conway, D. J.; Holder, A. A.; Bacarese–Hamilton, T.; Riley, E. M.; Crisanti, A. Profiling the Antibody Immune Response Against Blood Stage Malaria Vaccine Candidates. *Clin Chem.* **2007**, *53*, 1244–1253.
- Gueguen, F.; Boisdé, F.; Queffelec, A–L; Haelters, J–P; Thouvenot, D.; Corbel, B.; Nodet, P. Hapten Synthesis for the Development of a Competitive Inhibition Enzyme–Immunoassay for Thiram. *J. Agric. Food Chem.* **2000**, *48*(10), 4492–4499.
- Gullino, M. L.; Leroux, P.; Smith, C. M. Uses and Challenges of Novel Compounds for Plant Disease Control. *Crop. Prot.* **2000**, *19*, 1–11

- Hammock, B. D.; Mumma, R. O. Potential of Immunochemical Technology for Pesticide Analysis. *Pesticide Analytical Methodology*, American Chemical Society: Washington D. C. **1980**, *136*, 321–352.
- Han, M. K.; Oh, Y. H.; Kang, J.; Kim, Y. P.; Seo, S.; Kim, J.; Park, K.; Kim, H. S.; Protein Profiling in Human Sera for Identification of Potential lung Cancer Biomarkers Using Antibody Microarray. *Proteomics* **2009**, *9*, 5544–5552.
- Hao, X. L.; Kuang, H.; Li, Y. L.; Yuan, Y.; Peng, C. F.; Chen, W.; Wang, L. B.; Xu, C. L. Development of an Enzyme-Linked Immunosorbent assay for the Alpha-Cyano Pyrethroids Multiresidue in Tai Lake Water. *J. Agric. Food Chem.* **2009**, *57*, 3033–3039.
- Harlow, E.; Lane, D. *Antibodies. A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory: Cold Spring Harbor, **1988**.
- Harrison-Robert, O.; Goodrow, M. H.; Gee, S. J.; Hammock, B. D. Hapten Synthesis for Pesticide Immunoassay Development. In *Immunoassay or Trace Chemical Analysis*, American Chemical Society: Washington, D. C. **1990**; Vol. 451, pp 14–27.
- Haselhorst, T.; Espinosa, J. F.; Jiménez-Barbero, J.; Haselhorst, T.; Espinosa, J.; Sokolowski, T. NMR Experiments Reveal Distinct Antibody-Bound Conformations of a Synthetic Disaccharide Representing a General Structural Element of Bacterial Lipopolysaccharide Epitopes. *Biochem.* **1999**, *38*, 6449–6459.
- Hercegová, A.; Dömötöróvá, M.; Kruzlicová, D.; Matisová, E. Comparison of Sample Preparation Methods Combined with Fast Gas Chromatography – Mass Spectrometry for Ultratrace Analysis of Pesticide Residues in Baby Food. *J. Sep. Sci.* **2006**, *29*, 1102–1109.
- Hermanson, G. T. *Bioconjugate Techniques*. Academic Press: San Diego, **1996**.
- Herranz, S.; Ramón-Azcón, J.; Benito-Peña, E.; Marazuela, M. D.; Marco, M. P.; Moreno-Bondi, M. C. Preparation of Antibodies and Development of a Sensitive Immunoassay with Fluorescence Detection for Triazine Herbicides. *Anal. Bioanal. Chem.* **2008**, *391*, 1801–1812.
- Hilderbrand, S. A.; Kelly, K. A.; Niedre, M.; Weissleder, R. Near Infrared Fluorescence-Based Bacteriophage Particles for Ratiometric pH Imaging. *Bioconjugate Chem.* **2008**, *19*, 1635–1639.
- Hill, A. S.; Skerritt, J. H.; Bushway, R. J.; Pask, W.; Larkin, K. A.; Thomas, M.; Korth, W.; Bowmer, K. Development and Application of Laboratory and Field Immunoassays for Chlorpyrifos in Water and Soil Matrices. *J. Agric. Food Chem.* **1994**, *42*, 2051–2058.
- Holthues, H.; Pfeifer-Fukumura, U.; Sound, I.; Baumann, W. Evaluation of the Concept of Heterology in a Monoclonal Antibody-Based ELISA utilizing Direct Linkage to Polystyrene Microtiter Plates. *J. Immunol. Methods* **2005**, *304*, 68–77.
- Holtzapple, C. K.; Carlin, R. I.; Rose, B. G.; Kubena, L. F.; Stanker, L.H. Characterization of Monoclonal Antibodies to Aflatoxin mi and Molecular Modeling Studies of related Aflantoxins. *Mol. Immunol.* **1996**, *33*, 939–946.
- Holtzapple, C. K.; Buckley, S. A.; Stanker, L. H. Production and Characterization of Monoclonal Antibodies against Sarafloxacin and Cross-Reactivity Studies of Related Fluoroquinolones. *J. Agric. Food Chem.* **1997**, *45*, 1984–1990.
- Hoshino, Y.; Kodama, T.; Okahata, Y.; Shea, K. J. Peptide Imprinted Polymer Nanoparticles: A Plastic Antibody. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 15242–15243.

- Hosokawa, N.; Momose, I.; Sekizawa, R.; Naganawa, H.; Linuma, H.; Takeuchi, T.; Matsui, S. New Strobilurins O and P from a Mushroom. *J. Antibiot.* **2000**, *53*, 297–300.
- Hu, Y.; Shen, G.; Zhu, H.; Jiang, G. A. A Class-Specific Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Based on Magnetic Particles for Multiresidue Organophosphorus Pesticides. *J. Agric. Food Chem.* **2010**, *58*, 2801–2806.
- Hungerford, N. L.; McKinney, A. R.; Stenhouse, A. M.; McLeod, M.D. Selective Manipulation of Steroid Hydroxyl Groups with boronate Esters: Efficient Access to Antigenic C-3 Linked Steroid-Protein Conjugates and Steroid Sulfate Standards for Drug Detection. *Org. Biomol. Chem.* **2006**, *4*, 3951–3959.
- Hunter, K.W.; Lenz, D.E. Detection and Quantification of the Organophosphate Insecticide Paraoxon by Competitive Inhibition Enzyme Immunoassay. *Life Sci.* **1982**, *30*, 355–361.
- Isak, H.; Keil, M.; Wolf, B.; Wingert, H. Preparation of E-Oxime Ethers of Phenylglyoxylic Esters. US5354883. **1994**.
- Isenring, H. P.; Drechsel-Weiss, B. Productos Intermedios para la Obtención de Oximéteres. ES2192722-T3. **1990**.
- Jansson, C.; Pihlström, T.; Österdahl, B-G.; Markides, K. E. A New Multi-Residue Method for Analysis of Pesticide Residues in Fruit and Vegetables Using Liquid Chromatography with Tandem Mass Spectrometric Detection. *J. Chromatogr., A* **2004**, *1023*, 93–104.
- Jaworski, J. W.; Raorane, D.; Huh, J. H.; Manjumdar, A.; Lee, S. W. Evolutionary Screening of Biomimetic Coatings for Selective Detection of Explosives. *Langmuir* **2008**, *24*, 4938–4943.
- Jiménez, V.; Adrian, J.; Guiteras, J.; Marco, M. P.; Companyó, R. Validation of an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Detecting Sulfonamides in Feed Resources. *J. Agric. Food Chem.* **2010**, *58*, 7526–7531.
- JMPR (Joint Meeting on Pesticide Residues (FAO/WHO)). Kresoxim-methyl. *JMPR n° 199 Report and Evaluation.* **1998**.
<http://www.fao.org/agriculture/crops/core-themes/theme/pests/pm/lpe/lpe-k/en/>
- JMPR (Joint Meeting on Pesticide Residues (FAO/WHO)). Kresoxim-methyl. *JMPR n° 199 Report and Evaluation.* **2001**.
<http://www.fao.org/agriculture/crops/core-themes/theme/pests/pm/lpe/lpe-k/en/>
- JMPR (Joint Meeting on Pesticide Residues (FAO/WHO)). Trifloxystrobin Residues. *JMPR n° 213 Report and Evaluation.* **2004**.
<http://www.fao.org/agriculture/crops/core-themes/theme/pests/pm/lpe/lpe-t/en/>
- Johnson, M. A.; Pinto, B. M. NMR spectroscopic and Molecular Modeling Studies of Protein-Carbohydrate and Protein-Peptide Interactions. *Carbohydr. Res.* **2004**, *339*, 907–928.
- Jornet, D.; González-Martínez, M. A.; Maquieira, A.; Puchades, R. Advanced Homogeneous-Heterogeneous Immunosensing Format Employing Restricted Access Supports. *Anal. Chem.* **2007**, *79*, 9331–9339.
- Jornet, D.; González-Martínez, M. A.; Puchades, R.; Maquieira, A. Antibiotic Immunosensing: Determination of Sulfathiazoles in Water and Honey. *Talanta* **2010**, *81*, 1585–1592.

- Julicher, P.; Mussenbrock, E.; Renneberg, R.; Cammann, K. Broadening the Antibody Specificity by Hapten Design for an Enzyme–Linked Immunoassay as an Improved Screening Method for the Determination of Nitroaromatic Residues in Soil. *Anal. Chim. Acta* **1995**, *315*, 279–287.
- Jurado, P.; Fernández, L. A.; de Lorenzo, V. Production and Characterization of a Recombinant single–chain Antibody (scFv) for Tracing the Sigma54 Factor of *Pseudomonas putida*. *J. Biotechnol.* **2012**.
http://www.sciencedirect.com/science?_ob=ArticleListURL&_method=list&_ArticleListID=1969976073&_sort=r&_st=13&_view=c&_acct=C000053935&_version=1&_urlVersion=0&_userid=1647180&_md5=b102c33156d38e16ae26a456dbc6a24d&_searchtype=a
- Karu, A. E.; Goodrow M. H.; Schmidt, D. J.; Hammock, D.; Bigelow, M. W. Synthesis of Haptens and Derivation of Monoclonal Antibodies for Immunoassay of the Phenylurea Herbicide Diuron. *J. Agric. Food Chem.* **1994**, *42*, 301–309.
- Kato, M.; Ihara, Y.; Nakata, E.; Miyazawa, M.; Sasaki, M.; Kodaira, T.; Nakazawa, H. Development of Enrofloxacin ELISA using a Monoclonal Antibody Tolerating an Organic Solvent with Broad Cross–Reactivity to other New Quinolones. *Food Agric. Immunol.* **2007**, *18*, 179–187.
- Kaur, J.; Boro, R. C.; Wangoo, N.; Singh, K. R.; Suri, C. R. Direct Hapten Coated Immunoassay Format for the Detection of Atrazine and 2,4–Dichlorophenoxyacetic Acid Herbicides. *Anal. Chim. Acta* **2008**, *607*, 92–99.
- Kearney, J. F.; Radbruch, A.; Liesegang, B.; Rajewsky, K. New Mouse Myeloma Cell–Line That Has Lost Immunoglobulin Expression but Permits the Construction of Antibody–Secreting hybrid Cell–Lines. *J. Immunol.* **1979**, *123*, 1548–1550.
- Keller, W.E.; Thieme, G.; Stuttgart, V. Phase–transfer reactions. *Fluka–Compendium* **1986**, Vol. I.
- Keller, W.E.; Thieme, G.; Stuttgart, V. Phase–transfer reactions. *Fluka–Compendium* **1987**, Vol. II.
- Kendall, M. G. A New Measure of Rank Correlation. *Biometrika* **1938**, *30*, 81–89.
- Kim, K.O.; Kim, Y. J.; Lee, Y. T.; Hammock, B. D.; Lee, H. S. Development of an Enzyme–Linked Immunosorbent Assay for the Organophosphorus Insecticide Bromophos–Ethyl. *J. Agric. Food Chem.* **2002**, *50*, 6675–6682.
- Kim, Y. J.; Cho, Y. A.; Lee, H. S.; Lee, Y. T.; Gee, S.; Hammock, B. D. Synthesis of Haptens for Immunoassay of Organophosphorus Pesticides and Effect of Heterology in Hapten Spacer Arm Length on Immunoassay Sensitivity. *Anal. Chim. Acta* **2003a**, *475*, 85–96.
- Kim, H. J.; Liu, S.; Keum, Y. S.; Li, Q. X. Development of an Enzyme–Linked Immunosorbent Assay for the Insecticide Thiamethoxam. *J. Agric. Food Chem.* **2003b**, *51*, 1823–1830.
- Kim, Y. J.; Cho, Y. A.; Lee, H. S.; Lee, Y. T. Investigation of the Effect of Hapten Heterology on Immunoassay Sensitivity and Development of an Enzyme–Linked Immunosorbent Assay for the Organophosphorus Insecticide Fenthion. *Anal. Chim. Acta* **2003c**, *494*, 29–40.
- Kim, Y. J.; Kim, Y. A.; Lee, Y. T.; Lee, H. S. Enzyme–Linked Immunosorbent Assays for the Insecticide Fenitrothion Influence of Hapten Conformation and Sample Matrix on Assay Performance. *Anal. Chim. Acta* **2007**, *591*, 183–190.

- Knight, S. C.; Anthony, V. M.; Brandy, A. M.; Greenland, A. J.; Heaney, S. P.; Murray, D. C.; Powell, K. A.; Schuz, M. A.; Spinks, C. A.; Worthington, P. A.; Youle, D. (1997). Rationale and Perspectives on the Development of Fungicides. *Annu. Rev. Phytopathol.* **1997**, *35*, 349–372.
- Knopp, A.; Knopp, D.; Niessner, R. ELISA Determination of the Sulfonylurea Herbicide Metsulfuron–Methyl in Different Water Types. *Environ. Sci. Technol.* **1999**, *33*, 358–361.
- Kobayashi, M.; Oyama, H.; Kato, Y.; Goto, J.; Soderlind, E.; Borrebaeck, C. A. Two–Step *in vitro* Antibody Affinity Maturation Enables Estradiol–17beta Assays with more than 10–Fold Higher Sensitivity. *Anal. Chem.* **2010**, *82*, 1027–1038.
- Koesukwiwat, U.; Lehotaya, S. J.; Miaoc, S.; Leepipatpiboonb, N. High Throughput Analysis of 150 Pesticides in Fruits and Vegetables Using QuEChERS and Low–Pressure Gas Chromatography–Time–of–Flight Mass Spectrometry. *J. Chromatogr., A* **2010**, *1217*, 6692–6703.
- Köhler, G.; Milstein, C. Continuous Cultures of Fuse Cells Secreting Antibody of Predefined Specificity. *Nature* **1975**, *256*, 495–497.
- Kondo, M.; Yamashita, H.; Uchigashima, M.; Kono, T.; Takemoto, T.; Fujita, M.; Saka, M.; Iwasa, S.; Ito, S.; Miyake, S. Development of an Enzyme–Linked Immunosorbent Assay for Residue Analysis of the Insecticide Emamectin Benzoate in Agricultural Products. *J. Agric. Food Chem.* **2009**, *57*, 359–364.
- Kononenko, G. P.; Burkin, A. A. Immunoenzyme Method for the Determination of Citrinin. *J. Anal. Chem.* **2007**, *62*, 691–696.
- Koziorowski, J.; Henssen, C.; Weinreich, R. A New Convenient Route to Radioiodinated *N*–Succinimidyl 3– and 4–Iodobenzoate, Two Reagents for Radioiodination of Proteins. *Appl. Radiat. Isot.* **1998**, *49*, 955–959.
- Krämer, K.; Hock, B. Recombinant Antibodies for Environmental Analysis. *Anal. Bioanal. Chem.* **2003**, *377*, 417–426.
- Krämer, P. M.; Goodrow, M. H.; Kremmer, E. Enzyme–Linked Immunosorbent Assays Based on Rabbit Polyclonal and Rat Monoclonal Antibodies Against Isoproturon. *J. Agric. Food Chem.* **2004**, *52*, 2462–2471.
- Kroiß, S.; Steglich, W. Total Syntheses of the Strobilurins G, M and N. *Tetrahedron* **2004**, *60*, 4921–4929.
- Kuramitz, H. Magnetic Microbead–Based Electrochemical Immunoassays. *Anal. Bioanal. Chem.* **2009**, *394*, 61–69.
- Lagone, J. J.; Van Vunakis, H. Radioimmunoassay for Dieldrin and Aldrin. *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.* **1975**, *10*, 163–171.
- Lagone, J. J.; Van Vunaskis, H. Radioimmunoassay of Nicotine, Cotinine, and Gamma–(3–Pyridyl)–Gamma–Oxo–N–Methylbutyramide. *Methods Enzymol.* **1982**, *84*, 628–640.
- Landsteiner, K.; Simms, S. Production of Heterogenetic Antibodies with Mixtures of the Binding Part of the Antigen and Protein. *J. Exp. Med.* **1923**, *38*, 127–138.
- Landsteiner, K. *The Specificity of Serological Reactions*. C.C. Thomas: Baltimore, MD, **1936**.
- Landsteiner, K. *The Specificity of Serological Reactions*. Dover Publications: New York, **1962**.
- Langman, R. E. The Specificity of Immunological Reactions. *Mol. Immunol.* **2000**, *37*, 555–561.

- Le Brazidec, J. Y.; Gilson, S. A.; Boehm, M. F. Stereoselective Synthesis of the C1–C13 Fragment of 2,3–Dihydrodorrigin A. *J. Org. Chem.* **2005**, *70*, 8212–8215.
- Lee, N. A.; Kennedy, I. R. Environmental Monitoring of Pesticides by Immunoanalytical Techniques: Validation, Current Status, and Future Perspectives. *J. AOAC Int.* **2001**, *84*, 1393–1406.
- Lee, J. K.; Ahn, K. C.; Park, O. S.; Ko, Y. K.; Kim, D. W. Development of an Immunoassay for the Residues of the Herbicide Bensulfuron–Methyl. *J. Agric. Food Chem.* **2002**, *50*, 1791–1803.
- Lee, S.; Gan, J.; Kabashima, J. Recovery of Synthetic Pyrethroids in Water Samples during Storage and Extraction. *J. Agric. Food Chem.* **2002b**, *50*, 7194–7198.
- Lee, J. K.; Park, S. H.; Lee, E. Y.; Kim, Y. J.; Kyung, K. S. Development of an ELISA for the Detection of the Residues of the Fungicide Iprovalicarb. *J. Agric. Food Chem.* **2004**, *52*, 6680–6686.
- Lee, W. Y.; Lee, E. K.; Kim, Y. J.; Park, W. C.; Chung, T.; Lee, Y. T. Monoclonal Antibody–Based Enzyme–Linked Immunosorbent Assays for the Detection of the Organophosphorus Insecticide Isfenphos. *Anal. Chim. Acta* **2006**, *557*, 169–178.
- Lee, Y.; Jeong, Y.; Kang, H. J.; Chung, S. J.; Chuung, B. H. Cascade Enzyme–Linked Immunosorbent Assay (CELISA). *Biosens. Bioelectron.* **2009**, *25*, 332–337.
- Lei, H.; Shen, Y.; Song, L.; Yang, J.; Chevallier, O. P.; Haughey, S. A.; Wang, h.; Sun, Y.; Elliott, C. T. Hapten Synthesis and Antibody Production for the Development of a Melanine Immunoassay. *Anal. Chim. Acta* **2010**, *665*, 84–90.
- Lehotay, S. J. Determination of Pesticide Residues in Foods by Acetonitrile Extraction and Partitioning with Magnesium Sulfate: Collaborative Study. *J. AOAC Int.* **2007**, *90*, 485–520.
- Li, Z. Z.; Gong, F. C. Renewable Fluorometric Enzyme Immunosensing System using Prochlorperazine as the Substrate for Horseradish Peroxidase for the Determination of Transferrin. *Sens. Actuators, B* **2004**, *99*, 562–567.
- Li, Y.; Zhang, H–G; Liu, J.; Yang, X–P; Liu, Z–J. Stereoselective Synthesis and Antifungal Activities of (E)– α –(Methoxyimino)benzeneacetate Derivatives Containing 1,3,5–Substituted Pyrazole Ring. *J. Agric. Food Chem.* **2006a**, *54*, 3636–3640.
- Li, Y.; Liu, J.; Zhang, H.; Yang, X.; Liu, Z. Stereoselective Synthesis and Fungicidal Activities of (E)– α –(Methoxyimino)benzeneacetate Derivatives Containing 1,3,4–Oxadiazole Ring. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006b**, *16*, 2278–2282.
- Li, A.; Liu, Y.; Sun, Y.; Wu, Q.; Lei, H.; Wang, H.; Xiao, Z. Development of Polyclonal Antibody Based Enzyme–Linked Immunosorbent Assay for the Analysis of the Agricultural Insecticide Imidacloprid: Food Quality and Safety. *Asia Pac. J. Clin. Nutr.* **2007**, *16*, 102–105.
- Li, T.; Cheng, J.; Hu, B.; Liu, Y.; Qian, G.; Liu, F. Construction, Production, and Characterization of Recombinant scFv Antibodies Against Methamidophos Expressed in *Pichia pastoris*. *J. Microbiol. Biotechnol.* **2008**, *24*, 867–874.
- Li, G.; Yang, H. Synthesis and Antifungal Bioactivity of Methyl 2–Methoxyimino–2–{2–[(substituted benzylidene)aminooxymethyl]phenyl}acetate and 2–Methoxyimino–2–{2–[(substituted benzylidene)aminooxymethyl]phenyl}–N–methylacetamide Derivatives. *Chin. J. Chem.* **2009**, *27*, 2055–2060.

- Liang, C.; Jin, R.; Gui, W.; Zhu, G. Enzyme–Linked Immunosorbent Assay Based on a Monoclonal Antibody for the Detection of the Insecticide Triazophos: Assay Optimization and Application to Environmental Samples. *Environ. Sci. Technol.* **2007**, *41*, 6783–6788.
- Liang, Y.; Liu, X. J.; Liu, Y.; Yu, X. Y.; Fan, M. T. Synthesis of Three Haptens for the Class–Specific Immunoassay of O,O–Dimethyl Organophosphorus Pesticides and Effect of Hapten Heterology on Immunoassay Sensitivity. *Anal Chim Acta.* **2008**, *615*, 174–83.
- Liang, C.; Zou, M.; Guo, L.; Gui, W.; Zhu, G. Development of a Bead–Based Immunoassay for Detection of Triazophos and Application Validation. *Food Agric. Immunol.* **2011**, 1–12.
- Likas, D.T.; Tsiropoulos, N.G.; Miliadis, G.E. Rapid Gas Chromatographic Method for the Determination of Famoxadone, Trifloxystrobin and Fenhexamid Residues in Tomato, Grape and Wine Samples. *J. Chromatogr., A* **2007**, *1150*, 208–214.
- Liu, C. L.; Li, M.; Guan, A. Y.; Zhang, H.; Li, Z. M. Design, Synthesis and Fungicidal activity of Novel (E)–Methyl 2–{2–(Coumarin–7–Yloxy)Methyl Phenyl}–3–Methoxyacrylates. *Nat. Prod. Commun.* **2007a**, *2*, 845–848.
- Liu, Y. H.; Jin, M. J.; Gui, W. J.; Cheng, J. L.; Guo, Y. R.; Zhu, G. N. Hapten Design and Indirect Competitive Immunoassay for Parathion Determination: Correlation with Molecular Modeling and Pincipal Componet Analysis. *Anal. Chim. Acta* **2007b**, *591*, 173–182.
- Liu, S.; Dai, Q.; Austin, L.; Coutts, J.; Knowles, G.; Zou, J.; Chen, H.; Huo, Q. A One–Step Homogeneous Immunoassay for Cancer Biomarker Detection Using Gold Nanoparticle Probes Coupled with Dynamic Light Scattering. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 2780–2782.
- Liu, Y. H.; Chen, J.; Wang, C. M.; Guo, Y.; Liang, X.; Zhuo, G. N. Specific Antibody for Pesticide Residue Determination Produced by Antibody–Pesticide Complex. *J. Environ. Sci. Health, Part B* **2010**, *45*, 540–546.
- Liu, Z. J.; Yu, P.–M.; Fang, S.; Fan, J. Q.; Wang, M. H. Development of an Enzyme–Linked Immunosorbent Assay for Determination of Pretilachlor in Water and Soil. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **2011**, *74*, 1595–1599.
- Lynch, J.; Freeman, J. C.; Judd, A.; Iyengar, R.; Mulhem, M.; Zhao, G.; Napier, J.; Wodka, D.; Brodjian, S.; Falls, D.; Hernández, L. Optimization of Chromone–2–carboxamide Melanin Concentrating Hormone Receptor 1 Antagonists: Assessment of Potency, Efficacy, and Cardiovascular Safety. *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 6569–6584.
- Ma, D.; Jiang, Y.; Chen, F.; Gong, L–K; Ding, K.; Xu, Y.; Wang, R.; Ge, A.; Ren, J.; Li, J.; Li, J.; Ye, Q. Selective Inhibition of Matrix Metalloproteinase Isozymes and in Vivo Protection against Emphysema by Substituted gamma–Keto Carboxylic Acids. *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 456–458.
- Maclús, J. J.; Primo, J.; Montoya, A. Development of Enzyme–Linked Immunosorbent Assays for the Insecticide Chlorpyrifos. 1. Monoclonal Antiboy Production and Immunoassay Desing. *J. Agric. Food Chem.* **1996**, *44*, 4052–4062.
- Maclús, J. J.; Moreno, M. J.; Plana, E.; Montoya, A. Development of Monoclonal Immunoassays for the Determination of Triazole Fungicides in Fruit Juice. *J. Agric. Food Chem.* **2008**, *56*, 8793–8800.
- Madru, B.; Chapuis–Hugon, F.; Peyrin, E.; Pichon, V. Determination of Cocaine in Human Plama by Selective Solid–Phase Extraction using an Aptamer–Based Sorbent. *Anal. Chem.* **2009**, *81*, 7081–7086.

- Mar, J.; Wells, C. A.; Quackenbush, J. Defining an Informativeness Metric for Clustering Gene Expression Data. *Bioinformatics* **2011**, *27*, 1094–1100.
- Marco, M. P.; Hammock, B. D.; Kurth, M. J. Hapten Design and Development of an ELISA (Enzyme-Linked-Immunosorbent-Assay) for the Detection of the Mercapturic Acid Conjugates of Naphtalene. *J. Org. Chem.* **1993**, *58*, 7548–7556.
- Marco, M. P.; Gee, S.; Hammock, B. D. Immunochemical Techniques for Environmental Analysis. II. Antibody Production and Immunoassay Development. *Trends. Anal. Chem.* **1995**, *14*, 341–350.
- Margot, P.; Huggenberger, F.; Amrein, J.; Weiss, B. CGA 279202: a New Broad-Spectrum Strobilurin Fungicide. *Plant diseases* **1998**, *2*, 375–382.
- MARM (Ministerio de Medio Ambiente Rural y Medio Rural y Marino). Lista Comunitaria de Sustancias Activas Incluidas, Excluidas y en Evaluación Comunitaria. **2012**.
<http://www.magrama.es/es/agricultura/temas/medios-deproduccion/productos-fitosanitarios/registro/menu.asp>
- Martínez-Cabot, A.; Varela, B.; Lloveras, M.; Campos, R.; Marco, M. P.; Messeguer, A. Studies on Toxic Oil Syndrome: Development of an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for 3-(N-phenylamino)propane-1,2-diol in Human Urine. *Anal. Bioanal. Chem.* **2008**, *391*, 617–624.
- Mastovska, K.; Dorweiler, K. J.; Lehotay, S. J.; Wegscheid, J. S., & Szpylka, K. A. Pesticide Multiresidue Analysis in Cereal Grains Using Modified QuEChERS Method Combined with Automated Direct Sample Introduction GC-TOFMS and UPLC-MS/MS Techniques. *J. Agric. Food Chem.* **2010**, *58*, 5959–5972.
- Mauriz, E.; Calle, A.; Manclús, J. J.; Montoya, A.; Lechuga, L. M. Multi-analyte SPR Immunoassays for Environmental Biosensing of Pesticides. *Anal. Bioanal. Chem.* **2007**, *387*, 1449–1458.
- Meng, Q.; Sun, Y.; Ratovelomanana-Vidal, V.; Genet, J.P.; Zhang, Z. CeCl₃·7H₂O: An Effective Additive in Ru-Catalyzed Enantioselective Hydrogenation of Aromatic α -Ketoesters. *J. Org. Chem.* **2008**, *73*, 3842–3847.
- Meng, M.; Xi, R. Review: Current Development of Immunoassay for Analyzing Veterinary Drug Residue in Foods and Food Products. *Anal. Lett.* **2011**, *44*, 2543–2558.
- Mercader, J. V.; Montoya, A. Development of Monoclonal ELISAs for Azinphos-Methyl. 1. Hapten Synthesis and Antibody Production. *J. Agric. Food Chem.* **1999**, *47*, 1276–1284.
- Mercader, J. V.; Skerra, a. Generation of Anticalins with Specificity for a Nonsymmetric Phthalic Acid Ester. *Anal Biochem.* **2002**, *308*, 269–77.
- Mercader, J. V.; Suárez-Pantaleón, C.; Agulló, C.; Abad-Somovilla, A.; Abad-Fuentes, A. Hapten Synthesis and Monoclonal Antibody-Based Immunoassay Development for the Detection of the Fungicide Kresoxim-methyl. *J. Agric. Food Chem.* **2008a**, *56*, 1545–1552
- Mercader, J. V.; Suarez-Pantaleón, C.; Agulló, C.; Abad-Somovilla, A.; Abad-Fuentes, A. Hapten Synthesis and Monoclonal Antibody-Based Immunoassay Development for Detection of the Fungicide Trifloxystrobin. *J. Agric. Food Chem.* **2008b**, *56*, 2581–2588.
- Mercader, J. V.; Suárez-Pantaleón, C.; Agulló, C.; Abad-Somovilla, A.; Abad-Fuentes, A. Production and Characterization of Monoclonal Antibodies Specific to the Strobilurin Pesticide Pyraclostrobin. *J. Agric. Food Chem.* **2008c**, *56*, 7682–7690.

- Mercader, J. V.; Abad-Fuentes, A. Monoclonal Antibody Generation and Direct Competitive Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Evaluation for the Analysis of the Fungicide Fenhexamid in Must and Wine. *J. Agric. Food Chem.* **2009**, *57*, 5129–5135.
- Mercader, J. V.; Agulló, C.; Abad-Somovilla, A.; Abad-Fuentes, A. Synthesis of Site-Heterologous Haptens for High-Affinity Anti-Pyraclostrobin Antibody Generation. *Org. Biomol. Chem.* **2011**, *9*, 1443–1453.
- Mercader, J. V.; Parra, J.; Esteve-Turrillas, F. A.; Agulló, C.; Abad-Somovilla, A.; Abad-Fuentes, A. Development of Monoclonal Antibody-Based Competitive Immunoassays for the Detection of Picoxystrobin in Cereal and Oilseed Flours. *Food Control* **2012**, *26*, 162–168.
- Mickova, B.; Kovalczuk, T.; Pavel Rauch, P.; Moreno, M. J.; Abad, A.; Montoya, A.; Ferri, E.; Fini, F.; Girotti, S. Analytical Performances of Validated Chemiluminescent Enzyme Immunoassays to Detect N-Methylcarbamate Pesticides. *Anal. Chim. Acta* **2005**, *528*, 243–248.
- Mol, H. G.; Plaza-Bolaños, P.; Zomer, P.; de Rijk, T. C.; Stolker, A. A.; Mulder, P. P. Toward a Generic Extraction Method for Simultaneous Determination of Pesticides, Mycotoxins, Plant Toxins, and Veterinary Drugs in Feed and Food matrixes. *Anal. Chem.* **2008**, *80*, 9450–9459.
- Montoya, A.; Castell, J. V. Long-Term Storage of Peroxidase-Labeled Immunoglobulins for Use in Enzyme-Immunoassay. *J. Immunol. Methods* **1987**, *99*, 13–20.
- Moon, J. K.; Keum, Y. S.; Hwang, E. C.; Park, B. S.; Chang, H. R.; Li, Q. X.; Kim, J. H. Hapten Synthesis and Antibody Generation for a New Herbicide, Metamifop. *J. Agric. Food Chem.* **2007**, *55*, 5416–5422.
- Moore, G.; Papamicaël, C.; Levacher, V.; Bourguignon, J.; Dupas, G. Synthesis and Study of a Heterocyclic Receptor Designed for Carboxylic Acids. *Tetrahedron* **2004**, *60*, 4197–4204.
- Morais, S.; Tamarit-López, J.; Carrascosa, J.; Puchades, R.; Maquieira, A. Analytical Prospect of Compact Disk Technology in Immunosensing. *Anal. Bioanal. Chem.* **2008**, *391*, 2837–2844.
- Morais, S.; Tortajada-Genaro, L. A.; Arnandis-Chover, T.; Puchades, R.; Maquieira, A. Multiplexed Microimmunoassays on a Digital Versatile Disk. *Anal. Chem.* **2009**, *81*, 5646–5654.
- Moreno, M. J.; Abad, A.; Montoya, A. Production of Monoclonal Antibodies to the N-methylcarbamate Pesticide Propoxur. *J. Agric. Food Chem.* **2001a**, *49*, 72–78.
- Moreno, M. J.; Abad, A.; Pelegrí, R.; Martínez, M. I.; Sáez, A.; Gamón, M.; Montoya, A. Validation of a Monoclonal Enzyme Immunoassay for the Determination of Carbofuran in Fruits and Vegetables. *J. Agric. Food Chem.* **2001b**, *49*, 1713–1719.
- Moreno, M. J.; Plana, E.; Montoya, A.; Caputo, P.; Manclús, J. J. Application of a Monoclonal-Based Immunoassay for the Determination of Imazalil in Fruit Juices. *Food Addit. Contam.* **2007**, *24*, 704–712.
- Moreno, M. J.; D'Arienzo, P.; Manclús, J. J.; Montoya, A. Development of Monoclonal Antibody-Based Immunoassays for the Analysis of Bisphenol A in Canned Vegetables. *J. Environ. Sci. Heal. B* **2011**, *46*, 509–517.
- Morozova, V. S.; Levahova, A. I.; Eremin, S. A. Determination of Pesticides by Enzyme Immunoassay. *J. Anal. Chem.* **2005**, *60*, 230–246.

- Morpurgo, M.; Bayer, E. A.; Wilchek, M. N-Hydroxysuccinimide Carbonates and Carbamates are Useful Reactive Reagents for Coupling Ligands to Lysines on Proteins. *J. Biochem. Biophys. Methods* **1999**, *38*, 17–28.
- Muhamad, H.; Ismail, B. S.; Sameni, M.; Nashriyah Mat, N. Adsorption Study of ¹⁴C-Paraquat in Two Malaysian Agricultural Soils. *Environ. Monit. Assess* **2011**, *176*, 43–50.
- Muldoon, T. M.; Fies, G. F.; Nelson, J. O. Evaluation of ELISA for the Multianalyte Analysis of S-Triazines in Pesticide Waste and Rinsate. *J. Agric. Food Chem.* **1993**, *41*, 322–328.
- Muldoon, T. M.; Holtzapple, C. K.; Deshpande, S. S.; Beier, R. C.; Stanker, L. H. Development of a Monoclonal Antibody-Based cELISA for the Analysis of Sulfadimethoxine. 1. Development and Characterization of Monoclonal Antibodies and Molecular Modeling Studies of Antibody Recognition. *J. Agric. Food Chem.* **2000**, *48*, 537–544.
- Nagumo, S.; Ishii, Y.; Sato, G.; Mizukami, M.; Imai, M.; Kawahara, N.; Akita, H. 8-Endo Selective Friedel-Crafts Cyclization of Vinyloxiranes with Co-2(Co)(6)-Complexed Acetylene. *Tetrahedron Lett.* **2009**, *50*, 26–28.
- Nakane, P. K.; Pierce, G.B. Enzyme-Labelled Antibodies. Preparation and Application for the Localization of Antigens. *J. Histochem. Cytochem.* **1966**, *14*, 929–931.
- Nasreddine, L.; Parent-Massin, D. Food Contamination by metals and pesticides in the European Union. Should we worry? *Toxicol. Lett.* **2002**, *127*, 29–41.
- Navalón, A.; Prieto, A.; Araujo, L.; Vílchez, J.L. Determination of Pyrimethanil and Kresoxim-methyl in Green Groceries by Headspace Solid-Phase Microextraction and Gas Chromatography Mass Spectrometry. *J. Chromatogr., A.* **2002**, *975*, 355–360.
- Naveena, C. S.; Boja, P.; Kumari, N. S. Synthesis, Characterization and Antimicrobial Activity of Some Disubstituted 1,3,4-Oxadiazoles Carrying 2-(Aryloxymethyl)phenyl Moiety. *Eur. J. Med.* **2010**, *45*, 4708–4719.
- Neokosmidi, A.; Ragoussis, V.; Zikos, c.; Paravotou-Petosotas, M.; Livaniou, E.; Ragoussis, N.; Evangetatos, G. Synthesis of Haptens and Development of an Immunoassay for the Olive Fruit Fly Pheromone. *J. Agric. Food Chem.* **2004**, *52*, 4368–4374.
- Neokosmidi, A.; Ragoussis, V.; Zikos, c.; Paravotou-Petosotas, M.; Livaniou, E.; Ragoussis, N.; Evangetatos, G. Determination of Natural Olive Fruit Fly Pheromone in Insect Samples by Enzyme Linked Immunoassays. *Talanta* **2008**, *74*, 539–546.
- Nerín, C.; Tornés, A. R.; Domeño, C.; Cacho, J. Absorption of Pesticides on Plastic Films Used as Agricultural Soil Covers. *J. Agric. Food Chem.* **1996**, *44*, 4009–4014.
- Neufeldt, S. R.; Sanford, M. S. O-Acetyl Oximes as Transformable Directing Groups for Pd-Catalyzed C-H Bond Functionalization. *Organic Lett.* **2010**, *12*, 532–535.
- Newsome, W.H.; Shields, J.B. A Radioimmunoassay for Benomyl and Methyl 2-Benzimidazolecarbamate on Food Crops. *J. Agric. Food Chem.* **1981**, *29*, 220–222.
- Ngwerume, S.; Camp, J. E. Synthesis of Highly Substituted Pyrroles via Nucleophilic Catalysis. *J. Org. Chem.* **2010**, *75*, 6271–6274.
- Nichkova, M.; Fu, X.; Yang, Z.; Zhong, P.; Sanborn, J. R.; Chang, D.; Gee, S. J.; Hammock, B. D. Immunochemical Screening of Pesticides (Simazine and Cypermethrin) in Orange Oil. *J. Agric. Food Chem.* **2009**, *57*, 5673–5679.
- Nowinski, R. C.; Lonstrom, M. E.; Tam, M. R.; Stone, M. R.; Burnette, W. N. Isolation of Hybrid Cell-Lines Producing Monoclonal Antibodies against the P15(E) Protein of Ecotropic Murine Leukemia Viruses. *Virology* **1979**, *93*, 111–126.

- Ogura, H.; Kobayashi, T.; Shimizu, K.; Kawabe, K.; Takeda, K. A Novel Active Ester Synthesis Reagent (N,N'-Disuccinimidyl Carbonate). *Tetrahedron Lett.* **1979**, *20*, 4745–4746.
- Oguri, H.; Hirama, M.; Tsumuraya, T.; Fujii, I.; Maruyama, M.; Uehara, H.; Nagumo, Y. Synthesis-Based Approach toward Direct Sandwich Immunoassay for Ciguatoxin CTX3C. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 7608–7612.
- Oubiña, A.; Barceló, D.; Marco, A. P. Effect of Competitor Design on Immunoassay Specificity: Development and Evaluation of an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for 2,4-Dinitrophenol. *Anal. Chim. Acta* **1999**, *387*, 267–279.
- Parra, J. Síntesis de Haptenos Regioisoméricos y Desarrollo de Inmunoensayos para la Determinación del Fungicida Azoxystrobin. Tesis Doctoral, Valencia **2011**.
- Parra, J.; Mercader, J. V.; Agulló, C.; Abad-Somovilla, A.; Abad-Fuentes, A. Concise and Modular Synthesis of Regioisomeric Haptens for the Production of High-affinity and Stereoselective Antibodies to the Strobilurin Azoxystrobin. *Tetrahedron* **2011a**, *67*, 624–635.
- Parra, J.; Esteve-Turrillas, F. A.; Abad-Somovilla, A.; Agulló, C.; Mercader, J. V.; Abad-Fuentes, A. Exploring Alternative Hapten Tethering Sites for High-Affinity Anti-Picoxystrobin Antibody Generation. *Anal. Biochem.* **2011b**, *416*, 82–91.
- Parra, J.; Mercader, J. V.; Agulló, C.; Abad-Somovilla, A.; Abad-Fuentes, A. Generation of Anti-Azoxystrobin Monoclonal Antibodies from Regioisomeric Haptens Functionalized at Selected Sites and Development of Indirect Competitive Immunoassays. *Anal. Chim. Acta* **2012**, *715*, 105–112.
- Pascual, A.; Ziegler, H.; Trah, S.; Ertl, P.; Winkler, T. Synthesis of 8-Substituted 5H,9H-6-Oxa-7-Azabenzocyclononene-10,11-Dione-11-O-Methyloximes, a New [1,2]-Oxazone Ring System. *Tetrah. Lett.* **2000**, *41*, 1381–1384.
- Pastor-Navarro, N.; García-Bover, C.; Maquieira, A.; Puchades, R. Specific Polyclonal-Based Immunoassays for Sulfathiazole. *Anal. Bioanal. Chem.* **2004**, *379*, 1088–1099.
- Pastor-Navarro, N.; Gallego-Iglesias, E.; Maquieira, A.; Puchades, R. Development of Group-Specific Immunoassay for Sulfonamides Application to Bee Honey Analysis. *Talanta* **2007**, *71*, 923–933.
- Pastor-Navarro, N.; Brun, E. M.; Gallego-Iglesias, E.; Maquieira, A.; Puchades, R. Development of Immunoassays to Determine Sulfamethoxazole Residues in Wastewaters. *J. Environ. Monit.* **2009a**, *11*, 1094–1100.
- Pastor-Navarro, N.; Maquieira, A.; Puchades, R. Immunoanalytical Determination of Tetracycline and Sulfonamide Residues in Edible Products: A Review. *Anal. Bioanal. Chem.* **2009b**, *395*, 907–920.
- Paulvannan, K., & Chen, T. Asymmetric Synthesis of Mercaptoalcohols-Matrix Metalloproteinase Inhibitors. *Synlett* **1999**, *9*, 1371–1374.
- Paya, P.; Anastassiades, M.; Mack, D.; Sigalova, I.; Tisdelen, B.; Oliva, J.; Barba, A. Analysis of Pesticides Residues Using the Quick Easy Cheap Effective Rugged and Safe (QuEChERS) Pesticide Multiresidue Method in Combination with Gas and Liquid Chromatography and Tandem Mass Spectrometric Detection. *Anal. Bioanal. Chem.* **2007**, *389*, 1697–1714.
- Pekas, J. C. Retention Lipophilic Compounds on Laboratory Tubing. *Toxicology and Applied Pharmacology* **1972**, *21*, 586–588.

- Pesticide EU–MRLs. EU Pesticide Database. **2011**.
http://ec.europa.eu/sanco_pesticides/public/index.cfm
- Peterson, E. C.; Gunnell, M.; Che, Y.; Goforth, R. L.; Carroll, F.I.; Henry, R.; Liu, H.; Owens, S. M. Using Hapten Design to Discover Therapeutic Monoclonal Antibodies for Treating Methamphetamine Abuse. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2007**, *322*, 30–39.
- Pfifner, A.; Trah, S. Pesticides. US5583249. **1996**.
- Piao, Y. Z.; Kim, Y. J.; Kim, Y. A.; Lee, H. S.; Hammock, B. D.; Lee, Y. T. Development of ELISAs for the Class–Specific Determination fo Organophosphorus Pesticide. *J. Agric. Food Chem.* **2009**, *57*, 10004–10013.
- Pilkington–Miksa, M. A., Writer, M. J.; Sarkar, S.; Meng, Q. H.; Barker, S. E.; ShamLou, P. A.; Hailes, H. C.; Hart, S. L.; Tabor, A. B. Targeting Lipopolyplexes using Bifunctional Peptides Incorporating Hydrophobic Spacer Amino Acids: Synthesis, Transfection, and Biophysical Studies. *Bio. Chem.* **2007**, *18*, 1800–1810.
- Pitarch, A.; Nombela, C.; Gil, C. Proteomic Profiling of Serologic Response to *Candida Albicans* During Host–Commensal and Host–Pathogen Interactions. *Methods Mol. Biol.* **2009**, *470*, 369–411.
- Prasad, M.; Nowshuddin, S.; Rao, M. N. A. Improved Synthesis of *N,N'*-Disuccinimidyl Carbonate using α -Pinene as Acid Scavenger. *Syn. Com.* **2005**, *35*, 3119–3121.
- Pratt, J. J. Steroid Immunoassay in Clinical Chemistry. *Clin. Chem.* **1978**, *24*, 1869–1890.
- PRMA (Health Canada's Pest Management Regulatory Agency). Proposed Registration Decision: Trifloxystrobin. **2008**.
http://www.hc-sc.gc.ca/cps-spc/pest/part/consultations/_prd2008-01/index-eng.php
- Qi, H.; Zhang, C. Homogeneous Electrogenerated Chemiluminescence Immunoassay for the Determination of Dioxin. *Anal. Chim. Acta* **2004**, *501*, 31–35.
- Rabolle, M.; Spliid, N.H.; Kristensen, K.; Kudsk, P. Determination of Fungicide Residues in Field–Grown Strawberries following Different Fungicide Strategies against Gray Mold (*Botrytis cinerea*). *J. Agric. Food Chem.* **2006**, *54*, 900–908.
- Rallis India Ltd. **2011**.
http://dascap.com/house_view_pdf/Rallis.pdf
- Ramesh, A.; Thirugnanam, P. E.; Balakrishnamurthy, P. Hapten Synthesis, Generation of Polyclonal Antibodies and Development of ELISA for Determination of Thiamethoxam Residues in Food and Environmental Samples. *Indian J. Biotechnol.* **2007**, *6*, 365–371.
- Ramón–Azcon, R. J.; Galve, R.; Sánchez–Baeza, F.; Marco, M.P. Development of an Enzyme–Linked Immunosorbent Assay for Determination of the Linear Alkylbenzene Sulfonates and Long–Chain Sulfophenyl Carboxylates Using Antibodies Generated by Pseudo Heterologous Immunization. *Anal. Chem.* **2006**, *78*, 71–81.
- Ramón–Azcón, J.; Sánchez–Baeza, F.; Savidens, N.; Marco, M. P. Development of an Enzyme–Linked Immunosorbent Assay for Determination of the Miticide Bromopropylate. *J. Agric. Food Chem.* **2009**, *57*, 375–384.
- Rice, R. J.; McConnell, L. L.; Heighton, L. P.; Sadeghi, A. M.; Isensee, A. R.; Teasdale, J. R.; Abdul–Baki, A. A.; Harman–Fetcho, J. A.; Hapeman, C. J. Runoff Loss of Pesticides and Soil: A Comparison between Vegetative Mulch and Plastic Mulch in Vegetable Production Systems. *J. Environ. Qual.* **2001**, *30*, 1808–1821.

- Rinder, D. F.; Fleeker, J. R. A Radioimmunoassay to Screen for 2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid and 2,4,5-Trichlorophenoxyacetic Acid in Surface Water. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **1981**, *26*, 375–380.
- Roberts, T. R.; Hutson, D. H. Metabolic Pathways of Agrochemicals: Herbicides and Plant Growth Regulators, part two. Royal Society of Chemistry (Gran Bretaña), **1998**.
- Rodbard, D. Statistical Quality Control and Routine Data Processing for Radioimmunoassays and Immunoradiometric Assays. *Clin. Chem.* **1974**, *20*, 1255–1270
- Romero, G. M.; Chianella, I.; Piletska, E. V.; Karim, K.; Turner, A. P.; Piletsky, S. A. Development of a Piezoelectric Sensor for the Detection of Methamphetamine. *Analyst* **2009**, *134*, 1565–1570.
- Rossi, R.; Carpita, A.; Pazzi, P.; Mannina, L.; Valensin, D. A Novel Method for the Efficient Synthesis of Methyl 2-Oxo-2-Arylacetates and its Application to the Preparation of Fungicidal Methyl (E)-O-Methyloximino-2-Arylacetates and their (Z)-Stereoisomers. *Tetrahedron* **1999**, *55*, 11343–11364.
- Rubio, D. R.; Kamp, L. M.; Heilman, M.; Williams, L.; Rubio F. M. Development of a Magnetic Particle-Based Enzyme Immunoassay for the Determination of Penoxsulam in Water. *J. Agric. Food Chem.* **2008**, *56*, 7606–7612.
- Rubio, R.; Berruga, M. I.; Román, M.; Molina, A. Evaluation of Immunoenzymatic Methods for the Detection of Aflatoxin M1 in Ewe's Milk. *Food Control* **2009**, *20*, 1049–1052.
- Ruta, J.; Perrier, S.; Ravelet, C.; Fize, J.; Peyrin, E. Noncompetitive Fluorescence Polarization Aptamer-Based Assay for Small Molecule Detection. *Anal. Chem.* **2009**, *81*, 7468–7473.
- SaKamoto, T.; Cullen, M. D.; Hartman, T. L. Synthesis and Anti-HIV Activity of New Metabolically Stable Alkenyldiarylmethane Non-Nucleoside Reverse Transcriptase Inhibitors Incorporating N-Methoxy Imidoyl Halide and 1,2,4-Oxadiazole Systems. *J. Med. Chem.* **2007**, *50*(14), 3314–3321.
- Salvador, J. P.; Sanchez-Baeza, F.; Marco, M. P. Preparation of Antibodies for the Designer Steroid Tetrahydrogestrinone and Development of an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Human Urine Analysis. *Anal. Chem.* **2007a**, *79*, 3734–3740.
- Salvador, J. P.; Estevez, M. C.; Marco, M. P.; Sánchez-Baeza, F. A New Methodology for the Rational Design of Molecularly Imprinted Polymers. *Anal. Lett.* **2007b**, *40*, 1294–1306.
- Salvador, J. P.; Sánchez-Baeza, F.; Marco, M. P. Simultaneous Immunochemical Detection of Stanozolol and the Main Human Metabolite, 3'-Hydroxy-stanozolol, in Urine and Serum Samples. *Anal. Biochem.* **2008**, *376*, 221–228.
- Salvador, J. P.; Sánchez-Baeza, F.; Marco, M. P. A High-Throughput Screening (HTS) Immunochemical Method for the Analysis of Stanozolol Metabolites in Cattle Urine Samples. *J. Chromatogr., B* **2010**, *878*, 243–252.
- SANCO. Method Validation and Quality Control Procedures for Pesticide Residues Analysis in Food and Feed. Document EC No. SANCO/10684/2009. **2010**.
- Sandra, P.; Tienpot, B.; David, F. Multi-residue Screening of Pesticides in Vegetables, Fruits and Baby Food by Stir Bar Sorptive Extraction-Thermal Desorption-Capillary Gas Chromatography-Mass Spectrometry. *J. Chromatogr., A* **2003**, *1000*, 299–309.

- Sannino, A.; Bolzoni, L.; Bandini, M. Application of Liquid Chromatography with Electrospray Tandem Mass Spectrometry to the Determination of a New Generation of Pesticides in Processed Fruits and Vegetables. *J. Chromatogr., A* **2004**, *1036*, 161–169.
- Santos, F. J.; Galceran, M. T. The Application of Gas Chromatography to Environmental Analysis. *Trends in Anal. Chem.* **2002**, *21*, 672–685.
- Sanvicens, N.; Sanchez–Baeza, M.; Marco, M. P. Immunochemical Determination of 2,4,6 Trichloroanisole as the Responsible Agent for the Musty Odor in Foods. 1. Molecular Modeling Studies for Antibody Production. *J. Agric. Food Chem.* **2003a**, *51*, 3924–3931.
- Sanvicens, N.; Varela, B.; Marco, M. P. Immunochemical Determination of 2,4,6–Trichloroanisole as the Responsible Agent for the Musty Odor in Foods. 2. Immunoassay Evaluation. *J. Agric. Food Chem.* **2003b**, *51*, 3932–3939.
- Sanvicens, N.; Pichon, V.; Hennion, M.C.; Marco, M. P. Preparacion of Antibodies and Development of an Enzyme–Linked Immunosorbent Assay for Determination of Dealkylated Hydroxytriazines. *J. Agric. Food Chem.* **2003c**, *51*, 156–164.
- Sanvicens, N.; Moore, E. J.; Guilbault, G. G.; Marco, M. P. Determination of Haloanisols in White Wine by Immunosorbent Solid–Phase Extraction Followed by Enzyme–Linked Immunosorbent Assay. *J. Agric. Food Chem.* **2006**, *54*, 9176–9183.
- Sanvicens, N.; Pascual, N.; Fernández–Argüelles, M. T.; Adrián, J.; Costa–Fernández, J. M.; Sánchez–Baeza, F.; Sanz–Medel, A.; Marco, M. P. Quantum Dot–Based Array for Sensitive Detection of *Escherichia coli*. *Anal. Bioanal. Chem.* **2011**, *399*, 2755–2762.
- Sanvicens, N.; Varela, B.; Ballesteros, B.; Marco, M. P. Development of an Immunoassay for Terbutryn: Study of the Influence of the Immunization Protocol. *Talanta* **2012**, *89*, 310–316.
- Sauter, H.; Steglich, W.; Anke, T. Strobilurins: Evolution of a New Class of Active Substances. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, *38*, 1328–1349.
- Schirra, M.; D'Aquino, S.; Cabras, P.; Angioni, A. Control of Postharvest Diseases of Fruit by Heat and Fungicides: Efficacy, Residue Levels, and Residue Persistence. A Review. *J. Agric. Food Chem.* **2011**, *59*, 8531–8542.
- Schlaeppli, J. M. A.; Meyer, W.; Ramsteiner, K. Determination of Triasulfuron in Soil by Monoclonal Antibody–Based Enzyme Immunoassay. *J. Agric. Food Chem.* **1992**, *40*, 1093–1098.
- Schlaeppli, J. M. A.; Kessler, A.; Föry, W. Development of a Magnetic Particle–Based Automated Chemiluminescent Immunoassay for Triasulfuron. *J. Agric. Food Chem.* **1994**, *42*, 1914–1919.
- Schneider P.; Goodrow, M. H.; Gee S. J.; Hammock, B. D. A Highly Sensitive and Rapid ELISA for the Arylurea Herbicides Diuron, Monuron and Linuron. *J. Agric. Food Chem.* **1994**, *42*, 413–422.
- Schobel, U.; Barzen, C.; Gauglitz, S. Immunoanalytical Techniques for Pesticide Monitoring Based on Fluorescence Detection. *J. Anal. Chem.* **2000**, *366*, 646–658.
- Schurek, J.; Vaclavik, L.; Hooijerink, H.; Lacina, O.; Poustka, J.; Sharman, M.; Caldwell, M.; Nielsen, M.; Hajslova, J. Control of Strobilurin Fungicides in Wheat Using Direct Analysis in Real Time Accurate Time–of–Flight and Desorption Electrospray Ionization Linear Ion Trap Mass Spectrometry. *Anal. Chem.* **2008**, *80*, 9567–9575.

- Schwoppe, D. M.; Milman, G.; Huestis, M. A. Validation of an Enzyme Immunoassay for Detection and Semiquantification of Cannabinoids in Oral Fluid. *Clin. Chem.* **2010**, *56*, 1007–1014.
- Seidel, M; Niessner, R. Automated Analytical Microarrays: A Critical Review. *Anal. Bioanal. Chem.* **2008**, *391*, 1521–1544.
- Şenyuva, H. Z.; Gilbert, J. Immunoaffinity Column Clean-Up Techniques in Food Analysis: A Review. *J. Chromatogr., B* **2010**, *878*, 115–132.
- Shan, G.; Lipton, C.; Gee, S. J.; Hammock, B. D. Immunoassay, Biosensors and other Non-Chromatographic Methods. En *Handbook of Residue Analytical Methods for Agrochemicals*, **2002**, pp 623–679.
- Sharom, M. S.; Solomon, K. R. Adsorption and Desorption of Permethrin and other Pesticides on Glass and Plastic Materials used in Bioassay Procedures. *Can. Tech. Rep. Fish. Aquat. Sci.* **1981**, *38*, 199–204.
- Sheedy C.; Hall J. C. Immunoaffinity Purification of Chlorimuron-ethyl from Soil Extracts Prior to Quantification by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. *J. Agric. Food Chem.* **2001**, *49*, 1151–1157.
- Sheedy, C.; MacKenzie, C. R.; Hall, J. C. Isolation and Affinity Maturation of Hapten-specific Antibodies. *Biotechnol. Adv.* **2007**, *25*, 333–352.
- Sheehan, J. C.; Hess, G. P. A New Method of Forming Peptide Bonds. *J. Am. Chem. Soc.* **1955**, *77*, 1067–1068.
- Shelver, W. L.; Keum, Y. S.; Kim, H. J.; Rutherford, D.; Hakk, H. H.; Bergman, A.; Li, Q. X. Hapten Synthesis and Antibody Generation for the Development of a Polybrominated Flame Retardant ELISA. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53*, 3840–3847.
- Shelver, W. L.; Kamp, L. M.; Church, J. L.; Rubio, F. M. Measurement of Triclosan in Water Using a Magnetic Particle Enzyme Immunoassay. *J. Agric. Food Chem.* **2007**, *55*, 3758–3763.
- Shim, J. Y.; Kim Y. A.; Lee, Y. T.; Hammock, B. D.; Lee, H. S. Monoclonal Antibody-Based Enzyme-Linked Immunosorbent Assays for the Organophosphorus Insecticide O-Ethyl O-4-Nitrophenyl Phenylphosphonothioate (EPN). *J. Agric. Food Chem.* **2010**, *58*, 5241–5247.
- Singh, K. V.; Kaur, J.; Varshney, G. C.; Raje, M.; Suri, C. R. Synthesis and Characterization of Hapten-Protein Conjugates for Antibody Production against Small Molecules. *Bioconjugate Chem.* **2004**, *15*, 168–173.
- Skerritt, J. H.; Hill, A. S.; Beasley, H. L.; Edward, S. L.; McAdam, D. P. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Quantitation of Organophosphate Pesticides Fenitrothion, Chlorpyriflos-Methyl, and Pirimiphos-Methyl in Wheat Grain and Flour-milling Fractions. *J. AOAC Int.* **1992**, *75*, 519–528.
- Skerritt, J. H.; Guihot, S. L.; McDonald, S. E.; Culvenor, R. A. Development of Immunoassays for Tyramine and Tryptamine Toxins of *Phalaris aquatica* L. *J. Agric. Food Chem.* **2000**, *48*, 27–32.
- Smith, D. S.; Eremin, S. A. Fluorescence Polarization Immunoassays and Related Methods for Simple, High-Throughput Screening of Small Molecules. *Anal. Bioanal. Chem.* **2008**, *391*, 1499–1507.

- Smoker, C. M.; Chamkasem, N.; Thompson, R.; Satterfield, G.; Masse, C.; Mercer, G.; Smith, R. E. Collaborative Validation of the QuEChERS Procedure for the Determination of Pesticides in Food by LC–MS/MS. *J. Agric. Food Chem.* **2011**, *59*, 6383–6411.
- Soler, C.; Mañes, J.; Picó, Y. Liquid Chromatography–Electrospray Quadrupole Ion–Trap Mass Spectrometry of Nine Pesticides in Fruits. *J. Chromatogr., A* **2004**, *1048*, 41–49.
- Song, D.; Hsu, L. F.; Au, J. L. Binding of Taxol to Plastic and Glass Containers and Protein under *in vitro* Conditions. *J. Pharm. Sci.* **1996**, *85*, 29–31.
- Spinks, C. A.; Wyatt, G. M.; Lee, H. A.; Morgan, M. R. Molecular Modeling of Hapten Structure and Relevance to Broad Specificity Immunoassay of Sulfonamide Antibiotics. *Bioconjugate Chem.* **1999**, *10*, 583–588.
- Sreenath, K.; Venkatesh, Y. P. Quantification of Xylitol in Foods by an Indirect Competitive Immunoassay. *J. Agric. Food Chem.* **2010**, *58*, 1240–1246.
- Staerk, D.; Lemmich, E.; Christensen, J.; Kharazmi, A.; Olsen, C. E.; Jaroszewski, J. W. Leishmanicidal, Antiplamodial and Cytotoxic Activity of Indole Alkaloids from *Corynanthe Pachyceras*. *Planta Med.* **2000**, *66*, 531–536.
- Štajnbaher, D.; Zupancic–Kralj, L. Multiresidue Method for Determination of 90 Pesticides in Fresh Fruits and Vegetables Using Solid–Phase Extraction and Gas Chromatography–Mass Spectrometry. *J. Chromatogr., A* **2003**, *1015*, 185–198.
- Stanker, L. H.; Beier, R. C. Introduction to Immunoassays for Residue Analysis: Concepts, Formats, and Applications. *Immunoassays or Residue Analysis. Food Safety*. American Chemical Society: Washington D. C., **1996**, vol. 621, pp 2–16.
- Stead, S. L.; Ashwin, H.; Johnston, B. H.; Dallas, A.; Kazakov, S. A.; Tarbin, J. A.; Sharman, M.; Kay, J.; Keely, B. J. An RNA–Aptamer–Based Assay for the Detection and Analysis of Malachite Green and Leucomalachite Green Residues in Fish Tissue. *Anal. Chem.* **2010**, *82*, 2652–2660.
- Strachan, S. D.; Hess, F. D. Dinitroaniline Herbicides Adsorb to Glass. *J. Agric. Food Chem.* **1982**, *30*, 389–391.
- Suárez–Pantaleón, C.; Mercader, J. V.; Agulló, C.; Abad–Somovilla, A.; Abad–Fuentes, A. Production and Characterization of Monoclonal and Polyclonal Antibodies to Forchlorfenuron. *J. Agric. Food Chem.* **2008**, *56*, 11122–11131.
- Suárez–Pantaleón, C.; Mercader, J. V.; Agulló, C.; Abad–Somovilla, A.; Abad–Fuentes, A. Hapten Synthesis and Polyclonal Antibody–Based Immunoassay Development for the Analysis of Forchlorfenuron in Kiwifruit. *J. Agric. Food Chem.* **2010**, *58*, 8502–8511.
- Suárez–Pantaleón, C.; Mercader, J. V.; Agulló, C.; Abad–Somovilla, A.; Abad–Fuentes, A. Forchlorfenuron–Mimicking Haptens: From Immunogen Design to Antibody Characterization by Hierarchical Clustering Analysis. *Org. Biomol. Chem.* **2011**, *9*, 4863–4872.
- Sun, J.; Dong, T.; Zhang, Y.; Wang, S. Development of Enzyme Linked Immunoassay for the Simultaneous Detection of Carbaryl and Metolcarb in Different Agricultural Products. *Anal. Chim. Acta* **2010**, *666*, 76–82.
- Szurdoki, F.; Szekacs, A.; Le, H.; Hammock, B. Synthesis of Haptens and Protein Conjugates for the Development of Immunoassays for the Insect Growth Regulator Fenoxycarb. *J. Agric. Food Chem.* **2002**, *50*, 29–40.

- Takase, A.; Kai, H.; Masui, M.; Masumoto, K.; Nakamura, A.; Kiyoshima, Y.; Sasaki, M. Process for Producing Carboxylic Acid Derivates. US5510506. **1996**.
- Takeda, K.; Agaki, Y.; Saiki, A.; Tsukahara, T.; Ogura, H. Convenient Methods for Synthesis of Active Carbamates, Ureas and Nitrosoureas using *N,N'*-Disuccinimido Carbonate (DSC). *Tetrahedron Lett.* **1983**, *24*, 4569–4572.
- Takino, M.; Daishima, S.; Yamaguchi, K. Determination of Diquat and Paraquat in Water by Liquid Chromatography/Electrospray–Mass Spectrometry Using Volatile Ion–Pairing Reagents. *Anal. Sci.* **2000**, *16*, 707–711.
- Takuma, K.; Kakimizu, A.; Kusaba, T. (1999). Method for Producing Benzyl Bromide Derivates. US5962723. **1999**.
- Tamarit–López, J.; Morais, S.; Bañuls, M. J.; Puchades, R.; Maquieira, A. Development of Hapten–Linked Microimmunoassays on Polycarbonate Discs. *Anal. Chem.* **2010**, *82*, 1954–1963.
- Tamarit–López, J.; Morais, S.; Puchades, R.; Maquieira, A. Direct Hapten–Linked Multiplexed Immunoassays on Polycarbonate Surface. *Biosens. Bioelectron.* **2011**, *26*, 2694–2698.
- Taylor, M.; Hoffman, T.; Yli–Kauhaluoma, J.; Lerner, R.; Janda, K. A Light–Activated Antibody Catalyst. *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 12783–12790.
- Taylor, M. J.; Kenneth Hunter, K.; Hunter, K. B.; Lindsay, D.; Le Bouhellec, S. Multi–residue Method for Rapid Screening and Confirmation of Pesticides in Crude Extracts of Fruits and Vegetables Using Isocratic Liquid Chromatography with Electrospray Tandem Mass Spectrometry. *J. Chromatogr., A* **2002**, *982*, 225–236.
- Tessier, D. M.; Clark, J. M. Hapten Design in the Development of Competitive Enzyme–Linked Immunosorbent Assays for Genotoxic Metabolites of Alachlor. *J. Agric. Food Chem.* **1999**, *47*, 3925–3933.
- Tiecco, M.; Testaferri, L.; Tingoli, M.; Bartoli, D.; Balducci, R. Ring–Closure Reactions Initiated by the Peroxydisulfate Ion Oxidation of Diphenyl Diselenide. *J. Org. Chem.* **1990**, *55*, 429–434.
- Tsumuraya, T.; Fujii, I.; Inoue, M.; Tatami, A.; Miyazaki, K.; Hiram, M. Production of Monoclonal Antibodies for Sandwich Immunoassay Detection of Ciguatoxin 51–Hydroxy CTX3C. *Toxicon* **2006**, *48*, 287–294.
- Tuomola, M.; Harpio, R.; Mikola, H.; Knuutila, T.; Lindstrom, M.; Mikkala, V. M.; Matikainen, M. T.; Lovgren, T. Production and Characterization of Monoclonal Antibodies against a Very Small Hapten, 3–Methylindole. *J. Immunol. Methods* **2000**, *240*, 111–124.
- Ustinov, A. V.; Shmanai, V. V.; Patel, K.; Stepanova, I. A.; Prokhorenko, I. A.; Astakhova, I. V.; Shchepinov, M. S. Reactive Trityl Derivatives: Stabilised Carbocation Mass–Tags for Life Sciences Applications. *Org. Biomol. Chem.* **2008**, *6*, 4593–4608.
- Uttley, N. Panorama de precios para los productos químicos para la agricultura en el año 2008. *Enigma Marketing Research* **2009**.
[http:// www.enigmamarketingresearch.com](http://www.enigmamarketingresearch.com)
- Vaidyanathan, G.; Zalutsky, M. R. Synthesis of *N*-Succinimidyl 4–18F Fluorobenzoate, an Agent for Labeling Proteins and Peptides with 18F. *Nat. Protocols* **2006**, *1*, 1655–1661.
- Valera, E.; Ramón–Azcón, J.; Barranco, A.; Alfaro, B.; Sánchez–Baeza, F.; Marco, M. P.; Rodríguez, A. Determination of Atrazine Residues in Red Wine Samples. A Conductimetric Solution. *Food Chem.* **2010**, *122*, 888–894.

- Vallejo, R. P.; Bogus, E. R.; Mumma, R. O. Effects of Hapten Structure and Bridging Groups on Antisera Specificity in Parathion Immunoassay Development. *J. Agric. Food Chem.* **1982**, *30*, 572–580.
- VanWeemen, B. L.; Schuur, A. H. W. M. Immunoassay Using Antigen Enzyme Conjugates. *FEBS Lett.* **1971**, *15*, 232–236.
- Verch, T.; Bakhtiar, R. Miniaturized Immunoassays: Moving Beyond the Microplate. *Bioanalysis* **2012**, *4*, 177–188.
- Viñas, P.; Campillo, N.; Martínez–Castillo, N.; Hernández–Córdoba, M. Method Development and Validation for Strobilurin fungicides in Baby Foods by Solid–Phase Microextraction Gas Chromatography Mass Spectrometry. *J. Chromatogr., A* **2009**, *1216*, 140–146.
- Vuik, J.; van der Poll, J. M.; Vink, R.; de Vos, R. H. Adsorption Experiments of Etridiazole and Oxamyl on Polyethylene Sheets and Poly(vinyl chloride) Tubing Used in Horticulture. *J. Agric. Food Chem.* **1990**, *38*(1), 328–330.
- Walser, A.; Flynn, T.; Mason, C.; Crowley, H.; Maresca, C.; O'Donnell, M. Thienotriazolodiazepines as Platelet–Activating Factor Antagonists. Steric Limitations for the Substituent in Position 2. *J. Med. Chem.* **1991**, *34*, 1440–1446.
- Walter, M. A.; Panne, U.; Weller, M. G. A Novel Immunoreagent for the Specific and Sensitive Detection of the Explosive Triacetone Triperoxide (TATP). *Biosensors* **2011**, *1*, 93–106.
- Wang, S.; Allan, R. D.; Skerret, J. H.; Kennedy, I. R. Development of a Class–Specific Competitive ELISA for the Benzoylphenylurea Insecticides. *J. Agric. Food Chem.* **1998**, *46*, 3330–3338.
- Wang, S.; Allan, R. D.; Skerret, J. H.; Kennedy, I. R. Development of a Compound–Specific ELISA for Flufenoxuron and Improved Class–Specific Assay for Fenzoylphenylurea Insect Growth Regulators. *J. Agric. Food Chem.* **1999**, *47*, 3416–3424.
- Wang, H.; Hu, J.; Zhang, H.; Li, J. Comparative Study of Three Solid–Phase Extraction Sorbents for Determination of Kresoxim–methyl Residues in Cucumber and Soil. *Can. J. Anal. Sci. and Spec.* **2007a**, *52*, 199–206.
- Wang, Z.; Zhu, Y.; Ding, S.; He, F.; Beier, R. C.; Li, J.; Jiang, H.; Feng, C.; Wan, Y.; Zhang, S.; Kai, Z.; Yang, X.; Shen, J. Development of a Monoclonal Antibody–Based Broad–Specificity ELISA for Fluoroquinolone Antibiotics in Foods and Molecular Modeling Studies of Cross–Reactive Compounds. *Anal. Chem.* **2007b**, *79*, 4471–4483.
- Wang, S. T.; Gui, W. J.; Guo, Y. R.; Zhu, G. N. Preparation of a Multi–Hapten Antigen and Broad Specificity Polyclonal Antibodies for a Multiple Pesticide Immunoassay. *Anal. Chim. Acta* **2007c**, *587*, 287–292.
- Wang, S.; Wei, Y. Z.; Jin, H. M.; Li, C. B.; Du, H. W. A 96–Well Plate Based Dot–ELISA Array for Simultaneous Detection of Multi–Drugs. *Anal. Lett.* **2009**, *42*, 2807–2819.
- Wang, H. L.; Zou, G. P.; Li, J. Z. Analysis of Enestroburin Residues in Wheat an Soil by Solid Phase Extraction and High–Performance Liquid Chromatography. *Anal. Lett.* **2010**, *43*, 381–392.
- Wang, H.; Li, Y.; Wang, A.; Slavik, M. Rapid, Sensitive, and Simultaneous Detection of Three Foodborne Pathogens Using Magnetic Nanobead–Based Immunoseparation and Quantum Dot–Based Multiplex Immunoassay. *J. Food Protect.* **2011a**, *74*, 2039–3047.

- Wang, H. Q.; Wu, Z.; Tang, L. J.; Yu, R. Q.; Jian-Hui Jiang, J. H. Fluorescence Protection Assay: a Novel Homogeneous Assay Platform Toward Development of Aptamer Sensors for Protein Detection. *Nucleic Acids Res.* **2011b**, 1–7.
- Wang, Z.; Zhang, J.; Zhang, S.; Shen, J. Heterologous Structure of Coating Antigen on Sensitivity of ELISA for Sulfamethazine: Evidence from Molecular Similarity Analysis. *Food Agric. Immunol.* **2011c**, 22, 115–124.
- Wang, R.; Wang, Z.; Yang, H.; Wang, Y.; Deng, A. Highly Sensitive and Specific Detection of Neonicotinoid Insecticide Imidacloprid in Environmental and Food Samples by a Polyclonal Antibody-Based Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. *J. Sci. Food Agric.* **2012**, 92, 1253–1260.
- Warsinke, A.; Benkert, A.; Scheller, F. W. Electrochemical Immunoassays. *J. Anal. Chem.* **2000**, 366, 622–634.
- Watanabe, E.; Kanzaki, Y.; Tokumoto, H.; Hoshino, R.; Kubo, H.; Nakazawa, H. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Based on a Polyclonal Antibody for the Detection of the Insecticide Fenitrothion. Evaluation of Antiserum and Application to the Analysis of Water Samples. *J. Agric. Food Chem.* **2002**, 50, 53–58.
- Watanabe, E.; Eun, H.; Baba, K.; Arao, T.; Endo, S.; Ueji, M.; Ishii, Y. Synthesis of Haptens for Development of Antibodies to Alkylphenols and Evaluation and Optimization of a Selected Antibody for ELISA Development. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, 53, 7395–7403.
- Watanabe, E.; Miyake, S.; Ito, S.; Baba, K.; Eun, H.; Ishizaka, M.; Endo, S. Reliable Enzyme Immunoassay Detection for Chlorothalonil: Fundamental Evaluation for Residue Analysis and Validation with Gas Chromatography. *J. Chromatogr., A* **2006**, 1129, 273–282.
- Watanabe, E.; Miyake, S. Immunoassay for Iprodione : Key Estimation for Residue Analysis and Method Validation with Chromatographic Technique. *Anal. Chim. Acta* **2007**, 583, 370–376.
- Watanabe, E.; Kubo, H.; Kanzaki, Y.; Nakazawa, H. Immunoassay Based on a Polyclonal Antibody for Sex Steroid Hormones Produced by a Heterogeneous Hapten-Conjugated Immunogen: Estimation of its Potentiality and Antibody Characteristics. *Anal. Chim. Acta* **2010**, 658, 56–62.
- Weber, W.; Anke, T.; Bross, M.; Steglich, W. Strobilurin D and Strobilurin F: Two New Cytostatic and Antifungal (E)- β -Methoxyacrylate Antibiotics from *Cyphellopsis anomala* (1). *Planta Med.* **1990a**, 56, 446–450.
- Weber, W.; Anke, T.; Steffan, B.; Steglich, W. Antibiotics from Basidiomycetes. XXXII. Strobilurin E: a New Cytostatic and antifungas (E)- β -Methoxyacrylate Antibiotic from *Crepidotus fulvotomentosus* Peck. *J. Antibiot.* **1990b**, 43, 207–212.
- Weimar, T.; Harris, S. L.; Pitner, J. B.; Bock, K.; Pinto, B. M. Transferred Nuclear Overhauser Enhancement Experiments Show That the Monoclonal Antibody Strep 9 Selects a Local Minimum Conformation of a Streptococcus Group a Trisaccharide Hapten. *Biochemistry* **1995**, 34, 13672–13681.
- Wenderoth, B.; , Anke, T.; Rentzea, C.; Ammermann, E.; Pommer, E. H.; Steglich, W. Oxime Ethers and Fungicides Containing these Compounds. US04829085. **1989**.
- Wenderoth, B; Brand, S.; Schuetz, F.; Sauter, H.; Ammermann, E.; Lorenz, G. Substituted Hydrazines and Fungicides Containing these Compounds. US4956387. **1990**.

- Wenderoth, B.; Sauter, H.; Wingert, H.; Hepp, M.; Brand, S.; Kuekenhouhner, T.; Roehl, F.; Ammermann, E.; Lorenz, G. Oxime Ethers and Fungicides Containing Same. US5145980. **1992**.
- Wheelock, C. E.; Miller, J. L.; Miller, M. J.; Phillips, B. M.; Gee, S. J.; Tjeerdema, R. S.; Hammock, B. D. Influence of Container Adsorption upon Observed Pyrethroid Toxicity to *Ceriodaphnia dubia* and *Hyalella azteca*. *Aquat Toxicol.* **2005**, *74*, 47–52.
- Wie, S. I.; Hammock, B. D. Development of Enzyme–Linked Immunosorbent Assay for Residue Analysis of Dibenzuron and BAY SIR 8514. *J. Agric. Food Chem.* **1982**, *30*, 949–957.
- Wing, K. D.; Hammock, B. D.; Wustner, D. A. Development of an S–Bioallethrin Specific Antibody. *J. Agric. Food Chem.* **1978**, *26*, 1328–1333.
- Wingert, H.; Wolf, B.; Benoit, R.; Sauter, H.; Hepp, M.; Grammenos, W.; Kuekenhoehner, T. Preparation of E–Oxime Ethers of Phenylglyoxylic Esters. DE4042283. **1990**.
- Wingert, H.; Wolf, B.; Benoit, R.; Sauter, H.; Hepp, M.; Grammenos, W.; Kuekenhoehner, T. Preparation of E–Oxime Ethers of Phenylglyoxylic Esters. US5221726. **1993**.
- Wingert, H.; Keil, M. Preparation of Oxime Ethers. US5780624. **1998**.
- Winkle, M. R.; Lansinger, J. M.; Ronald, R. C. 2,5 –Dimethoxybenzyl Alcohol : a Convenient Self –indicating Standard for the Determination of Organolithium Reagents. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **1980**, 87–88.
- Wood, K.A.; Kau, D.A.; Wrigley, S. K.; Beneyto, R.; Renno, D.V.; Ainsworth, A.M.; Penn, J.; Hill, D.; Killacky, J.; Depledge, P. Novel β –Methoxyacrylates of the 9–Methoxystrobilurin and Oudemansin Classes Produced by the Basidiomycete *Favolaschia pustulosa*. *J. Nat. Prod.* **1996**, *59*, 646–649.
- Wright, S. W.; Hageman, D. L.; Wright, A. S.; Lester D. McClure, L. D. Convenient Preparations of *t*–Butyl Esters and Ethers from *t*–Butanol. *Tetrahedron Lett.* **1997**, *38*, 7345–7348.
- Wright, R. M.; Dudas, D.; Gavin, B.; Dottavio, D.; Hexham, J. M.; Lake, P. A High–Capacity Alkaline Phosphatase Reporter System for the Rapid Analysis of Specificity and Relative Affinity of Peptides from Phage–Display Libraries. *J. Immunol. Methods* **2001**, *253*, 223–232.
- Wu, H. L.; Wu, P. Y.; Shen, Y. Y.; Uang, B. J. Asymmetric Addition of Dimethylzinc to α –Ketoesters Catalyzed by (–)–MITH. *J. Org. Chem.* **2008**, *16*, 6445–6447.
- Xia, D.; Yu, C.A.; Kim, J.Z.; Kachurin, A.M.; Zhang, L.; Yu, L.; Deisenhofer, J. Crystal Structure of the Cytochrome bc(1) Complex from Bovine Heart Mitochondria. *Science* **1997**, *277*, 60–66.
- Xu, T.; Shao, X. L.; Li, Q. X.; Keum, Y. S.; Jing, H. Y.; Sheng, W.; Li, J. Development of an Enzyme–Linked Immunosorbent Assay for the Detection of Pentachloronitrobenzene Residues in Environmental Samples. *J. Agric. Food Chem.* **2007**, *55*, 3764–3770.
- Xu, Z. L.; Shen, Y. D.; Beier, R. C.; Yang, J. Y.; Lei, H. T.; Wang, H.; Sun, Y. M. Application of Computer–Assisted Molecular Modeling for Immunoassay of Low Molecular Weight Food Contaminants: A Review. *Anal. Chim. Acta* **2009**, *647*, 125–136.
- 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. 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. *Anal Chim Acta.* **2009b**, *647*, 90–96.

- Xu, Z. X.; Gao, H. J.; Zhang, L. M.; Chen, X. Q.; Qiao, X. G. The Biomimetic Immunoassay Based on Molecularly Imprinted Polymer: A Comprehensive Review of Recent Progress and Future Prospects. *J. Food Sci.* **2011**, *76*, 69–75.
- Xu, Z. L.; Deng, H.; Deng, X. F.; Yang, J. Y.; Jiang, Y. M.; Zeng, D. P.; Huang, F.; Shen, Y. D.; Lei, H. T.; Wanga, H.; Sun, Y. M. Monitoring of Organophosphorus Pesticides in Vegetables Using Monoclonal Antibody–Based Direct Competitive ELISA followed by HPLC–MS/MS. *Food Chem.* **2012**, *131*, 1569–1576.
- Yalow, R. S.; Berson, S.A. Assay of Plasma Insulin in Human Subjects by Immunological Methods. *Nature* **1959**, *184*, 1648–1649.
- Yang, L.; Zhao, X.; Zhou, J. Selective Enrichment and Determination of Nicosulfuron in Water and Soil by a Stir Bar Based on Molecularly Imprinted Polymer Coatings. *Anal. Chim. Acta* **2010**, *670*, 72–77.
- Yin, w. W.; Liu, J. T.; zhang, T. C.; Li, W. H.; Liu, W.; Meng, M.; He, F. Y.M Wan, Y. P.; Feng, C. W.; Wang, S. L.; Lu, X. A.; Xi, R. Preparation of Monoclonal Antibody for Melamine and Development of an Indirect Competitive ELISA for Melamine Detection in Raw Milk, Milk Powder, and Animal Feeds. *J. Agric. Food Chem.* **2010**, *58*, 8152–8157.
- Ypema, H. L.; Gold, R. E. Kresoxim–methyl: Modification of a Naturally Occurring Compound to Produce a New Fungicide. *Plant Disease* **1999**, *83*, 4–19.
- Yuan, J.; Deng, D.; Lauren, D. R.; Aguilar, M. I.; Wu, Y. Surface Plasmon Resonance Biosensor for the Detection of Ochratoxin A in Cereals and Beverages. *Anal. Chim. Acta* **2009**, *656*, 63–71.
- Yuan, M.; Liu, B.; Liu, E.; Sheng, W.; Zhang, Y.; Crossan, A.; Kennedy, I.; Wang, S. Immunoassay for Phenylurea Herbicides: Application of Molecular Modeling and Quantitative Structure–Activity Relationship Analysis on an Antigen–Antibody Interaction Study. *Anal. Chem.* **2011**, *83*, 4767–4774.
- Zambonin, C.G.; Quinto, M.; De Vietro, N.; Palmesano, F. Solid–Phase Microextraction – Gas Chromatography Mass Spectrometry: A Fast and Simple Screening Method for the Assessment of Organophosphorus Pesticides Residues in Wine and Fruit Juices. *Food Chem.* **2004**, *86*, 269–274.
- Zhang, Y.; Liu, J. W.; Zheng, W. J.; Wang, L.; Zhang, H. Y.; Fang, G. Z.; Wang, S. Optimization and Validation of Enzyme–Linked Immunosorbent Assay for the Determination of Endosulfan Residues in Food Samples. *J. Environ. Sci. Health, Part B* **2008**, *43*, 127–133.
- Zhang, K.; Wong, J. W.; Hayward, D. G.; Sheladia, P.; Krinitsky, A. J.; Schenck, F. J.; Webster, M. G.; Ammann, J. A.; Ebeler, S. E. Multiresidue Pesticide Analysis of Wines by Dispersive Solid–Phase Extraction and Ultrahigh–Performance Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry. *J. Agric. Food Chem.* **2009**, *57*, 4019–4029.
- Zhang, H. Y.; Wang, S. Review on Enzyme–Linked Immunosorbent Assay for Sulfonamide Residues in Edible Animal Products. *J. Immunol. Methods* **2009**, *350*, 1–13
- Zhang, Q.; Zhang, W.; Wang, X.; Li, P. Immunoassay Development for the Class–Specific Assay for Types I and II Pyrethroid Insecticides in Water Samples. *Molecules* **2010**, *15*, 164–177.
- Zhang, C. A.; Yang, C. L.; Liu, X. J.; Chen, M.; Yu, J. An Indirect Enzyme–Linked Immunosorbent Assay for Determination of New Herbicide H–9201 in Water. *Chin. J. Anal. Chem.* **2011**, *39*, 225–230.

- Zhao, J.; Yi, G. X.; He, S. P.; Wang, B. M.; Yu, C. X.; Li, G.; Zhai, Z. X.; Li, Z.; Li, Q. X. Development of a Monoclonal Antibody–Based Enzyme–Linked Immunosorbent Assay for the Herbicide Chlorimuron–Ethyl. *J. Agric. Food Chem.* **2006**, *54*, 4948–4953.
- Zhao, M. P.; Zhou, s.; Yan, J.; Li, L. Immunochemical Analysis of Endogenous and Exogenous Estrogens. *Curr. Pharm. Anal.* **2007**, *3*, 25–38.
- Zhou, J.; Belov, L.; Huang, P. Y.; Shin, J. S.; Solomon, M. J.; Chapuis, P.H.; Bokey, L.; Chan, C.; Clarke, C.; Clarke, S. J.; Christopherson, R. I. Surface Antigen Profiling of Colorectal Cancer using Antibody Microarrays with Fluorescence Multiplexing. *J. Immunol. Methods.* **2010**, *355*, 40–51.
- Zhu, Z.; Zhang, R.; Yuan, L.; Ni, Y. Process for Preparation of Trifloxystrobin. CN1560027. **2005**.
- Zhu, G.; Jin, M.; Gui, W.; Guo, Y.; Jin, R.; Wang, C.; Liang, C.; Liu, Y.; Wang, S. Development of a Direct Competitive Enzyme–Linked Immunoassay for Carbofuran in Vegetables. *Food Chem.* **2008**, *107*, 1737–1742.
- Ziegler, H.; Neff, D.; Stutz, W. Process for Preparation of Arylacetic Ester via Palladium Catalyzed Cross Coupling Reaction. WO9520569–A1. **1995**.
- Ziegler, H.; Neff, D.; Stutz, W. Process for Preparation of Arylacetic Ester via Palladium Catalyzed Cross Coupling Reaction. US576343. **1998**.
- Ziegler, H.; Benet–Buchholz, J.; Etzel, W.; Gayer, H. Trifloxystrobin: a New Strobilurin Fungicide with an Outstanding Biological Activity. *Pflanzenschutz–Nachrichten* **2003**, *56*, 213–230.