







VNIVERSITAT  
E VALÈNCIA

**F**acultat de **Q**ímica  
Departament de Química Orgànica



Instituto de Agroquímica  
y Tecnología de Alimentos



Departamento de Biotecnología

**Programa de Doctorado en Química (3056, RD 1393/2007)**

# **Desarrollo de métodos inmunoquímicos para el análisis en alimentos de fungicidas inhibidores de la succinato deshidrogenasa**

**Eric Ceballos Alcantarilla**

Trabajo realizado 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 (IATA–CSIC) bajo la dirección del Dr. Josep Vicent Mercader Badia para optar al grado de Doctor en Química.

Valencia, Mayo de 2017



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

**D. Josep Vicent Mercader Badia**, 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 en alimentos de fungicidas inhibidores de la succinato deshidrogenasa**, ha sido realizada bajo su dirección por el Licenciado en Química **Eric Ceballos Alcantarilla** en el Departamento de Química Orgánica (Universidad de Valencia) y en el Departamento de Biotecnología (Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos) y autorizan su presentación para que sea calificada como tal

Y para que así conste a los efectos oportunos y a petición del interesado, se expide el presente certificado en Burjassot a 26 de mayo de 2017.

Fdo. Dr. Antonio Abad Somovilla

Fdo. Dr. Josep V. Mercader Badia



***“Reírse de todo es propio de tontos, pero no reírse  
de nada lo es de estúpidos”***

Erasmus de Rotterdam



# AGRADECIMIENTOS

A pesar de que en la portada de un trabajo como éste sólo figure el nombre del autor y de sus directores, una Tesis Doctoral nunca podría desarrollarse sin la colaboración de un conjunto más o menos grande de personas, que aportan su particular granito de arena para conformar el resultado final. Por ello, me gustaría expresar brevemente en estas líneas mi agradecimiento a todas aquellas personas que, de alguna manera, han contribuido a la realización de esta Tesis Doctoral.

En primer lugar, quiero agradecer a mis directores, el Dr. Antonio Abad Somovilla y el Dr. Josep V. Mercader, por darme la oportunidad de realizar todo este trabajo, por su accesibilidad, por su ayuda y paciencia (especialmente en el tramo final), y sobre todo por confiar en mí y haberme dejado libertad total para trabajar, algo que valoro enormemente. Gracias a ellos he aprendido muchísimo durante estos años, en su mayoría cosas que antes de empezar el doctorado nunca creí que fuera a conocer, y he ganado mucha autonomía como investigador y científico.

Al Dr. Antonio Abad Fuentes por su interés, por sus buenos consejos y por haberme enseñado con toda la paciencia del mundo casi todo lo que sé sobre cultivos celulares. A la Dra. Consuelo Agulló por su gran ayuda durante los primeros meses de trabajo, por sus animadas conversaciones cotidianas y por velar por el orden del laboratorio (lo cual ayuda mucho a que todo funcione), a pesar de tener que regañarnos por ello de vez en cuando. Al Dr. Francesc Esteve por estar siempre dispuesto a ayudar con cualquier cosa y en especial con los temas analíticos, por su cercanía y compañerismo, y por el buen ambiente que genera allá donde esté sin darse cuenta.

Al personal de las secciones del SCSIE de la Universitat de València que han participado en las diferentes partes del trabajo: Espectrometría de Masas, Resonancia Magnética Nuclear, Proeómica, Producción Animal y Microscopía. Al Dr. José M. Guillamón y a Sara Muñiz por su inestimable ayuda en la preparación de vinos, tanto conceptual como práctica. Al Dr. José Gimeno por haberme instruido en la purificación de anticuerpos monoclonales y por su predisposición y amabilidad. Al Dr. José M. Coll por sus consejos sobre el manejo del Biacore cuando más perdido estaba.

He de agradecer también a la Universitat de València la concesión de una ayuda predoctoral del Subprograma “Atracció de Talent” de VLC-CAMPUS, que me ha servido

tanto de sustento económico como para poder dedicarme brevemente a la docencia, algo que siempre había querido hacer. En cuanto a las entidades financiadoras, esta tesis se ha llevado a cabo dentro del proyecto “Estrategias immunoanalíticas para la detección rápida en alimentos de fitosanitarios de nueva generación inhibidores de la succinato deshidrogenasa” (AGL2012-39965-C02-01/02), financiado por el Ministerio de Economía y Competitividad y cofinanciado por el Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER).

Quiero expresar especialmente mi agradecimiento a todos mis compañeros del departamento de química orgánica: Alicia, Meli, Miguel, Marc, Amparo, Lode, Andrea, Marcos, Javi, Guillermo, Víctor, Nuria, Ana, Carlos, Dani y Hadyn. Podría decir algo bueno de todos y cada uno, pero entonces esto pasaría a convertirse en otro capítulo de la tesis, así que sencillamente diré que gracias a todos por hacer más llevadero el día a día, por su amistad y compañerismo, y por haber compartido con ellos muy buenos momentos estos últimos años que siempre echaré de menos (especialmente cuando los señores Marcos y Guillermo andaba cerca, cómo olvidarse de todo ello...). No me olvido de Ruth, Marta y Luis, con los que no he coincidido durante el trabajo experimental pero con los que me he divertido mucho estos últimos meses fuera del laboratorio, cosa que espero seguir haciendo en próximas cenas y otros eventos.

También quiero dar las gracias a mis compañeros del IATA: Ramón, Paula y Jennifer. A él le deseo mucha suerte con su ya empezado trabajo de tesis; a ellas les agradezco su labor de mantener siempre el laboratorio en condiciones y facilitar así mucho el trabajo diario, en mi caso durante el último año de tesis, así como su ayuda con algunos experimentos de última hora. Gracias también por los buenos ratos dentro y fuera del laboratorio, y por estar siempre pensando en planes chulos para hacer (tomarse un simple McFlurry en McDonalds después de la celebración del 50 aniversario del IATA tuvo su encanto).

Para ir terminando, agradezco a mis familiares su apoyo e interés durante estos años, aun sin saber en muchos casos qué era exactamente lo que estaba haciendo. Gracias a mis padres por haberme apoyado incondicionalmente siempre y por haberse interesado a lo largo de la tesis en cómo iba avanzando el trabajo, así como por haber hecho el esfuerzo de casi no interrumpirme durante estos últimos meses de encierro de cara al ordenador. Gracias también a los familiares de Mónica, especialmente a Carlos y M<sup>a</sup> Jesús, por acogerme muchos días en su casa como uno más de la familia, así como por la aportación de las muestras de ciruela; a mi *cuñi* Elena, por sus

disparates diarios que en días duros me sacaban y me sacan una sonrisa; y a mi *cuasisobrina* Sara, por su interés en este trabajo (ya me queda poco de cuasidoctor...), por las buenas tertulias de desconexión que hemos tenido con ella cuando nos hacía falta tanto a Mónica como a mí, y por no dejar nunca de sorprenderme.

Finalmente, le doy las gracias a Mónica por ser mi punto de apoyo principal, por escucharme siempre que se lo pido, por aguantarme estos últimos meses en "*modo escritura*", por su empatía y altruismo, por preocuparse, por cuidarme, y sin duda por haber contribuido directamente a que esta Tesis Doctoral salga adelante con su trabajo de prácticas de empresa. Gracias preciosa, espero poder hacer lo mismo por ti cuando seas tú la doctoranda.



# ÍNDICE

<b>ABREVIATURAS Y SIGLAS.....</b>	<b>7</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>13</b>
1.1. FUNGICIDAS INHIBIDORES DE LA SUCCINATO DESHIDROGENASA .....	13
1.1.1. Piridinil etil benzamidas: Fluopyram .....	17
1.1.1.1. Descubrimiento .....	18
1.1.1.2. Propiedades .....	20
1.1.1.3. Métodos de síntesis.....	22
1.1.2. Pirazol-4-carboxamidas: Penthiopyrad .....	24
1.1.2.1. Descubrimiento .....	25
1.1.2.2. Propiedades .....	26
1.1.2.3. Métodos de síntesis.....	28
1.1.3. Marco legal .....	31
1.1.3.1. Monitorización de residuos de fluopyram y penthiopyrad.....	33
1.2. ANÁLISIS DE RESIDUOS DE PLAGUICIDAS EN ALIMENTOS .....	36
1.2.1. Métodos cromatográficos .....	37
1.2.1.1. Métodos específicos descritos para fluopyram y penthiopyrad.....	38
1.2.2. Métodos inmunoquímicos.....	39
1.3. PREPARACIÓN DE INMUNORREACTIVOS .....	41
1.3.1. Moléculas pequeñas: Síntesis de haptenos como etapa clave .....	41
1.3.1.1. Recursos para el diseño racional de haptenos funcionalizados.....	44
1.3.2. Preparación de conjugados proteína–hapteno.....	45
1.3.3. Generación de anticuerpos específicos.....	48
1.3.3.1. Estructura y clases de inmunoglobulinas .....	48
1.3.3.2. Tipos de anticuerpos según su modo de generación.....	50
1.3.3.3. Obtención de anticuerpos monoclonales .....	51

1.3.4. Métodos alternativos de inmunización .....	55
1.3.4.1. Conjugados basados en nanotubos de carbono .....	61
1.4. DESARROLLO DE INMUNOENSAYOS.....	64
1.4.1. Caracterización de anticuerpos y diseño del inmunoensayo.....	64
1.4.1.1. ELISA competitivo y sus distintos formatos .....	65
1.4.1.2. Evaluación cinética y termodinámica.....	71
1.4.2. Optimización de la sensibilidad: Uso de haptenos heterólogos .....	74
1.4.3. Validación y aplicación del inmunoensayo.....	76
<b>2. OBJETIVOS .....</b>	<b>79</b>
<b>3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>	<b>81</b>
3.1. SÍNTESIS DE HAPTENOS PARA FLUOPYRAM.....	81
3.1.1. Diseño y análisis retrosintético de haptenos para fluopyram.....	82
3.1.2. Síntesis del hapteno <i>FPa</i> .....	84
3.1.3. Síntesis del hapteno <i>FPb</i> .....	89
3.1.4. Síntesis del hapteno <i>FPha</i> : Obtención del hapteno <i>FPha'</i> .....	95
3.1.5. Síntesis del hapteno <i>FPhb</i> .....	99
3.2. SÍNTESIS DE HAPTENOS PARA PENTHIOPYRAD.....	102
3.2.1. Diseño y análisis retrosintético de haptenos para penthiopyrad .....	102
3.2.2. Síntesis del hapteno <i>PPa</i> .....	104
3.2.3. Síntesis del hapteno <i>PPb</i> .....	111
3.2.4. Síntesis de los haptenos <i>PPm</i> y <i>PPo</i> .....	115
3.2.5. Síntesis del hapteno <i>PPd</i> : Obtención del hapteno <i>PPd'</i> .....	117
3.3. PREPARACIÓN DE CONJUGADOS PROTEÍNA–HAPTENO .....	120
3.3.1. Preparación de ésteres activos.....	120
3.3.2. Conjugación de haptenos activados a proteínas.....	123
3.4. GENERACIÓN Y EVALUACIÓN DE ANTICUERPOS POLICLONALES.....	128
3.4.1. Generación de anticuerpos policlonales .....	128
3.4.2. Evaluación de la afinidad de los anticuerpos policlonales .....	129

3.4.2.1. Formato de anticuerpo inmovilizado con detección directa .....	130
3.4.2.2. Formato de conjugado inmovilizado con detección indirecta .....	136
3.4.3. Estudio de la especificidad de los anticuerpos policlonales.....	141
3.5. GENERACIÓN Y EVALUACIÓN DE ANTICUERPOS MONOCLONALES.....	145
3.5.1. Generación, cuantificación e isotipación de anticuerpos .....	145
3.5.2. Evaluación de la afinidad de los anticuerpos monoclonales.....	149
3.5.2.1. Formato de anticuerpo inmovilizado con detección directa .....	150
3.5.2.2. Formato de conjugado inmovilizado con detección indirecta .....	155
3.5.3. Especificidad de los anticuerpos monoclonales.....	160
3.5.4. Determinación de constantes cinéticas y termodinámicas.....	163
3.5.4.1. Estudio mediante resonancia de plasmones superficiales .....	164
3.5.4.2. Estudio mediante ELISA competitivo .....	167
3.6. INMUNIZACIÓN CON CONSTRUCTOS DE NANOTUBOS DE CARBONO.....	171
3.6.1. Preparación de inmunógenos basados en nanotubos .....	172
3.6.2. Caracterización de constructos .....	177
3.6.3. Evaluación inmunológica (I). Respuesta inmunitaria secundaria.....	180
3.6.4. Evaluación inmunológica (II). Efecto adyuvante .....	185
3.6.5. Efectos secundarios de la inmunización con nanotubos.....	189
3.7. OPTIMIZACIÓN Y DESARROLLO DE INMUNOENSAYOS .....	191
3.7.1. Selección de inmunoensayos.....	191
3.7.2. Influencia del pH y de la fuerza iónica.....	193
3.7.3. Influencia de la presencia de disolventes orgánicos .....	198
3.7.4. Características de los inmunoensayos desarrollados.....	201
3.8. VALIDACIÓN Y APLICACIÓN DE INMUNOENSAYOS .....	203
3.8.1. Obtención de muestras .....	204
3.8.2. Estudio de los efectos matriz.....	207
3.8.3. Análisis de muestras fortificadas.....	213
3.8.4. Validación frente a un método analítico de referencia.....	219

3.8.5. Estudio de transferencia de fungicidas de la uva al vino .....	226
<b>4. CONCLUSIONES .....</b>	<b>229</b>
<b>5. SECCIÓN EXPERIMENTAL .....</b>	<b>233</b>
5.1. REACTIVOS, INSTRUMENTOS Y TÉCNICAS GENERALES .....	233
5.1.1. Síntesis de haptenos .....	233
5.1.2. Modelización molecular .....	236
5.1.3. Preparación de conjugados proteína–hapteno .....	236
5.1.4. Producción de anticuerpos y cultivos celulares .....	237
5.1.5. Disoluciones y tampones .....	239
5.1.6. Inmunoensayos .....	239
5.1.7. Resonancia de plasmones superficiales .....	240
5.1.8. Cromatografía de líquidos .....	241
5.1.9. Muestras de campo .....	241
5.1.10. Inmunógenos basados en nanotubos de carbono .....	242
5.2. SÍNTESIS DE PRECURSORES DE BRAZOS ESPACIADORES .....	243
5.3. SÍNTESIS DE HAPTENOS PARA FLUOPYRAM .....	245
5.3.1. Síntesis del hapteno <i>F<sub>P</sub>a</i> .....	245
5.3.2. Síntesis del hapteno <i>F<sub>P</sub>b</i> .....	251
5.3.3. Síntesis del hapteno <i>F<sub>P</sub>h<math>\alpha</math>'</i> .....	259
5.3.4. Síntesis del hapteno <i>F<sub>P</sub>h<sub>b</sub></i> .....	265
5.4. SÍNTESIS DE HAPTENOS PARA PENTHIOPYRAD .....	269
5.4.1. Síntesis del hapteno <i>PP<sub>a</sub></i> .....	269
5.4.2. Síntesis del hapteno <i>PP<sub>b</sub></i> .....	277
5.4.3. Síntesis de los haptenos <i>PP<sub>m</sub></i> y <i>PP<sub>o</sub></i> .....	282
5.4.4. Síntesis del hapteno <i>PP<sub>d</sub>'</i> .....	285
5.5. PREPARACIÓN DE CONJUGADOS PROTEÍNA–HAPTENO .....	286
5.5.1. Activación de haptenos .....	286
5.5.1.1. Procedimiento general de activación .....	286

5.5.1.2. Activación de los haptenos para fluopyram.....	286
5.5.1.3. Activación de los haptenos para penthiopyrad.....	288
5.5.2. Conjugación de haptenos a BSA, OVA y HRP.....	290
5.5.3. Determinación de la densidad hapténica.....	292
5.6. GENERACIÓN DE ANTICUERPOS POLICLONALES.....	293
5.7. GENERACIÓN DE ANTICUERPOS MONOCLONALES.....	294
5.7.1. Inmunización de ratones.....	294
5.7.2. Generación de hibridomas.....	295
5.7.3. Obtención de antisueros de ratón.....	296
5.7.4. Aislamiento y conservación de hibridomas de interés.....	296
5.7.5. Obtención y purificación de anticuerpos monoclonales.....	297
5.8. ELISA COMPETITIVO.....	298
5.8.1. Formato de anticuerpo inmovilizado con detección directa.....	298
5.8.2. Formato de conjugado inmovilizado con detección indirecta.....	299
5.8.3. Lectura y tratamientos matemático y gráfico de resultados.....	300
5.9. CARACTERIZACIÓN DE ANTICUERPOS.....	301
5.9.1. Evaluación de la afinidad.....	301
5.9.2. Evaluación de la especificidad.....	303
5.9.3. Isotipación de anticuerpos monoclonales.....	303
5.9.4. Caracterización de anticuerpos monoclonales mediante SPR.....	304
5.9.4.1. Preparación de la superficie de análisis.....	304
5.9.4.2. Análisis cinético de las interacciones anticuerpo/penthiopyrad.....	305
5.10.OPTIMIZACIÓN Y DESARROLLO DE INMUNOENSAYOS.....	306
5.10.1.Optimización de concentraciones de inmunorreactivos.....	306
5.10.2.Optimización de la curva estándar.....	307
5.10.3.Influencia del pH.....	307
5.10.4.Influencia de la fuerza iónica.....	309
5.10.5.Tolerancia a disolventes orgánicos.....	309

5.11.VALIDACIÓN Y APLICACIÓN DE LOS INMUNOENSAYOS .....	310
5.11.1. Obtención de muestras de campo de ciruela y uva .....	310
5.11.1.1. Preparación y modo de aplicación de fungicidas .....	310
5.11.1.2. Muestras de ciruela .....	310
5.11.1.3. Muestras de uva .....	311
5.11.2. Obtención de extractos de muestras de ciruela y uva .....	311
5.11.3. Obtención de mostos y vinos .....	312
5.11.4. Evaluación del efecto matriz de extractos, mostos y vinos.....	313
5.11.5. Análisis de extractos de ciruela y uva mediante UPLC–MS/MS.....	313
5.11.6. Análisis de extractos, mostos y vinos mediante inmunoensayo.....	314
5.11.6.1. Análisis de muestras fortificadas.....	314
5.11.6.2. Análisis de muestras de campo .....	315
5.11.7. Validación de inmunoensayos frente a un método de referencia.....	315
5.11.8. Estudio de transferencia de fungicidas de la uva al vino .....	316
5.12.INMUNÓGENOS BASADOS EN NANOTUBOS DE CARBONO .....	316
5.12.1. Activación y funcionalización de nanotubos .....	316
5.12.2. Preparación y caracterización de constructos inmunogénicos.....	317
5.12.3. Inmunización de animales y generación de antisueros.....	319
5.12.4. Evaluación de antisueros .....	320
<b>6. REFERENCIAS .....</b>	<b>321</b>
<b>ANEXO I. ESPECTROS DE RMN SELECCIONADOS .....</b>	<b>341</b>
<b>ANEXO II. ESPECTROS MALDI–TOF .....</b>	<b>347</b>
<b>ANEXO III. TABLAS DE DATOS .....</b>	<b>353</b>

## ABREVIATURAS Y SIGLAS

753-A-OH	<i>N</i> -(2-(4-Hidroxi-4-metilpentan-2-il)tiofen-3-il)-1-metil-3-(trifluorometil)-1 <i>H</i> -pirazol-4-carboxamida
753-F-DO	<i>N</i> -(2-Hidroxi-2-(4-metilpentan-2-il)-5-oxo-2,5-dihidrofuran-3-il)-1-metil-3-(trifluorometil)-1 <i>H</i> -pirazol-4-carboxamida
A	Absorbancia
A <sub>0</sub>	Absorbancia en ausencia de analito
Ac	Acetilo
Ac <sub>2</sub> O	Anhídrido acético
AcOEt	Acetato de etilo
AECOSAN	Agencia Española de Consumo, Seguridad Alimentaria y Nutrición
A <sub>máx</sub>	Señal máxima del ensayo
A <sub>mín</sub>	Señal mínima del ensayo
AOAC	<i>Association of Analytical Communities</i>
A <sub>sat</sub>	Señal máxima obtenida en condiciones de saturación
A <sub>tampón</sub>	Absorbancia de la curva control
ATR	Reflectancia total atenuada
BC-723	2-Cloro- <i>N</i> -(1,1,3-trimetil-2,3-dihidro-1 <i>H</i> -inden-4-il)nicotinamida
Bn	Bencilo
Boc	<i>tert</i> -Butoxicarbonilo
Boc <sub>2</sub> O	Dicarbonato de di- <i>tert</i> -butilo
br	Señal espectroscópica ancha
BSA	Seroalbúmina bovina
Bz	Benzoilo
CCF	Cromatografía en capa fina
CEN	<i>Comité Européen de Normalisation</i>
CNT	Nanotubo(s) de carbono
COSY	Correlación homonuclear <sup>1</sup> H
d	Doblete
DART	Análisis directo en tiempo real
DAST	Trifluoruro de dietilaminoazufre
DCC	<i>N,N'</i> -Diciclohexilcarbodiimida

## Abreviaturas

---

DCE	1,2-Dicloroetano
DEG	Dietilenglicol
DEM	Dietoximetano
DEPT	Incremento sin distorsión por transferencia de polarización
DHFR	Dihidrofolato reductasa
DIPEA	<i>N,N</i> -Diisopropiletilamina
DMAC	<i>N,N</i> -Dimetilacetamida
DMEM	Medio Eagle modificado por Dulbecco
DMF	<i>N,N</i> -Dimetilformamida
DMI	1,3-Dimetil-2-imidazolidinona
DM-PCA	Ácido 3-(trifluorometil)-1 <i>H</i> -pirazol-4-carboxílico
DMSO	Dimetilsulfóxido
dppf	1,1'-Bis(difenilfosfino)ferroceno
<i>dr</i>	Proporción de diastereoisómeros
DSC	Carbonato de <i>N,N'</i> -disuccinimidilo
ECD	Detector de captura de electrones
EDC	1-Etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida
EFSA	<i>European Food Safety Authority</i>
ELISA	Ensayo de inmunoadsorción ligado a enzima
EMAR	Espectrometría de masas de alta resolución
ES	Electrospray
Et	Etilo
Et <sub>2</sub> O	Éter etílico
Et <sub>3</sub> SiH	Trietilsilano
EtOH	Etanol
EUCP	<i>European Union Coordinated Pesticide Control Program</i>
F-427	<i>N</i> -([1,1'-bifenil]-2-il)-2-metil-5,6-dihidro-1,4-oxatina-3-carboxamida
Fab	Fragmento de unión a antígeno
FAD	Flavín adenín dinucleótido
FAO	<i>Food and Agriculture Organization of United Nations</i>
Fc	Fragmento que cristaliza
FC	Fluopicolide
FP	Fluopyram

FRAC	<i>Fungicide Resistance Action Comitee</i>
FX	Fluxapyroxad
<i>g</i>	Aceleración gravitatoria terrestre (9.81 m/s <sup>2</sup> )
GAM	Anticuerpo de cabra anti-inmunoglobulinas de ratón
GAR	Anticuerpo de cabra anti-inmunoglobulinas de conejo
GC	Cromatografía de gases
<i>gem-</i>	Geminal
Gly·HCl	Hidrocloreuro de glicina
Grubbs-2	(1,3-Bis(2,4,6-trimetilfenil)-2-imidazolidiniliden)dicloro(fenilmetileno)(triciclohexil fosfina)rutenio(II)
HAT	Suplemento o medio de cultivo con hipoxantina, aminopterina y timidina
HEPES	Ácido 2-(4-(2-hidroxietil)piperazin-1-il)etano-1-sulfónico
HFCS	Suplemento de fusión y clonaje para hibridomas
HGPRT	Hipoxantina guanidina fosforribosil transferasa
HOAc	Ácido acético
HPLC	Cromatografía líquida de elevada eficacia
HRP	Peroxidasa de rábano picante
HSQC	Correlación cuántica sencilla heteronuclear <sup>1</sup> H– <sup>13</sup> C
HT	Suplemento o medio de cultivo con hipoxantina y timidina
<i>I</i>	Fuerza iónica
IC <sub>50</sub>	Concentración de analito que reduce en un 50% la señal máxima
IC <sub>α</sub>	Concentración de analito que inhibe la señal máxima un porcentaje α
IE	Impacto electrónico
Ig	Inmunoglobulina
IR	Espectroscopía infrarroja
ISO	<i>International Standardization Organization</i>
K <sub>A</sub>	Constante de afinidad
k <sub>a</sub>	Constante de velocidad de asociación
K <sub>D</sub>	Constante de equilibrio de disociación
k <sub>d</sub>	Constante de velocidad de disociación
LD <sub>50</sub>	Dosis letal 50%
LMR	Límite máximo de residuo
LOD	Límite de detección

## Abreviaturas

---

log P <sub>ow</sub>	Logaritmo del coeficiente de reparto octanol/agua
m	Multiplete
m/m	Relación masa/masa
m/v	Relación masa/volumen
m/z	Relación masa/carga
M25	2-(trifluorometil)benzamida
mAb	Anticuerpo monoclonal
MALDI	Desorción-ionización láser asistida por matriz
Me	Metilo
MeOH	Metanol
MHC II	Complejo principal de histocompatibilidad de clase II
MS	Espectrometría de masas
MS/MS	Espectrometría de masas en tándem
MW	Microondas
Mw	Peso molecular
MWNT	Nanotubo(s) de carbono de pared múltiple
NaOAc	Acetato de sodio
NBS	<i>N</i> -Bromosuccinimida
NEAA	Aminoácidos no esenciales
NHS	<i>N</i> -Hidroxisuccinimida
NHSS	Sal sódica de <i>N</i> -hidroxisulfosuccinimida
NIS	<i>N</i> -Iodosuccinimida
NMP	<i>N</i> -metilpirrolidona
OPD	<i>orto</i> -fenilendiamina
OVA	Ovoalbúmina
PAA	Ácido 2-(3-cloro-5-(trifluorometil)piridin-2-il)acético
pAb	Anticuerpo policlonal
PAM	1-Metil-3-(trifluorometil)-1 <i>H</i> -pirazol-4-carboxamida
PB	Tampón fosfato sódico 100 mM, pH 7.4
PB10	Tampón fosfato sódico 10 mM, pH 7.4
PBS	Tampón fosfato salino (fosfato sódico 10 mM, pH 7.4, 140 mM NaCl)
PCA	Ácido 3-cloro-5-(trifluorometil)picolínico / ácido 1-metil-3-(trifluorometil)-1 <i>H</i> -pirazol-4-carboxílico

---

Pd/C	Paladio adsorbido sobre carbono
PDP	<i>Pesticide Data Program</i>
PEG	Polietilenglicol
Pf	Punto de fusión
Ph	Fenilo / Anillo de benceno
phen	1,10-Fenantrolina
PP	Penthiopyrad
ppm	Partes por millón
PPTS	<i>para</i> -Toluenosulfonato de piridinio
PSA	Amina primaria/secundaria
PTSA	Ácido <i>para</i> -toluenosulfónico
PVP	Poli(4-vinilpiridina)
Py	Piridina / Anillo de piridina
Py·HCl	Cloruro de piridinio
PyAOP	Hexafluorofosfato de 7-azabenzotriazol-1-il-oxitris(pirrolidino)fosfonio
Pz	Anillo de pirazol
q	Cuadruplete
QuEChERS	<i>Quick, easy, cheap, effective, rugged and safe</i>
R	Coeficiente de recuperación
RAM	Anticuerpo de conejo anti-inmunoglobulinas de ratón
RC	Reactividad cruzada
RIA	Radioinmunoensayo
RM	Relación molar hapteno/proteína
RMN	Resonancia magnética nuclear
RU	Unidades de resonancia
s	Singlete
SBA	Suero bovino de adulto
SBF	Suero bovino fetal
SDHI	Inhibidor(es) de la succinato deshidrogenasa
S <sub>E</sub> Ar	Sustitución electrofílica aromática
<i>spp.</i>	Especies del mismo género
SPR	Resonancia de plasmones superficiales
spt	Septuplete

## Abreviaturas

---

SWNT	Nanotubo(s) de carbono de pared simple
t	Triplete
t.a.	Temperatura ambiente
<sup>t</sup> Bu	<i>terc</i> -butilo
TEM	Microscopía electrónica de transmisión
TFA	Ácido 2,2,2-trifluoroacético
TFAA	Anhídrido 2,2,2-trifluoroacético
Th	Anillo de tiofeno
THF	Tetrahidrofurano
TMS	Tetrametilsilano / trimetilsililo
TOF	Detector de tiempo de vuelo
TPP	Fosfato de trifenilo
UPLC	Cromatografía líquida de eficacia ultraelevada
USDA	<i>United States Department of Agriculture</i>
UV	Ultravioleta
UV/Vis	Ultravioleta/visible
v/v	Relación volumen/volumen
$\delta$	Desplazamiento químico
$\epsilon$	Coefficiente de extinción molar
$\zeta$	Potencial zeta

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1. Fungicidas inhibidores de la succinato deshidrogenasa

La agricultura es una técnica milenaria que, junto a la ganadería, constituye uno de los pilares fundamentales en la alimentación. Sin embargo, los cultivos están expuestos a una serie de elementos que pueden llegar a arruinar las cosechas, fundamentalmente las inclemencias meteorológicas y distintos tipos de plagas. Entre estas últimas se cuentan la competencia del cultivo con plantas indeseadas (malas hierbas), la infestación con insectos y/o ácaros, o las infecciones por hongos. Por ello, ante el ritmo de crecimiento de la población y por tanto de la demanda de alimentos, cada vez es necesario un mayor esfuerzo para controlar o eliminar este tipo de plagas. En este contexto, durante el siglo pasado surgió y creció la industria agroquímica, dedicada a la búsqueda y producción de compuestos químicos con capacidad de controlar plagas debidas a malas hierbas (herbicidas), insectos (insecticidas), ácaros (acaricidas) y hongos (fungicidas), globalmente denominados plaguicidas.

En el caso particular de las infecciones por hongos, algunas de las enfermedades de mayor incidencia en cultivos están causadas por *Botrytis cinerea*, *Alternaria solani*, *Penicillium* spp., *Monilinia* spp., *Rhizoctonia solani* o *Sclerotinia* spp., cuyos efectos se muestran en la Figura 1.1. Para combatirlos, se han introducido fungicidas con diferentes modos de acción que implican la perturbación de las funciones biológicas normales del hongo.<sup>1</sup> Algunas dianas son la síntesis de metabolitos (ácidos nucleicos,

aminoácidos, proteínas, lípidos, etc.), la alteración de elementos estructurales (citoesqueleto, proteínas motoras, membrana y/o pared celular, etc.) o de la transducción de señales y, muy especialmente, el bloqueo de la respiración celular.



Moho gris en fresa  
(*Botrytis cinerea*)



Tizón temprano en patata  
(*Alternaria solani*)



Moho verde en naranja  
(*Penicillium digitatum*)

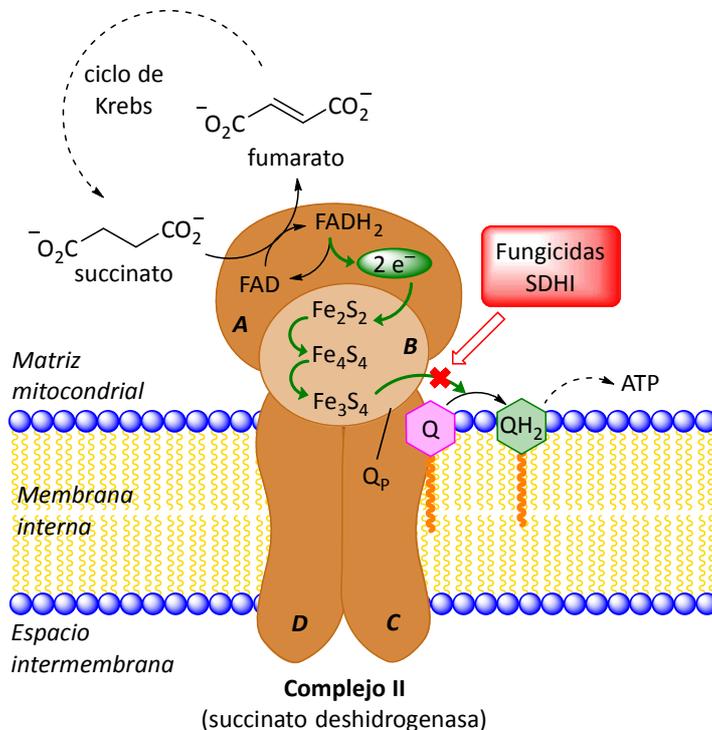


Podredumbre blanca en fresa  
(*Sclerotinia sclerotiorum*)

**Figura 1.1.** Ejemplos de cultivos infectados con los hongos que causan algunas de las enfermedades más frecuentes. Imágenes tomadas de [www.apsnet.org](http://www.apsnet.org)

Entre los muchos principios activos que bloquean la respiración celular se incluye la familia de los inhibidores de la succinato deshidrogenasa (SDHI, de sus siglas en inglés), englobados en el grupo 7 definido por el Comité de Prevención de Resistencia a Fungicidas (FRAC, *Fungicide Resistance Action Comitee*).<sup>2</sup> Los primeros fungicidas de este grupo fueron carboxin y oxycarboxin, introducidos por Uniroyal Chemical respectivamente en 1968 y 1971, capaces de combatir enfermedades causadas por basidiomicetos como *Rhizoctonia* spp. o *Ustilago* spp y todavía empleados para el tratamiento de semillas.<sup>3,4</sup> Sin embargo, la aparición de resistencias frente a los primeros SDHI y su limitado espectro de acción hicieron perder importancia al grupo durante mucho tiempo, hasta que a principios de este siglo renació el interés por esta familia con la introducción de nuevos compuestos con efectividad igual o superior y sobretodo con un mayor espectro de acción.<sup>5</sup>

Como su propio nombre indica, los SDHI dirigen su carácter antifúngico al complejo multienzimático denominado succinato deshidrogenasa o complejo II de la cadena respiratoria mitocondrial del hongo atacado (Figura 1.2). El complejo II, que en el proceso de respiración celular cataliza la reacción de oxidación del succinato a fumarato en el ciclo de Krebs acoplada a la reducción de ubiquinona (Q) a ubiquinol ( $\text{QH}_2$ ), está formado por la unión de una flavoproteína (A), una proteína ferrosulfurada (B) con tres *clusters* hierro–azufre ( $\text{Fe}_2\text{S}_2$ ,  $\text{Fe}_4\text{S}_4$  y  $\text{Fe}_3\text{S}_4$ ) y dos proteínas hidrofóbicas para la unión del complejo a la membrana interna mitocondrial (C y D). Los dos electrones procedentes del succinato son recogidos por la coenzima FAD integrada en la estructura de A, y después son transportados a través de los *clusters* hierro–azufre de B hasta llegar a  $\text{Fe}_3\text{S}_4$ . En este punto, la ubiquinona embebida en la misma membrana se aproxima a la zona conocida como  $\text{Q}_p$ , donde recibe los electrones de  $\text{Fe}_3\text{S}_4$  y se reduce a ubiquinol, que continuaría el proceso de respiración celular. La acción de los SDHI reside precisamente en el bloqueo de esta última transferencia electrónica por unión a sitios muy cercanos a  $\text{Q}_p$ , por lo que se bloquean simultáneamente el ciclo de Krebs y la respiración celular, produciéndose así la muerte del hongo.<sup>6</sup>

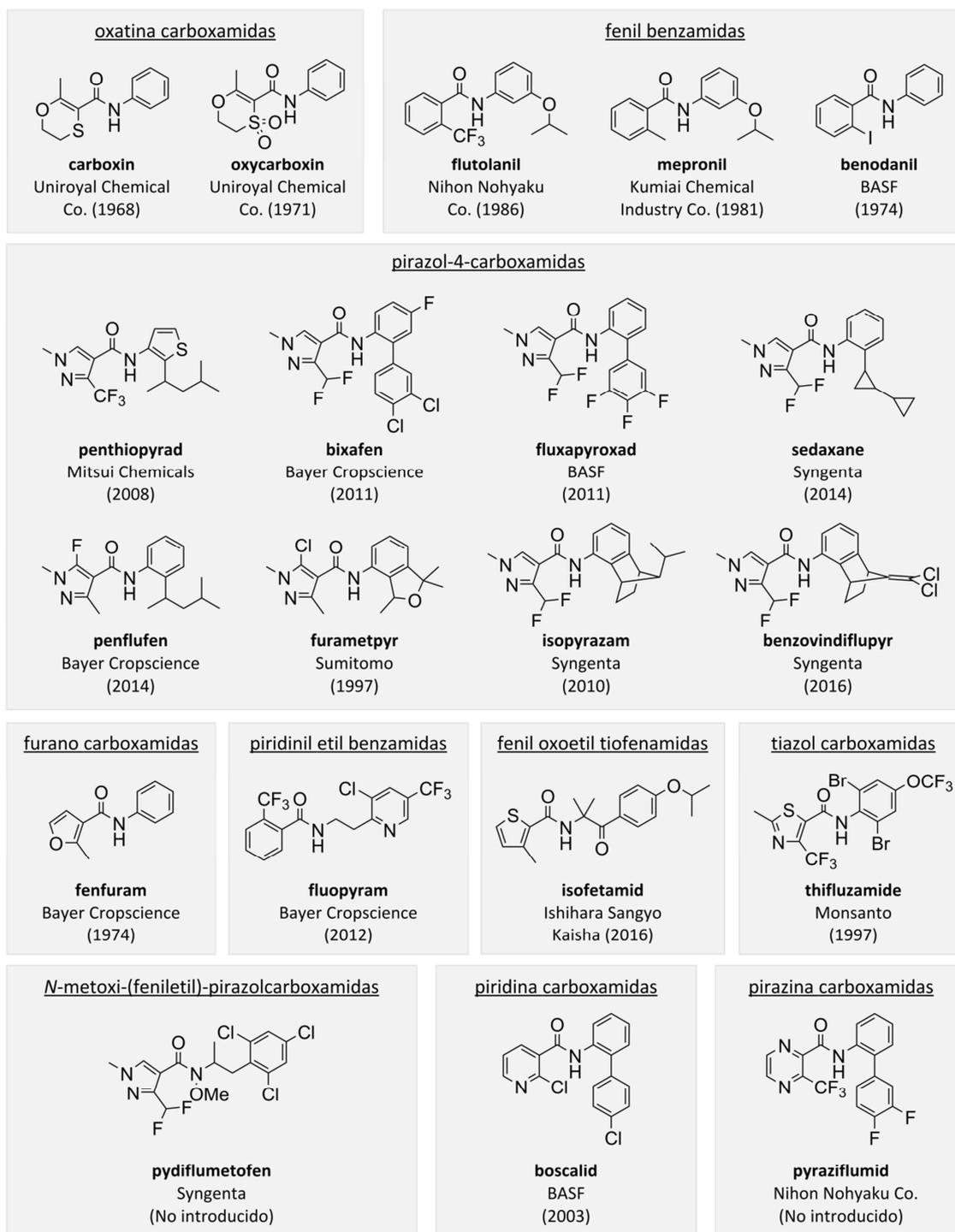


**Figura 1.2.** Representación esquemática de la acción de los fungicidas SDHI sobre el complejo II de la cadena respiratoria mitocondrial (succinato deshidrogenasa).

Desde el punto de vista estructural, todos los SDHI poseen un enlace amida central que sirve como puente de unión de dos anillos, aunque en algunos casos la longitud de este puente puede incrementarse por la inserción formal de fragmentos alifáticos cortos. En la mayoría de los casos, los anillos citados son ambos aromáticos homo o heterocíclicos. Los SDHI se pueden agrupar según su familia estructural concreta, existiendo hoy por hoy veinte fungicidas con este modo de acción clasificados en diez subclases (Figura 1.3).<sup>1</sup> Siete de ellas constan de un solo componente, mientras que las tres subclases restantes están formadas por al menos dos miembros.

Los SDHI también pueden subclasificarse desde el punto de vista cronológico, lo cual se asocia también a su espectro de acción, su efectividad y la aparición de resistencias. Un primer grupo es el de los principios activos de primera generación, constituido por carboxin, oxycarboxin, benodanil y fenfuram, introducidos entre 1968 y 1974. Como se ha apuntado previamente, estos fungicidas son efectivos contra basidiomicetos pero presentan un reducido espectro de acción, y además se han descrito mutaciones en la succinato deshidrogenasa de los hongos diana que provocan resistencia a la acción de estos fungicidas, principalmente carboxin y oxycarboxin.<sup>7-10</sup> Por ello, entre 1981 y 1997 se introdujo un segundo grupo formado por cuatro nuevos principios activos, dos de los cuales eran igualmente efectivos contra basidiomicetos (mepconil y flutolanil) y otros dos con una mayor efectividad (furametpyr y thifluzamide). No obstante, estos fungicidas no tuvieron un especial interés debido a su elevado coste y a que no ampliaban el espectro de acción, aunque sus propiedades y las de compuestos similares proporcionaron las directrices para la búsqueda de compuestos más eficaces.<sup>11</sup> Fue así como se estableció el último grupo, los SDHI de nueva generación, cuyo origen puede establecerse en 2003 con la introducción de boscalid. Este grupo se caracteriza por presentar igual o mayor efectividad que sus predecesores pero frente a un mayor número de enfermedades causadas por hongos, incluyendo las más relevantes (Figura 1.1)

Desde el lanzamiento de boscalid en 2003 hasta la actualidad, se han incluido en la familia de SDHI otros once compuestos de nueva generación pertenecientes a cinco subclases estructurales diferentes, entre los que se encuentran los dos fungicidas en los que se centra el trabajo de esta Tesis Doctoral: fluopyram, que constituye el único miembro de la subclase de las piridinil etil benzamidas, y penthiopyrad, uno de los ocho miembros de la subclase de las pirazol-4-carboxamidas.

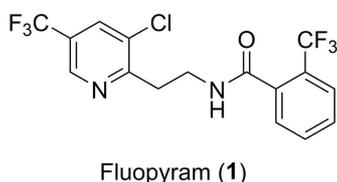


**Figura 1.3.** Fungicidas SDHI englobados actualmente bajo el código 7 del FRAC, clasificados por familia estructural.<sup>1</sup> Para cada uno se especifica su nombre ISO, la empresa responsable de su lanzamiento y el año en el que obtuvo el primer registro.

### 1.1.1. Piridinil etil benzamidas: Fluopyram

Fluopyram es el único miembro de la subclase de fungicidas SDHI denominada piridinil etil benzamidas. Fue el primer fungicida de esta familia en el que los dos

anillos del esqueleto no estaban directamente unidos por el enlace amida, ya que su estructura (Figura 1.4) contiene un puente de etileno intercalado entre el átomo de nitrógeno y el anillo aromático. Esta característica se debe a la forma en que fue descubierto, como se detallará más adelante.



**Figura 1.4.** Estructura ChemDraw del fungicida fluopyram.

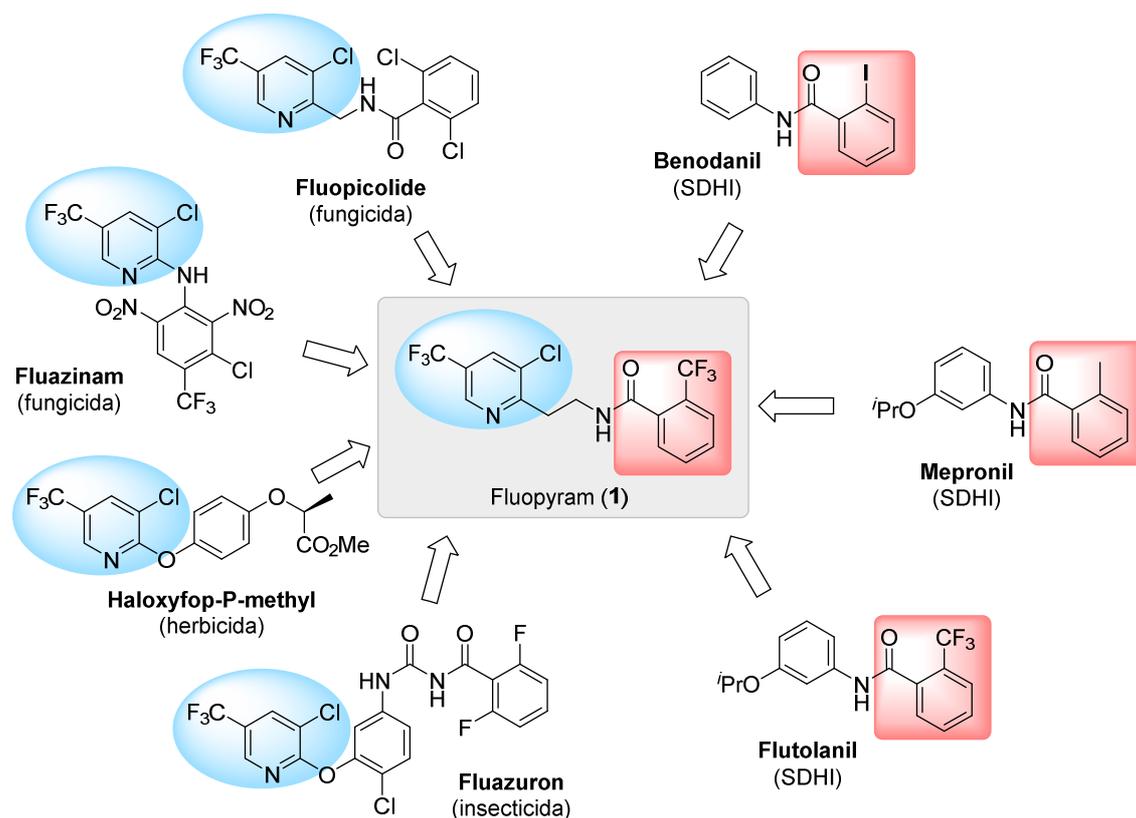
Fluopyram fue desarrollado y protegido por patente en 2004 por Bayer Cropscience<sup>12</sup> y obtuvo su primer registro en Estados Unidos en el año 2012.<sup>13</sup> En Europa, la Comisión Europea autorizó su uso a nivel comunitario en febrero de 2014, mientras que a nivel nacional su uso es legal en 25 de los Estados miembros, incluyendo España.<sup>14</sup> El compuesto es un fungicida SDHI de amplio espectro, recomendado para el tratamiento de un gran número de cultivos de fruta y verdura. Su comercialización se lleva a cabo bajo la denominación Luna<sup>®</sup>, y puede encontrarse solo o formulado con otros fungicidas de diferente modo de acción. En el caso de España, los productos comerciales que contienen fluopyram son Luna<sup>®</sup> Privilege (suspensión concentrada de fluopyram), Luna<sup>®</sup> Experience (fluopyram y tebuconazole), Luna<sup>®</sup> Sensation (fluopyram y trifloxystrobin), Luna<sup>®</sup> Devotion (fluopyram y triadimenol).<sup>15</sup> En otros países también se comercializan otros formulados como Luna<sup>®</sup> Tranquility (fluopyram y pyrimethanil) o Propulse<sup>®</sup> (fluopyram y prothioconazole).<sup>16</sup>

### 1.1.1.1. Descubrimiento

A diferencia de otros fungicidas SDHI que fueron descubiertos a partir de predecesores que compartían el esqueleto general de carboxanilida, fluopyram fue descubierto empleando una estrategia distinta y posteriormente fue ubicado en dicha familia de principios activos de acuerdo al mecanismo de acción que resultó tener.<sup>5</sup> El fungicida fue descubierto mediante una aproximación sintética de tipo “agróforo”, consistente en la preparación y evaluación de moléculas que resultan de la combinación de fragmentos estructurales presentes en otros compuestos con actividad conocida, y que a su vez deberían poseer propiedades adecuadas para aumentar la probabilidad de tener actividad biológica. Así, del mismo modo en que podrían emplearse las reglas de Lipinski como herramienta orientativa en caso de estar

buscando un nuevo fármaco, los investigadores de Bayer Cropscience consideraron que una propiedad adecuada para el fungicida que deseaban desarrollar sería poseer una hidrofobicidad relativamente elevada, reflejada en un valor del logaritmo del coeficiente de reparto octanol/agua ( $\log P_{ow}$ ) entre 2.5 y 4.5.<sup>17,18</sup>

La procedencia de los fragmentos estructurales presentes en fluopyram heredados de otros principios activos se esquematiza en la Figura 1.5. Por una parte, se incluyó el fragmento 3-cloro-5-trifluorometilpiridin-2-ilo presente en moléculas de muy diversa actividad, como los fungicidas fluopicolide (deslocalizador de la espectrina) y fluazinam (desacoplador de la fosforilación oxidativa),<sup>1</sup> el herbicida haloxyfop-P-methyl o el insecticida fluazuron. Del mismo modo, se incorporó también un grupo de tipo benzamida orto-sustituida, dado que se conocían ejemplos de fungicidas SDHI que incorporaban este tipo de fragmentos. Este es el caso de los tres componentes de la subclase de las fenil benzamidas: benodanil, mepronil y flutolanil.



**Figura 1.5.** Estructuras de algunos productos agroquímicos, incluyendo fungicidas SDHI, que sirvieron como modelo para el diseño de fluopyram.

Con todas estas premisas, se sintetizó y evaluó biológicamente una batería de compuestos hasta dar con fluopyram (**1**).<sup>5,12</sup> El resultado fue sorprendente, ya que el

fungicida recién descubierto resultó tener una remarcada actividad de tipo SDHI frente a ascomicetos y despreciable frente a basidiomicetos, cuando el comportamiento clásico de los compuestos de esta familia era justamente el contrario. Durante la evaluación de la batería de candidatos también se comprobó que la actividad era menor frente a ascomicetos cuando el anillo de piridina de fluopyram se hacía homoaromático, y que la actividad frente a basidiomicetos se recuperaba levemente al reemplazar el puente de etileno por un puente de *orto*-fenileno, emulando así las carboxanilidas clásicas pero sin lograr alcanzar la excelente actividad frente a ascomicetos de fluopyram.<sup>5</sup> Por otro lado, llama enormemente la atención que el mecanismo de acción de fluopyram y el de fluopicolide difieran tanto, a pesar del considerable parecido estructural entre ambos.

### 1.1.1.2. *Propiedades*

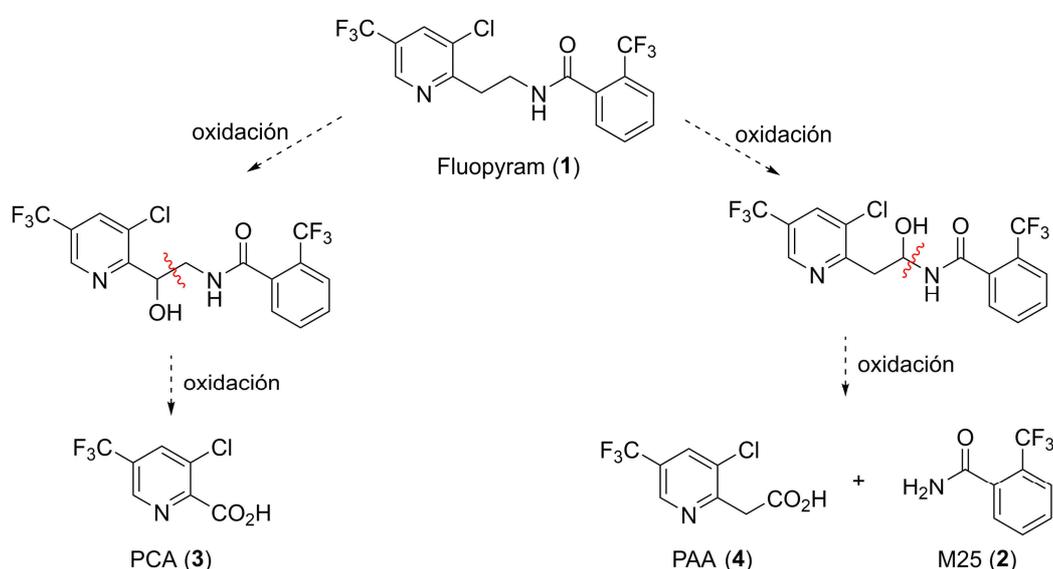
Como el resto de fungicidas SDHI, fluopyram basa su modo de acción en el bloqueo de la respiración celular por inhibición de la succinato deshidrogenasa. Sin embargo, es interesante resaltar que algunas cepas resistentes a otros SDHI no lo son frente a fluopyram, lo que indica que este fungicida posee una mayor actividad intrínseca que otros miembros de su grupo. Del mismo modo, considerando la libertad conformacional que aporta la inclusión del puente de etileno, estas observaciones sugieren que el modo o incluso el sitio de unión de fluopyram al complejo II podría ser ligeramente diferente al de otros componentes de la familia.<sup>5</sup> De hecho, se ha descrito un patrón de resistencia cruzada de boscalid diferente al de fluopyram.<sup>6,19</sup>

Como se ha apuntado anteriormente, aunque fluopyram no es activo frente a oomicetos ni basidiomicetos, y en contraste con los otros SDHI, presenta una actividad inusual frente a un amplio conjunto de ascomicetos, y en muchos casos a dosis menores que otros fungicidas efectivos contra el mismo patógeno. Así, fluopyram puede emplearse con éxito para controlar plagas causadas por *Rhizopus* spp., *Alternaria* spp., *Sclerotinia* spp., *Botrytis* spp., *Monilinia* spp. o *Colletotrichum* spp., entre muchos otros.<sup>5</sup> Además, es un fungicida sistémico, lo que implica que es capaz de desplazarse por todo el organismo huésped y lograr así una protección más eficaz y duradera.<sup>20</sup>

Desde el punto de vista fisicoquímico, fluopyram es un sólido pulverulento blanco inodoro con un punto de fusión de 117.5 °C y una presión de vapor a temperatura ambiente de  $1.2 \cdot 10^{-9}$  kPa, por lo que puede considerarse poco volátil. Por su carácter

hidrofóbico ( $\log P_{ow} = 3.3$ ), el fungicida es poco soluble en agua (16 mg/L), sin observarse dependencia de esta propiedad con el pH, mientras que es soluble en disolventes orgánicos. Así, puede disolverse en un gran número de disolventes polares próticos y apróticos como son la acetona, dimetilsulfóxido (DMSO), acetato de etilo, metanol o diclorometano, mientras que su solubilidad es moderada en tolueno (62.2 g/L) y reducida en disolventes apolares como el heptano (0.66 g/L). Fluopyram no presenta propiedades oxidantes ni reductoras, pero puede comportarse como una base débil debido al anillo de piridina que contiene en su estructura. En cuanto a propiedades espectroscópicas, su espectro de absorción ultravioleta/visible (UV/vis) en acetonitrilo muestra máximos de absorbancia a 216 y 270 nm.<sup>21</sup>

Aunque la absorción de fluopyram por vía oral en mamíferos es rápida (93% en 48 h), los estudios llevados a cabo no han mostrado evidencias de toxicidad aguda por vía oral, dérmica ni inhalatoria. Así, la dosis letal media en ratas ( $LD_{50}$ ) es superior a 2000 mg/kg. Tampoco presenta potencial carácter neurotóxico ni genotóxico, aunque puede ser carcinogénico tras una exposición crónica extensiva.<sup>22,23</sup> Los mismos estudios concluyeron que fluopyram no causa efectos en la fertilidad ni es teratogénico, observándose únicamente efectos de este tipo en ratas y conejos expuestos a las mayores dosis.<sup>21,24</sup>

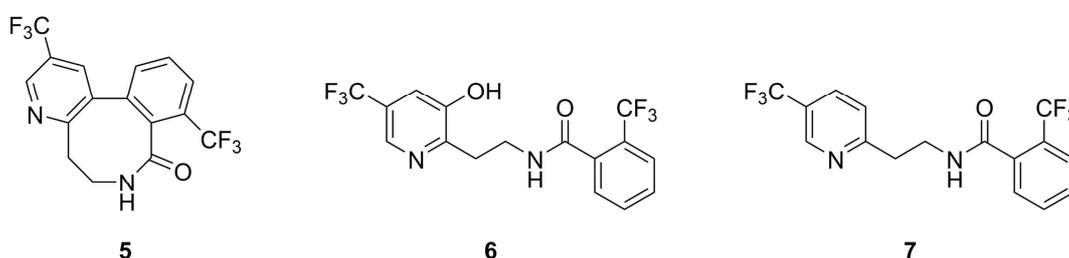


**Esquema 1.1.** Principales metabolitos de fluopyram generados en plantas y su posible modo de formación.

El metabolismo de fluopyram en plantas da lugar a varios compuestos de degradación, siendo los de mayor frecuencia de aparición la benzamida **2**, (fluopyram-benzamida o M25), y los ácidos carboxílicos **3** (PCA) y **4** (PAA).<sup>21,24</sup> Los resultados

obtenidos en estudios con patatas, guisantes y pimientos hacen creer que todos estos metabolitos se forman tras la hidroxilación de una de las dos posiciones del puente de etileno, seguida de la glicosidación de los grupos hidroxilo y de la posterior ruptura (Esquema 1.1).<sup>24</sup> Algo parecido sucede en suelos, donde se degrada y/o metaboliza por acción microbiana lentamente (tiempo de vida media de 239 días en promedio) para dar lugar mayoritariamente a los compuestos **2** y **3**. Fluopyram también parece ser resistente a la hidrólisis, quedando inalterado incluso tras estar 5 días a 50 °C en disoluciones tampón acuosas a pH 4, 7 y 9.<sup>24</sup>

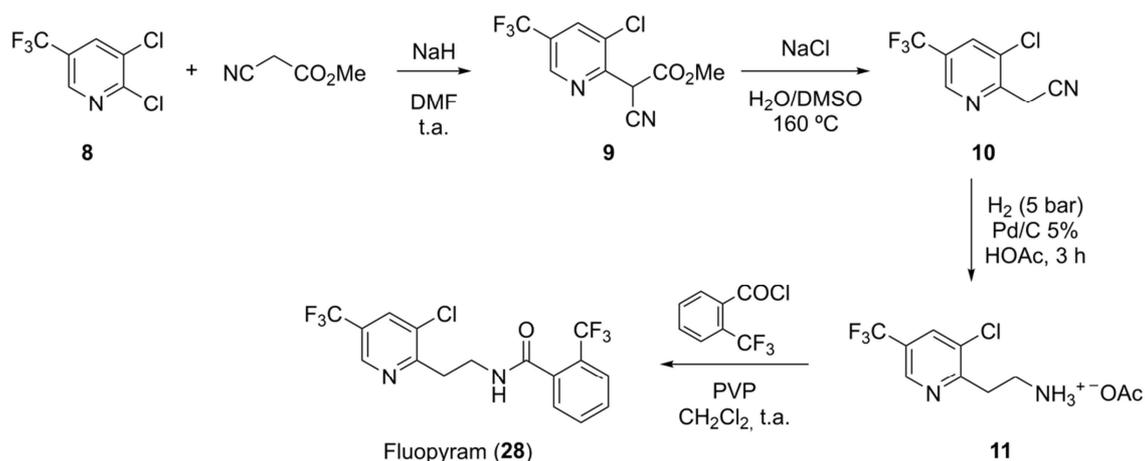
La degradación fotoquímica de fluopyram por acción de la luz solar da lugar principalmente a la lactama **5**, que se cree que se forma por ciclación intramolecular con eliminación de HCl a partir del compuesto en estado electrónico excitado. Otros productos minoritarios observados en presencia de agua son los derivados **6** y **7**, que podrían formarse en el primer caso por sustitución del átomo de cloro de la molécula excitada por un grupo hidroxilo procedente de una molécula de agua, y en el segundo caso por ruptura homolítica del enlace C–Cl seguida de la abstracción de un átomo de hidrógeno de agua (Figura 1.6).<sup>25</sup>



**Figura 1.6.** Principales productos de fotólisis de fluopyram.

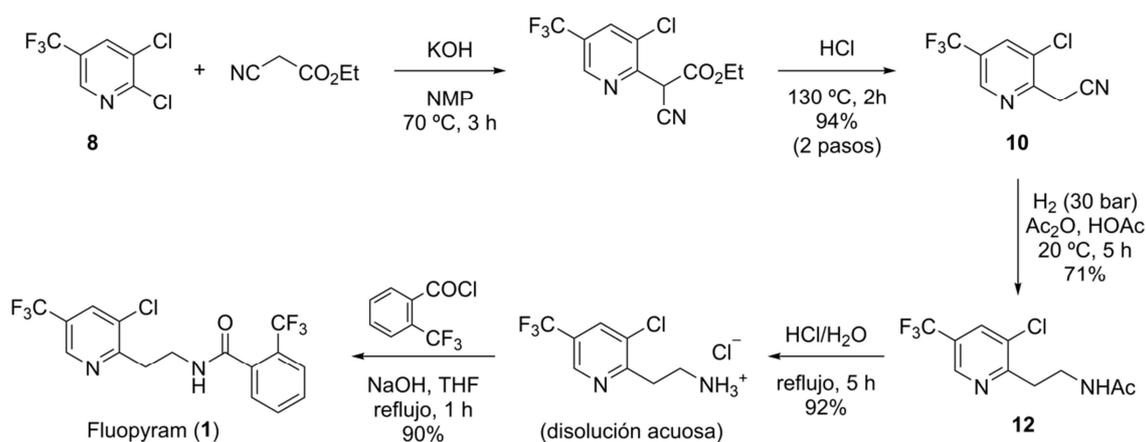
### 1.1.1.3. Métodos de síntesis

La primera secuencia sintética para la obtención de fluopyram fue descrita y protegida por patente en febrero de 2004 (Esquema 1.2).<sup>12</sup> La ruta se inicia con la reacción entre la 2,3-dicloro-5-(trifluorometil)piridina (**8**) y 2-cianoacetato de metilo en presencia de NaH, lo que conduce al producto de sustitución nucleofílica aromática **9**. Posteriormente se procede a su descarboxilación térmica seguida de la reducción del enlace triple C≡N de **10** mediante hidrogenación catalítica con paladio adsorbido sobre carbono (Pd/C) en presencia de ácido acético glacial, lo que origina el acetato de amonio **11**. Por último, fluopyram (**1**) se obtiene al hacer reaccionar **11** con cloruro de 2-(trifluorometil)benzoilo en presencia de la resina básica poli(4-vinilpiridina) (PVP).



**Esquema 1.2.** Ruta original descrita para la síntesis del fungicida fluopyram (**1**).

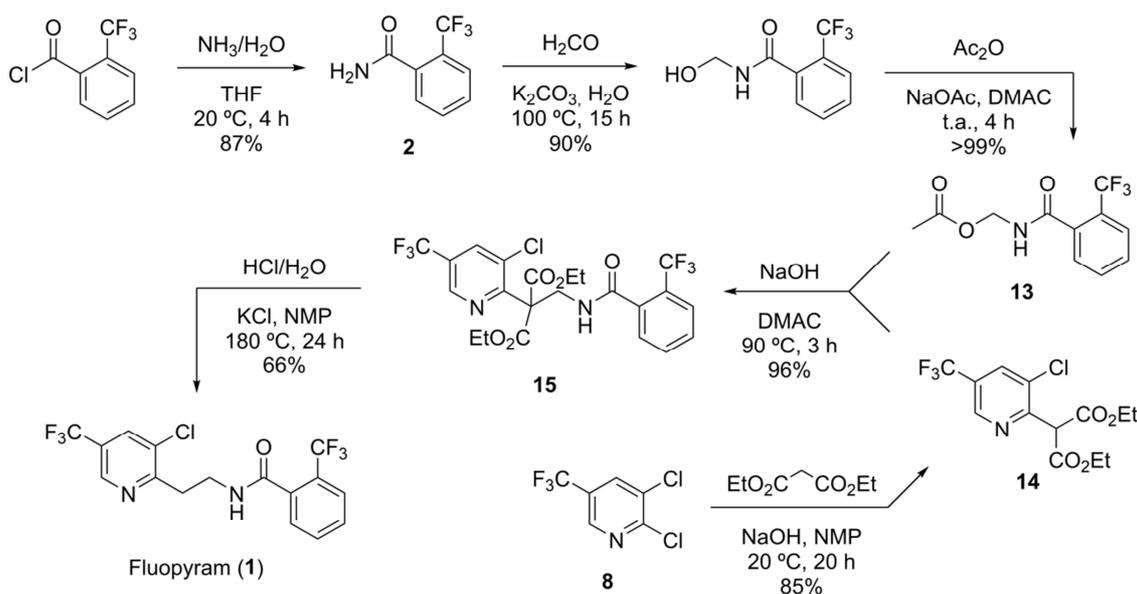
Dos años después se describió una ruta similar basada en la misma estrategia sintética, pero con algunas variaciones en las condiciones de cada etapa (Esquema 1.3).<sup>26</sup> La modificación más destacable es la inclusión de anhídrido acético (Ac<sub>2</sub>O) en la etapa de hidrogenación catalítica de **10**, lo que permite capturar la amina formada *in situ* como la acetamida **12** y aumentar así el rendimiento de la reducción. Aunque esto implique una etapa adicional para la hidrólisis de la acetamida **12** para recuperar la amina libre, el rendimiento global del 65% para las dos etapas es aceptable. En relación a esta etapa de la síntesis, recientemente Bayer Cropscience ha registrado una patente dedicada únicamente a condiciones experimentales para llevar a cabo la hidrogenación de compuestos similares a **10** en una sola etapa con el mayor rendimiento posible.<sup>27</sup>



**Esquema 1.3.** Ruta sintética alternativa para la preparación de fluopyram (**1**) basada en la secuencia originalmente descrita.

Al mismo tiempo, los autores publicaron otra patente describiendo una ruta totalmente alternativa para la preparación del fungicida en la que se evitaba la

controvertida etapa de hidrogenación del nitrilo.<sup>28</sup> Por una parte, a partir de cloruro de 2-(trifluorometil)benzoilo se obtiene la correspondiente amida primaria (**2**), que se trata sucesivamente con formaldehído en medio básico y con Ac<sub>2</sub>O para obtener el derivado **13**. Esta estrategia convierte al átomo de carbono procedente del formaldehído en la estructura de **13** en un buen centro electrofílico, capaz de reaccionar con nucleófilos y expulsando así un potencial anión acetato. Por otra parte, se hace reaccionar 2,3-dicloro-5-trifluorometilpiridina (**8**) con malonato de dietilo para obtener el diéster **14**. Obtenidos los compuestos **13** y **14**, se lleva a cabo el acoplamiento de ambos para dar **15**, aprovechando la facilidad para generar un centro nucleofílico en la unidad de malonato recién introducida en **14** y la ya citada electrofilia de **13**. Finalmente, la doble hidrólisis y descarboxilación de **15** proporciona fluopyram (**1**) con un 50% de rendimiento global a partir del cloruro de ácido de partida, por lo que los autores consideran que esta secuencia puede ser satisfactoriamente empleada a escala industrial.

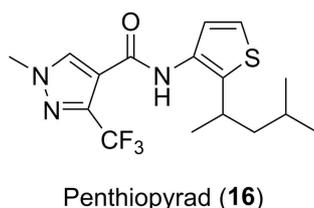


**Esquema 1.4.** Ruta sintética alternativa para la obtención de fluopyram (**1**) que evita posibles etapas de hidrogenación de nitrilos.

### 1.1.2. Pirazol-4-carboxamidas: Penthiopyrad

De las diez subclases de SDHI, la que está formada por más principios activos es la de las pirazol-4-carboxamidas, un nombre abreviado para una serie de derivados (ocho en total) que comparten un esqueleto común de tipo *N*-aril-1,3-dimetil-1*H*-pirazol-4-carboxamida. Además, en muchos de estos casos el sustituyente metilo en posición 3

del anillo de pirazol contiene dos o tres átomos de flúor (Figura 1.3), mientras que el anillo aromático unido directamente al átomo de nitrógeno posee un sustituyente contiguo a éste, en muchos casos de tipo 4-metilpentan-2-ilo o similar. Además, con la excepción de furametpyr, todos ellos son principios activos de nueva generación. Entre ellos cabe destacar penthiopyrad (**16**), que fue el primer SDHI de nueva generación en ser incluido en esta subclase. Su estructura se muestra en la Figura 1.7.



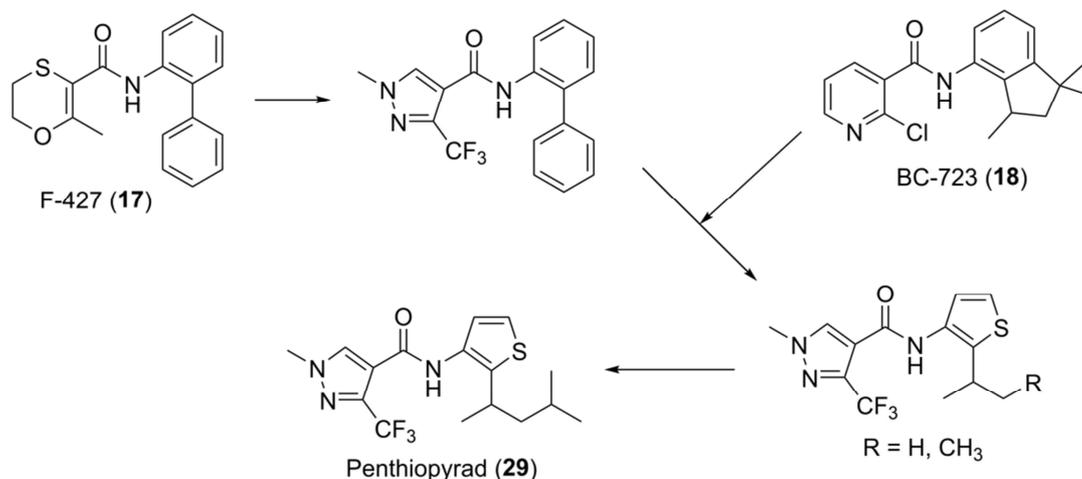
**Figura 1.7.** Estructura ChemDraw del fungicida penthiopyrad.

Penthiopyrad fue originalmente desarrollado y protegido en 1996 por Mitsui Chemicals,<sup>29</sup> que posteriormente lo licenció a DuPont para su explotación en Europa y Estados Unidos. Fue registrado por primera vez en Japón en 2008, y obtuvo posteriormente autorizaciones en Canadá y Estados Unidos en 2011 y 2012, respectivamente. Su uso en la Unión Europea fue autorizado en el año 2014, siendo actualmente legal su uso en 14 Estados Miembros y estando en trámites de hacerlo en España y Bélgica. A diferencia de sus antecesores, eficaces sólo frente a basidiomicetos, penthiopyrad también es efectivo frente a algunos ascomicetos y deuteromicetos. Se comercializa bajo las denominaciones Fontelis® y Vertisan®, y a diferencia de fluopyram, sólo puede encontrarse formulado sin otros fungicidas en forma de suspensión concentrada del compuesto racémico en torno al 20% (m/v).<sup>30</sup>

#### 1.1.2.1. Descubrimiento

Penthiopyrad fue descubierto tras un exhaustivo estudio cuyo ambicioso objetivo era encontrar un nuevo fungicida de tipo carboxanilida que tuviera el mismo nivel de actividad contra cepas fúngicas resistentes a otros productos agroquímicos y a la vez un espectro de acción amplio.<sup>3,31</sup> Para ello, los investigadores de Mitsui Chemicals fijaron inicialmente su atención en dos carboxanilidas similares a algunos fungicidas ya desarrollados pero para las que se había descrito un espectro más amplio que éstos. Una de ellas fue el compuesto **17** (F-427), descrito en 1967 y muy similar a carboxin, aunque con actividad frente a deuteromicetos además de frente a basidiomicetos, lo que demostraba que era posible ampliar el espectro.<sup>32</sup> La otra carboxanilida fue el

compuesto de estructura **18** (BC-723), activo también frente a deuteromicetos y basidiomicetos,<sup>33</sup> el cual les sirvió como punto de partida (*lead*) para llevar a cabo la optimización de la estructura del nuevo fungicida (Figura 1.8).



**Figura 1.8.** Representación esquemática del camino seguido en el desarrollo de penthiopyrad (16) a partir de las carboxanilidas F-427 (17) y BC-723 (18).

La búsqueda del nuevo fungicida se hizo en base a los resultados que proporcionó cada uno de los candidatos frente al tratamiento de añublo en arroz, oídio en pepino, roya parda en trigo y moho gris en judías, poniendo especial atención en esta última enfermedad. En primer lugar, partiendo del compuesto **17**, el anillo de oxatina fue reemplazado por distintos anillos, en su mayoría aromáticos homo y heterocíclicos, observándose los mejores resultados con el derivado del ácido 1-metil-3-(trifluorometil)-1*H*-pirazol-4-carboxílico. Más tarde, la agrupación de bifenilo fue variada teniendo en cuenta la estructura del compuesto **18**, hasta obtener muy buenos resultados al reemplazar el anillo de benceno unido al enlace amida por uno de tiofeno que incorporaba un sustituyente alifático en posición contigua al sustituyente carboxamido. Finalmente, la optimización de dicho sustituyente alifático al grupo 4-metilpentan-2-ilo y la confirmación de la idoneidad del anillo de pirazol con el grupo alifático definitivo condujeron a la obtención de penthiopyrad (**16**).<sup>31</sup>

#### 1.1.2.2. Propiedades

Penthiopyrad es un fungicida sistémico<sup>34</sup> que, si bien no es eficaz contra oomicetos, presenta elevada actividad frente a un amplio rango de infecciones entre las que se hallan las más comunes y que más pérdidas ocasionan. También presenta como aspecto favorable que su mecanismo de acción es distinto al de otros principios

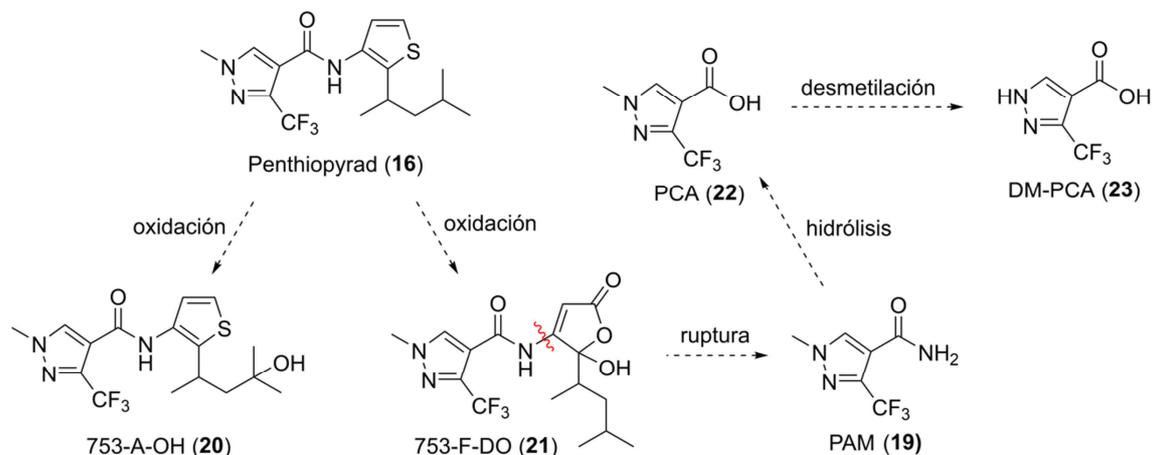
activos que sirven para tratar las mismas infecciones, por lo que empleado adecuadamente no debería presentar resistencia cruzada con otros fungicidas. Algunas de las plagas para las que penthiopyrad es efectivo son moho gris (*Botrytis cinerea*), oídio (*Sphaerotheca fuliginea* o *Erysiphe cichoracearum*), moho en hojas de tomate (*Passalora fulva*), tizón de fuego en pepino (*Corynespora cassiicola*) o podredumbre marrón en melocotón y cereza (*Monilinia fructicola*), entre muchos otros.<sup>3,35</sup>

Penthiopyrad es un sólido blanco no volátil, cuyo punto de fusión es de 108.7 °C y cuya presión de vapor a temperatura ambiente es de  $6.4 \cdot 10^{-9}$  kPa. Posee un log  $P_{ow}$  de 4.62 a pH neutro y temperatura ambiente, lo que sugiere una considerable hidrofobicidad. De hecho, su solubilidad en agua se sitúa en torno a 1.4 mg/L, no variando significativamente ésta con el pH a pesar de que su estructura presenta un anillo de pirazol ionizable. En cambio, el fungicida se disuelve bastante bien en disolventes orgánicos polares (metanol, etanol, acetona, acetato de etilo y diclorometano), haciéndolo moderadamente en disolventes aromáticos (xileno y tolueno) y en menor medida en apolares (hexano y heptano). Por último, su espectro UV/vis presenta un máximo de absorbancia a 226 nm.<sup>36</sup>

Las características toxicológicas de este fungicida en mamíferos son bastante similares a las que muestra fluopyram. Así, los estudios llevados a cabo con la forma racémica sugieren una absorción rápida por vía oral (83%) sin evidencia de acumulación, con una baja toxicidad aguda en ratas tras administración por vías oral, dérmica o inhalatoria. Penthiopyrad tampoco parece ser neurotóxico ni genotóxico, aunque a largo plazo pueden observarse efectos negativos en tiroides e hígado, pudiendo derivar en tumores en ratón y rata. El fungicida tampoco pareció afectar a los procesos reproductivos ni a los fetos, descartándose por tanto un posible carácter teratogénico. Del mismo modo, penthiopyrad no parece suponer un peligro a corto plazo ni para aves ni para organismos acuáticos, aunque sí a largo plazo para estos últimos en algunos casos.<sup>36,37</sup>

En cuanto a la degradación metabólica de penthiopyrad, los metabolitos que aparecen con mayor frecuencia tanto en plantas como en animales son la amida **19** (PAM), los derivados oxidados **20** (753-A-OH) y **21** (753-F-DO), y los ácidos carboxílicos **22** (PCA) y **23** (DM-PCA).<sup>37</sup> Se ha propuesto que los derivados **20** y **21** procederían respectivamente de la oxidación de penthiopyrad dirigida al grupo alifático y al anillo de tiofeno, mientras que PAM (**19**) se obtendría por la ruptura de **21** en un paso

posterior a la oxidación de penthiopyrad. Del mismo modo, la hidrólisis de **19** conduciría a **22**, que se convertiría en **23** por desmetilación.



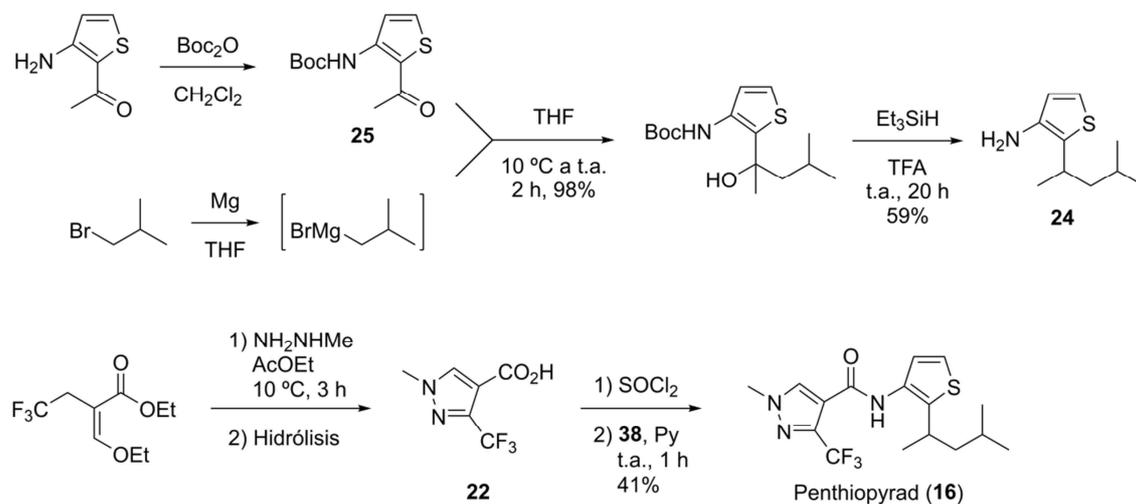
**Esquema 1.5.** Principales metabolitos de penthiopyrad en organismos vegetales y posible modo de formación.

El metabolismo aerobio de penthiopyrad en suelos es muy similar al observado en plantas, con formación de los cinco metabolitos y en especial de DM-PCA (**23**).<sup>36</sup> No obstante, los estudios muestran una cierta persistencia del fungicida y sus metabolitos, reflejada en la detección de cantidades considerables de éstos entre 140 y 269 días después de la aplicación. Además, la velocidad de degradación se reduce drásticamente en condiciones anaerobias. En cambio, la descomposición del fungicida por fotólisis es relativamente rápida, lo que constituye probablemente la principal causa de su disipación en terrenos cultivables reales. Los principales productos de fotólisis son PAM (**19**), PCA (**22**) y DM-PCA (**23**), aunque el fungicida es estable a la degradación fotoquímica cuando se halla en medio acuoso. Finalmente, y al igual que fluopyram, penthiopyrad se muestra estable a la hidrólisis en disoluciones acuosas tamponadas a 50 °C durante varios días.<sup>36</sup>

### 1.1.2.3. Métodos de síntesis

Se han descrito unas pocas secuencias sintéticas conducentes a la preparación del fungicida penthiopyrad (**16**). En la primera de ellas, descrita por Mitsui Chemicals en 1996 y de tipo convergente,<sup>31,29</sup> el compuesto se obtiene tras la formación del enlace amida central a partir del cloruro del ácido **22** y del aminotiofeno **24**. El compuesto **22** se prepara mediante la hidrólisis del producto de condensación de 2-(etoximetileno)-4,4,4-trifluoroacetoacetato de etilo y metilhidrazina. Por otra parte, la adición nucleofílica de bromuro de isobutilmagnesio a la cetona **25**, seguida de la reducción

con trietilsilano del producto resultante, conduce a la formación del compuesto **24**. Mediante esta secuencia se obtiene el fungicida con un 24% de rendimiento a partir de **24**.

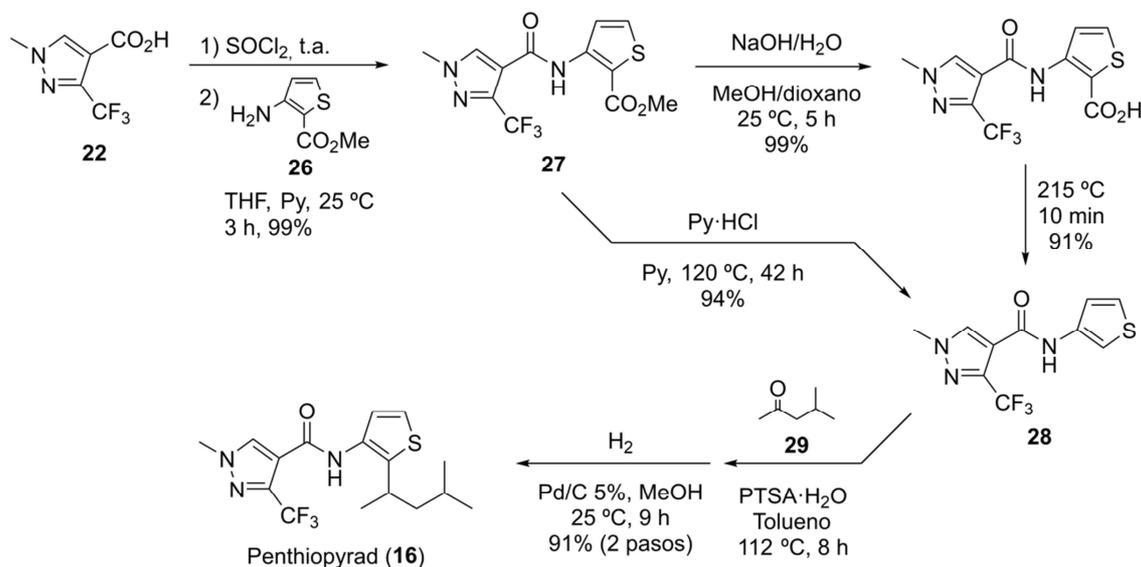


**Esquema 1.6.** Ruta original descrita para la síntesis del fungicida penthiopyrad (**16**).

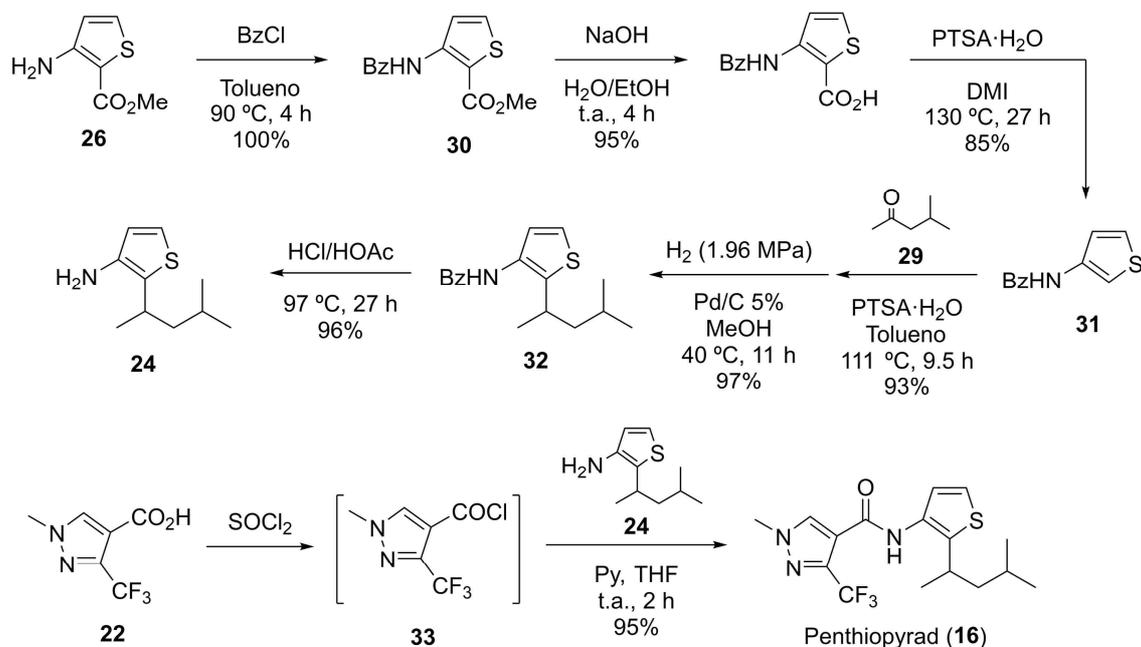
Cuatro años más tarde se describieron dos rutas alternativas para la obtención de penthiopyrad a partir del ácido **22**, incluido en la primera secuencia, y del aminotiofeno **26**.<sup>38</sup> Una de ellas, de tipo lineal (Esquema 1.7), implica la obtención inicial de la amida **27** por condensación de **22** y **26**, seguida de una hidrólisis y descarboxilación que puede llevarse a cabo en un solo paso o bien con aislamiento del ácido intermedio. Tras la alquilación del producto resultante (**28**) con 4-metilpentan-2-ona (**29**) y la deshidratación del intermedio, la reducción de la mezcla de isómeros formada conduce finalmente al fungicida deseado (**16**). A pesar de contar con un mayor número de etapas que la ruta original, la elevada efectividad de cada una de ellas permite que penthiopyrad pueda prepararse con un excelente rendimiento global del 85%.

La otra ruta propuesta (Esquema 1.8), de tipo convergente y basada en la secuencia original, se fundamenta en la preparación del aminotiofeno **24** empleando el mismo tipo de transformaciones propuestas en la ruta descrita en el párrafo anterior (Esquema 1.7). Así, tras la protección inicial del grupo amino de **26** como benzamida, el producto protegido (**30**) se somete a saponificación seguida de descarboxilación para dar lugar al compuesto **31**. Después, el fragmento 4-metilpentan-2-ilo se introduce nuevamente por alquilación de Friedel–Crafts con la cetona **29** seguida de la hidrogenación de la mezcla de isómeros de deshidratación resultantes, lo que original el compuesto **32**. La hidrólisis de este compuesto conduce a **24**, y finalmente se

obtiene penthiopyrad (**16**), como en la ruta original, por formación del enlace amida entre **24** y el cloruro del ácido **22** (**33**). Mediante esta secuencia alternativa se obtiene el compuesto **24** con un rendimiento global del 70%, mientras que el rendimiento de la ruta original era del 58%, debido fundamentalmente a la moderada efectividad de la reducción con trietilsilano en medio ácido.



**Esquema 1.7.** Primera secuencia sintética alternativa propuesta para la síntesis de penthiopyrad (**16**).



**Esquema 1.8.** Segunda secuencia sintética alternativa propuesta para la síntesis de penthiopyrad (**16**).

La principal diferencia de ambas secuencias respecto a la ruta inicial es la introducción en bloque del sustituyente alifático 4-metilpentan-2-ilo en el anillo de tiofeno mediante una reacción de Friedel–Crafts con la cetona **29**, compuesta por los seis átomos de carbono dispuestos adecuadamente. En contraste, esta operación se llevaba a cabo originalmente por unión de dos fragmentos, uno de ellos de dos átomos de carbono (grupo acetilo) y ya unido al anillo de tiofeno, y el otro de cuatro átomos de carbono procedentes de bromuro de isobutilo (Esquema 1.6). Además, cada una de las secuencias permite la introducción de dicho sustituyente alifático antes o después de formar el enlace amida central.

Hasta la actualidad no se ha descrito ninguna otra secuencia sintética completa para la preparación del fungicida, si bien se han propuesto nuevas metodologías para la preparación de algunos de los precursores clave de las rutas existentes. Así, Mitsui Chemicals protegió en 2010 una serie de rutas alternativa para la preparación del aminotiofeno **24** a partir de 2,4-dimetilpentanal, nitrometano y 1,4-ditiano-2,5-diol.<sup>39</sup> Por otra parte, este mismo 2017 Chen y colaboradores han descrito la preparación del ácido **22** por formación del anillo de pirazol a partir de 2,2,2-trifluorodiazotano y una nitroolefina,<sup>40</sup> lo que constituye una alternativa interesante para la preparación a escala industrial de este compuesto con un mayor rendimiento respecto a la condensación entre un compuesto 1,3-dicarbonílico y una hidracina, descrita en la ruta original (Esquema 1.6).

### 1.1.3. Marco legal

Los plaguicidas, a pesar de ser compuestos potencialmente nocivos para el consumidor y el medio ambiente y de ser cada vez más rechazados por la sociedad, son ampliamente utilizados en las prácticas agrícolas actuales para la protección de los cultivos, ya que es prácticamente inevitable su exposición a posibles agentes patógenos. Existen alternativas en las que no se hace uso de plaguicidas, como son la agricultura ecológica o bien la agricultura con organismos genéticamente modificados, que incorporan en su código genético sistemas de defensa frente a dichos patógenos.<sup>41,42</sup> No obstante, la primera no ofrece tasas de producción capaces de satisfacer la elevada demanda, mientras que el uso de organismos transgénicos requiere hoy por hoy una mayor investigación y también un mayor grado de aceptación por parte de la sociedad. Por ello, en la actualidad se hace necesario el uso

de plaguicidas, especialmente fungicidas e insecticidas, para garantizar cosechas de calidad y cantidad suficientes.

Cuando se lleva a cabo la aplicación de un plaguicida, éste puede tener diferentes destinos una vez ha cumplido su propósito: acumulación, degradación metabólica por parte del patógeno o bien del hospedador, hidrólisis, fotólisis por acción solar, etc. La permanencia de residuos del plaguicida en el cultivo, ya sea inalterado o bien sus productos de degradación, puede suponer un problema de seguridad alimentaria, por lo que es necesario un control legal estricto para evitar la llegada de alimentos contaminados hasta el consumidor. Además, es frecuente emplear cantidades superiores a las recomendadas con la falsa idea de que tendrán un mayor efecto, siendo el único resultado un mayor contenido en residuos del plaguicida y por tanto un mayor riesgo alimentario. De este modo, además de decidir qué plaguicidas pueden ser empleados o no, las autoridades de cada país establecen para cada principio activo y cultivo un límite máximo de residuo (LMR), el cual se expresa normalmente en mg de plaguicida por kg de cultivo. Los LMR permiten regular así la cantidad máxima de plaguicidas que puede existir en los alimentos que llegan al consumidor.

Además del establecimiento de los LMR, las autoridades también efectúan programas periódicos de vigilancia y monitorización de residuos en alimentos. El propósito de estos programas, además de velar por el cumplimiento de los límites establecidos, es controlar qué principios activos y en qué cantidad están presentes en los alimentos analizados, que suelen ser del orden de miles o decenas de miles. Los más representativos a nivel mundial son el *Pesticide Data Program* (PDP) organizado por el Departamento de Agricultura de Estados Unidos (USDA),<sup>43</sup> y el *European Union Coordinated Pesticide Control Program* (EUCP) llevado a cabo por la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA), que depende de la Comisión Europea.<sup>44</sup> En el caso de España, la Agencia Española de Consumo, Seguridad Alimentaria y Nutrición (AECOSAN) del Ministerio de Sanidad es la encargada de llevar a cabo el programa nacional de vigilancia, así como de la participación en el programa coordinado a nivel europeo.<sup>45</sup>

El último informe del PDP estadounidense, correspondiente al año 2015, se publicó el 10 de noviembre de 2016.<sup>46</sup> Se analizaron 10187 muestras procedentes de 10 Estados, incluyendo frutas y verduras tanto frescas como procesadas (9872, 96.9%) y muestras de mantequilla de cacahuete (315, 3.1%), monitorizando un total de 488 analitos entre plaguicidas, metabolitos, productos de degradación, isómeros y otros

contaminantes medioambientales. De todas ellas, únicamente 54 muestras (0.53%) contenían plaguicidas a concentraciones que superasen los LMR establecidos, mientras que un porcentaje de las muestras superior al 99% presentó contenidos de plaguicidas inferiores a los límites legales. Además, no se detectaron residuos de plaguicidas en un 15% del total de las muestras. Por otra parte, en 394 de las muestras se detectaron residuos sin un valor de LMR establecido. Los plaguicidas más frecuentemente encontrados fueron los fungicidas fludioxonil (1792 muestras), boscalid (1722 muestras) y pyraclostrobin (1704 muestras).

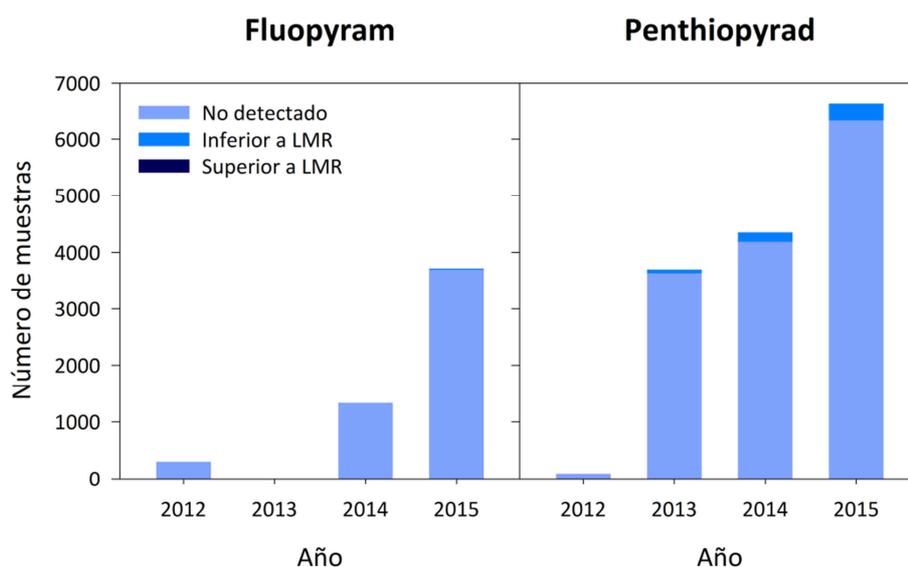
En cuanto al programa europeo, la EFSA publicó su último informe el 7 de abril de 2017, correspondiente al año 2015.<sup>47</sup> Considerando únicamente el programa coordinado a nivel europeo, se analizaron un total de 10884 muestras de 11 tipos de alimentos de origen animal y vegetal, incluyendo alimentos frescos y procesados, y se evaluaron un total de 164 plaguicidas. Los análisis revelaron que 10795 muestras, el 99.2%, presentaron niveles de plaguicidas inferiores a los LMR, y 6650 de ellas (un 61.1% del total) no contuvieron niveles detectables de ninguno de los analitos estudiados. Las restantes 89 muestras, únicamente el 0.8% del conjunto analizado, superaron los límites establecidos. De los tipos de alimentos analizados, las muestras de brócoli fueron las que presentaron una mayor frecuencia de incumplimiento de los LMR, mientras que los plaguicidas detectados más habitualmente en el caso de las muestras de origen vegetal fueron imazalil (7.1%), thiabendazole (6.8%), azoxystrobin (6.4%), boscalid (6.3%) y chlorpyrifos (4.1%). No obstante, 36 de los fungicidas estudiados no fueron hallados en cantidades detectables en ninguna de las muestras vegetales analizadas.

#### *1.1.3.1. Monitorización de residuos de fluopyram y penthiopyrad*

La Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) propuso en 2010 las definiciones de residuo para fluopyram en muestras de origen animal y vegetal a tener en cuenta para comparar con los LMR. De este modo, para muestras vegetales solo se considera el propio fungicida como residuo, mientras que en el caso de muestras animales se incluye en la definición su principal metabolito, M25 (**2**, Esquema 1.1).<sup>21</sup> Del mismo modo, la misma organización definió en 2012 el residuo de penthiopyrad en muestras de origen vegetal como la concentración hallada del fungicida, incluyendo también para muestras de origen animal la del principal metabolito, PAM (**19**, Esquema 1.5).<sup>36</sup> Así pues, las definiciones legales de los residuos

de ambos fungicidas tanto en Europa como en Estados Unidos están de acuerdo con las propuestas de la FAO.

En el caso del PDP, tanto fluopyram como penthiopyrad son monitorizados desde el año 2012 en un número de muestras y de tipos de alimentos que va creciendo año a año, como puede apreciarse gráficamente en la Figura 1.9. En el estudio correspondiente a dicho año sólo se analizaron muestras de un tipo de alimento para cada fungicida, 300 muestras de trigo para fluopyram y 92 de calabaza de verano para penthiopyrad, y en ningún caso se detectaron residuos de los fungicidas buscados.<sup>48</sup> Para el estudio del año 2013 no se llevaron a cabo análisis para detectar fluopyram, mientras que el número de muestras analizadas en busca de penthiopyrad ascendió hasta más de 3500. Entre ellas, aproximadamente un 2% presentaron concentraciones detectables de fungicida, la mayor parte de ellas en zanahorias y judías verdes (un 48% y un 27% del total de muestras contaminadas con penthiopyrad, respectivamente).<sup>49</sup>



**Figura 1.9.** Evolución del número de muestras analizadas en el PDP estadounidense en busca de residuos de fluopyram y penthiopyrad.<sup>46,48-50</sup>

El informe del PDP para el año 2014, publicado en enero de 2016, muestra que el número de muestras analizadas para detectar fluopyram fue más de 4 veces superior al del estudio llevado a cabo dos años antes, evaluándose 7 tipos distintos de alimentos de origen vegetal. Aunque estas cifras indican un aumento de la relevancia de fluopyram, ninguna de las muestras analizadas presentó residuos detectables de fungicida.<sup>50</sup> En cambio, de los 4351 análisis efectuados para la monitorización de penthiopyrad en 12 tipos de alimentos, 163 de ellos (aproximadamente un 4%)

arrojaron cantidades detectables de analito, siendo de nuevo zanahorias y judías verdes los alimentos con presencia más frecuente de analito.<sup>50</sup> Por último, el recientemente publicado informe anual para 2015 revela un repunte importante en el número de muestras analizadas para detectar fluopyram y penthiopyrad, triplicándose en el caso del primero e incrementándose en aproximadamente un 50% para el segundo. Por primera vez, fluopyram fue detectado en 21 de las muestras analizadas (0.6%) distribuidas entre pepinos (15), manzanas (4), lechugas (1) y fresas (1). Por su parte, penthiopyrad fue hallado en un total de 299 muestras (5%), principalmente de fresas (119), judías verdes (102) y tomates (50). Hay que resaltar que el porcentaje de muestras contaminadas con penthiopyrad correspondientes a fresa aumentó bruscamente desde el 10% hasta el 40% en tan solo un año, mientras que en el caso de los tomates dicha variación fue algo menos acusada, desde un 9% hasta un 17%.<sup>46</sup>

Aunque la relevancia de fluopyram y penthiopyrad ha ido aumentando a lo largo del tiempo, quedando reflejado en el número de muestras analizadas y contaminadas, hay que resaltar que hasta la fecha ninguna de las muestras ha presentado concentraciones superiores a los LMR estadounidenses para ninguno de los dos analitos. Actualmente dichos límites para fluopyram en alimentos de origen vegetal oscilan entre el restrictivo valor de 0.01 ppm (ng/g) en maíz y el más permisivo de 70 ppm en semillas de eneldo. En el caso de penthiopyrad, el LMR más bajo es de 0.01 ppm en diversos tipos de maíz, mientras que el más elevado es de 80 ppm en henos de cebada, avena y trigo.<sup>51</sup>

En cuanto a los resultados del programa europeo, fluopyram forma parte del conjunto de plaguicidas incluidos en el estudio desde el año 2013, antes de entrar en vigor su autorización. En el estudio de dicho año se monitorizó fluopyram en 4364 muestras de seis tipos de alimentos de origen vegetal, incluyendo vinos blancos y tintos, hallándose 48 muestras contaminadas con el fungicida (1%) de las que tres cuartas partes eran tomates.<sup>52</sup> Posteriormente, el EUCP de 2014 incluyó casi 5000 muestras para la búsqueda de fluopyram, siendo detectado en 56 de ellas (1%) con una elevada incidencia en pepino, lo que constituyó casi un 70% de las muestras contaminadas, si bien sólo el 6% de las muestras de pepino evaluadas contenían cantidades detectables de fungicida.<sup>53</sup> Finalmente, el informe del año 2015, publicado hace pocos meses, muestra un aumento del número de muestras analizadas en busca de fluopyram hasta más de 5700, encontrándose residuos en 139 de ellas (2%). En este estudio el número de alimentos analizados ascendió a nueve, de entre los cuales el

pimiento morrón y sobretodo la uva de mesa destacaron como los que más frecuentemente estuvieron contaminados, con respectivamente 29 y 100 muestras positivas.<sup>47</sup>

Si bien los informes de la EFSA sugieren que fluopyram va adquiriendo progresivamente peso en las prácticas agrícolas, con un número creciente de muestras contaminadas año a año, afortunadamente todavía no se ha detectado ninguna muestra con una presencia de fluopyram superior a la permitida. Los LMR europeos actuales para este principio activo oscilan entre el restrictivo valor de 0.01 ppm, correspondiente al límite de cuantificación del método analítico empleado en los estudios y asignado por defecto a aquellos cultivos para los que no se ha especificado un valor concreto, y 15 ppm para algunos tipos de lechuga.<sup>54</sup>

Por su parte, penthiopyrad todavía no ha sido incorporado al EUCP, y de hecho sólo se menciona muy brevemente en los informes de los años 2014 y 2015 haciendo referencia a los resultados del programa coordinado junto con los distintos programas de vigilancia nacionales, enfatizándose en ellos la exclusión del fungicida del EUCP. En el informe del año 2014 se especifica que fue detectado en una muestra de las 1285 analizadas en el conjunto de la Unión Europea,<sup>53</sup> mientras que en 2015 también se detectó una sola muestra contaminada de un total de 2898.<sup>47</sup> En cualquier caso, ninguna de las dos muestras presentó concentraciones de penthiopyrad superiores a los LMR, que actualmente se sitúan en el rango comprendido entre el límite de cuantificación genérico de 0.01 ppm asignado a un gran número de cultivos y valores entre 15 y 50 ppm para distintos tipos de plantas de hoja, como lechugas y espinacas.<sup>54</sup>

### 1.2. Análisis de residuos de plaguicidas en alimentos

Dado que los residuos de plaguicidas en alimentos suelen encontrarse a niveles traza, se hace necesario el desarrollo de métodos analíticos realmente potentes, capaces de cuantificar incluso por debajo de los ya de por sí restrictivos LMR establecidos. Por ello, es importante que los métodos destinados a este fin sean sensibles, selectivos y reproducibles, además de incluir precauciones especiales propias del análisis de trazas, como evitar cualquier fuente de contaminación (material, reactivos, etc.), incluir si es necesario etapas de preconcentración o hacer un uso exhaustivo de blancos analíticos.

Por su elevado potencial, los métodos más frecuentes para el análisis de plaguicidas se basan en cromatografía de gases o de líquidos acoplada a distintos tipos de detectores, preferentemente espectrómetros de masas. No obstante, existen cada vez más métodos alternativos y/o complementarios de reconocimiento molecular que hacen uso de biorreceptores específicos para el analito de interés, como los anticuerpos.

### **1.2.1. Métodos cromatográficos**

Como se ha avanzado anteriormente, para llevar a cabo el análisis de plaguicidas se recurre convencionalmente a las técnicas cromatográficas, como son la cromatografía de gases (GC), la cromatografía líquida de elevada eficacia (HPLC). Como es bien sabido, la cromatografía permite la separación de los componentes de una mezcla por interacción dinámica y simultánea de éstos con una fase estacionaria y una fase móvil, por lo que resulta ideal para muestras que contienen distintos tipos de residuos. Además, es muy frecuente emplear la espectrometría de masas simple (MS) o en tándem (MS/MS) como sistema de detección, lo que permite asegurar la naturaleza del residuo en base al espectro de masas obtenido. Este tipo de combinaciones da lugar a métodos analíticos de elevada selectividad, reproducibilidad y sensibilidad, capaces de determinar de forma simultánea un gran número de moléculas, por lo que se conocen también como métodos multirresiduo. Por todo ello, son la elección habitual para llevar a cabo los programas de vigilancia anteriormente descritos.

A pesar de su elevado potencial analítico, las técnicas cromatográficas convencionales presentan una serie de inconvenientes que los convierten en poco aptos para ciertas aplicaciones. Así, estos métodos no son los más adecuados cuando se desea llevar a cabo un análisis rápido de una sola especie en un elevado conjunto de muestras, ni tampoco cuando la determinación quiere llevarse a cabo *in situ*. Del mismo modo, su utilización requiere de equipos sofisticados y por lo tanto de elevado coste, por lo que deben ser además manejados por personal altamente cualificado. En otras palabras, no son técnicas apropiadas para cualquier usuario, y mucho menos para un ciudadano medio. Además, desde el punto de vista práctico, en muchos casos estos métodos precisan de un tratamiento previo de las muestras, que incluye en todos los casos una etapa de extracción con disolventes orgánicos seguida de etapas de limpieza y/o preconcentración, lo que repercute en tiempos de análisis más largos y en un mayor coste. Todos estos inconvenientes justifican la búsqueda de métodos

analíticos rápidos, fiables, sencillos de utilizar, portátiles y económicos, complementando así a las técnicas cromatográficas convencionales.

### 1.2.1.1. *Métodos específicos descritos para fluopyram y penthiopyrad*

El primer método para el análisis de fluopyram fue descrito en 2012 por Polgár y colaboradores,<sup>55</sup> y se basó en HPLC acoplada a espectrometría de masas de alta resolución (EMAR). Se analizaron muestras de diversas frutas y verduras (pimiento verde, lechuga, fresa, uva, pera, mandarina y pepino), y aunque los autores construyeron una exhaustiva base de datos con un total de 1396 compuestos, incluyendo también penthiopyrad y metabolitos de los fungicidas estudiados, en ninguna de las muestras analizadas se encontró fluopyram o penthiopyrad. Por otra parte, el primer método descrito para penthiopyrad en 2011 por Edison y colaboradores no hizo uso de cromatografía, sino que se tomaban muestras con bastoncillos de algodón de la superficie de tres tipos de fruta (uva, manzana y naranja) y se evaluaban sin más tratamiento mediante análisis directo en tiempo real por espectrometría de masas (DART-MS).<sup>56</sup> En este caso sí se detectó penthiopyrad en las muestras analizadas, si bien los autores no especifican ni la concentración ni el límite de cuantificación.

Desde entonces y hasta la fecha, la inmensa mayoría de los métodos descritos para el análisis de fluopyram y penthiopyrad en alimentos son multiresiduo y hacen uso de alguna técnica cromatográfica con detección por espectrometría de masas. El número de analitos por método va desde unos pocos hasta varios cientos, y en muchos casos ambos fungicidas están incluidos en el grupo estudiado. Para el análisis de fluopyram se han descrito métodos basados en cromatografía de gases con detector de captura de electrones (GC-ECD),<sup>57,58</sup> acoplada a espectrometría de masas simple (GC-MS),<sup>59,60</sup> y acoplada a espectrometría de masas en tándem (GC-MS/MS),<sup>61-64</sup> y entre estos últimos hay uno que también incluye a penthiopyrad.<sup>61</sup> No obstante, existen muchos más trabajos que describen métodos multiresiduo basados en cromatografía de líquidos, pudiéndose encontrar en la bibliografía métodos acoplados a espectrometría de masas simple (HPLC-MS),<sup>59,65</sup> y a espectrometría de masas en tándem de triple cuadrupolo (HPLC-MS/MS),<sup>64,66-71</sup> así como sus equivalentes de eficacia ultraelevada (UPLC-MS<sup>72</sup> y UPLC-MS/MS<sup>73-77</sup>), ya sea para el análisis de uno o de ambos fungicidas. Además, dado el creciente uso de los SDHI para la protección de cultivos, se han descrito algunos métodos multiresiduo para el análisis exclusivo o casi exclusivo de

analitos pertenecientes a esta familia, uno de ellos desarrollado en nuestro laboratorio.<sup>77,78</sup> Los límites de cuantificación de todos estos métodos se sitúan en torno a 10 ng/g para los dos fungicidas estudiados.

También existen otros métodos de análisis para fluopyram y penthiopyrad que no se ajustan a la clasificación anterior. Así, recientemente se ha descrito un método multirresiduo no cromatográfico para la cuantificación de fluopyram y de otros 61 analitos en muestras de vino tinto.<sup>79</sup> El método está basado en la ya citada técnica DART-MS, una modalidad de espectrometría de masas de desorción/ionización introducida en 2005 y que permite, como su nombre indica, el análisis directo en tiempo real de muestras de todo tipo.<sup>80,81</sup> Por otra parte, Qinglong Guo protegió por patente en 2016 varios métodos monorresiduo basados en GC-MS y GC-MS/MS para el análisis de penthiopyrad en diversos alimentos, alcanzando límites de cuantificación de hasta 0.25 ng/g de fungicida aproximadamente.<sup>82-85</sup>

### **1.2.2. Métodos inmunoquímicos**

Ante las limitaciones asociadas a los métodos cromatográficos convencionales para algunas aplicaciones concretas, los analistas emplean cada vez con más frecuencia métodos alternativos de reconocimiento molecular, entre los que se incluyen los denominados métodos inmunoquímicos. Esta familia engloba al conjunto de técnicas analíticas en las que el analito es detectado o cuantificado mediante el establecimiento de una reacción de reconocimiento molecular antígeno/anticuerpo. En este caso, el analito actúa como antígeno, de modo que interacciona con un anticuerpo con elevada afinidad y especificidad. Dada la gran versatilidad de los anticuerpos para adaptarse a múltiples formatos de ensayo, esta familia de técnicas ha encontrado un gran número de aplicaciones, tanto a nivel analítico como preparativo, y son especialmente interesantes en aquellos casos en los que es necesario el análisis rápido de un gran número de muestras.<sup>86</sup>

Los métodos inmunoquímicos presentan una serie de ventajas particulares que los hacen idóneos para complementar a las técnicas cromatográficas. En primer lugar, permiten llevar a cabo el análisis de un gran conjunto de muestras en poco tiempo, así como ser adaptados a formatos portátiles para efectuar los análisis fuera de los laboratorios. Asimismo, no requieren el uso de instrumental sofisticado ni de personal altamente cualificado, lo que reduce el coste del análisis. Además, debido a la

especificidad de la reacción de reconocimiento antígeno/anticuerpo, las muestras líquidas pueden analizarse en muchos casos sin tratamiento previo, e incluso en presencia de moléculas muy similares al analito, minimizando o eliminando el uso de disolventes orgánicos. Del mismo modo, la sensibilidad de estos métodos suele ser comparable o incluso llegar a superar a la de los métodos cromatográficos tradicionales, alcanzándose límites de detección del orden de pg/g. Por último, las diferentes posibilidades que ofrece el uso de anticuerpos dan lugar a métodos de muy diverso alcance analítico (análisis cuantitativo, semicuantitativo y cualitativo) o incluso métodos con fines preparativos.

Los métodos inmunoquímicos pueden adaptarse a multitud de formatos de ensayo, y aunque originalmente su aplicación se llevó a cabo en el campo clínico, han aportado valiosas alternativas analíticas para dianas muy variadas,<sup>87-89</sup> incluyendo los plaguicidas.<sup>90,91</sup> Los primeros inmunoensayos hacían uso de marcaje con radioisótopos para evaluar el reconocimiento molecular,<sup>92</sup> y aunque los denominados radioinmunoensayos (RIA) todavía sean empleados,<sup>93,94</sup> su uso es desaconsejable debido a los riesgos para la salud que entraña el uso de sustancias radioactivas. Este problema se solucionó con la sustitución de los marcadores radioactivos por enzimas, naciendo así la técnica inmunoquímica por excelencia conocida como ensayo de inmunoadsorción ligado a enzima (ELISA, *enzyme-linked immunosorbent assay*).<sup>95,96</sup> Otros métodos inmunoquímicos de uso frecuente son la cromatografía de inmunofinidad,<sup>97</sup> los biosensores<sup>98</sup> y los inmunoensayos de flujo lateral o tiras reactivas,<sup>88,99</sup> siendo el test de embarazo el ejemplo por excelencia de este último tipo.

En el contexto de la seguridad alimentaria, incluyendo el análisis de residuos de plaguicidas como fluopyram o penthiopyrad, el desarrollo de métodos inmunoquímicos es de gran interés en determinadas aplicaciones para las que las técnicas analíticas convencionales no son las más adecuadas. Métodos de este tipo serían útiles en situaciones de crisis y alarma alimentaria por un contaminante o patógeno concreto, como fue la detección de melamina en leche para bebé procedentes de China en 2008,<sup>89,100</sup> o también la aparición del brote de *Escherichia coli* enterohemorrágica en Alemania en el año 2011.<sup>101</sup> También podrían ser adecuados para su uso en departamentos de calidad de productores y empresas del sector agroalimentario para la monitorización de una sustancia específica en la materia prima, producto acabado, o bien en líneas industriales de procesado y/o transformación de alimentos.

Dada la reciente introducción en el mercado de los fungicidas fluopyram y penthiopyrad, y aunque sí se han publicado métodos convencionales para su análisis (sección 1.2.1.1), en el momento de redactar esta Tesis Doctoral todavía no se había descrito ningún método inmunoquímico para monitorizar estos analitos. Por ello, se decidió abordar el desarrollo de inmunoensayos para la cuantificación de fluopyram y penthiopyrad en muestras de alimentos.

Los métodos inmunoquímicos para moléculas orgánicas pequeñas poseen un esquema común de desarrollo bien establecido, que se inicia con el diseño y la síntesis de haptenos, la preparación de bioconjugados, y la generación de anticuerpos específicos del analito de interés. Posteriormente los anticuerpos y los bioconjugados se evalúan para determinar la calidad del reconocimiento molecular, y una vez establecidas las condiciones óptimas para llevar a cabo el inmunoensayo, se procede a su aplicación sobre muestras reales y su validación analítica. Todas estas etapas se describen detalladamente en los siguientes apartados de la memoria.

### 1.3. Preparación de inmunorreactivos

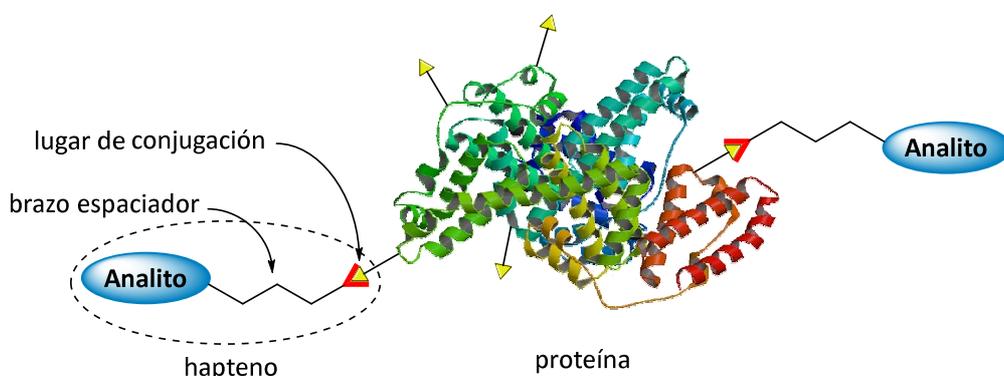
El primer paso en el desarrollo de cualquier método inmunoquímico es la obtención de anticuerpos específicos para el analito de interés, lo que habitualmente se lleva a cabo mediante la inmunización de animales de laboratorio, si bien también es posible hacerlo empleando técnicas de biología molecular. Además, cuando el analito de interés es un compuesto de bajo peso molecular, como los fungicidas fluopyram y penthiopyrad, también es necesaria la preparación de especies en las que el analito queda unido a una macromolécula transportadora, como se describe a continuación. La obtención de ambos tipos de moléculas, denominadas en conjunto inmunorreactivos, es el primer objetivo a la hora de desarrollar un nuevo inmunoensayo.

#### **1.3.1. Moléculas pequeñas: Síntesis de haptenos como etapa clave**

El sistema inmunitario está bien preparado para generar anticuerpos frente a antígenos potencialmente patogénicos, tales como virus, bacterias o proteínas propias de éstos, todas ellas de gran tamaño a nivel molecular. Puesto que estos agentes pueden ser reconocidos por anticuerpos y además desencadenan por sí solas la respuesta inmunitaria adaptativa, se dice que son antigénicos e inmunogénicos. Por

ello, si el propósito fuese obtener anticuerpos dirigidos a macromoléculas, en teoría bastaría con la exposición periódica de la propia macromolécula al sistema inmunitario del animal de laboratorio. Además, debido a su gran tamaño, las especies de elevado peso molecular poseen varios dominios reconocibles por anticuerpos, denominados determinantes antigénicos o epítopos, por lo que pueden interactuar simultáneamente con anticuerpos de diferente especificidad.

A diferencia de las moléculas grandes, las moléculas pequeñas como los fármacos, los plaguicidas o las toxinas no son capaces de inducir la generación de anticuerpos, sino que son metabolizados y excretados por el organismo receptor o bien quedan acumulados en éste. Desde el punto de vista inmunológico, suele considerarse que una molécula es pequeña cuando su peso molecular es inferior a 1000 Da. Este es el caso de fungicidas como fluopyram o penthiopyrad, cuyos respectivos pesos moleculares son 397 y 359 Da. Sin embargo, los compuestos de bajo peso molecular sí pueden ser reconocidos por anticuerpos, en otras palabras, son antigénicos pero no inmunogénicos. Karl Landsteiner, considerado uno de los padres de la inmunología moderna, bautizó a este tipo de sustancias con el nombre de haptenos.<sup>102</sup> No obstante, los haptenos pueden convertirse en inmunogénicos si se enlazan covalentemente a una proteína transportadora, proceso que se denomina conjugación y que da lugar a un conjugado proteína–hapteno (Figura 1.10). De esta forma, el hapteno pasa a formar parte de los epítopos de dicha proteína, la cual sí es capaz de inducir la generación de anticuerpos. Otra propiedad de los haptenos es que constituyen un solo epítopo debido a su reducido tamaño, y por tanto sólo pueden interactuar simultáneamente con una molécula de anticuerpo, lo que tiene consecuencias prácticas para el desarrollo de métodos inmunológicos.



**Figura 1.10.** Representación esquemática de un conjugado proteína–hapteno.

En la mayoría de los casos en los que se desea generar anticuerpos frente a una molécula pequeña no es posible su unión covalente directa a una proteína transportadora, por lo que es necesario preparar previamente un análogo funcionalizado del compuesto diana (analito) que incorpore un grupo funcional para la conjugación. Desde el punto de vista inmunológico, dichos derivados sintéticos también son haptenos. A grandes rasgos, un hapteno funcionalizado consiste en la unión de tres elementos básicos: una estructura principal semejante al analito de interés, un grupo funcional para la posterior unión covalente a la proteína, y entre ambos un tercer elemento denominado brazo espaciador. Ante el gran número de posibilidades que ofrece este esquema general, el diseño de haptenos se convierte en una tarea crucial cuando se desean obtener anticuerpos de elevada afinidad y especificidad hacia una molécula pequeña.

El brazo espaciador tiene la función de facilitar la exposición de la estructura del analito al sistema inmunitario al separarla de la proteína transportadora, evitando así posibles enmascaramientos cercanos al lugar de conjugación. Es esencial que el espaciador no contenga elementos fuertemente inmunogénicos, esto es, agrupaciones capaces de establecer interacciones intermoleculares con facilidad, tales como heteroátomos, enlaces dobles C=C, anillos aromáticos, halógenos, grupos altamente polares, etc. De lo contrario, cabe la posibilidad de que los anticuerpos generados reconozcan el brazo espaciador en lugar de la estructura del analito.<sup>103,104</sup> Por ello, lo más habitual es que el espaciador sea una cadena hidrocarbonada alifática lineal de 4 a 6 átomos de carbono, longitud que permite una exposición óptima de la estructura del analito al sistema inmunitario, aunque se han descrito ejemplos de generación de anticuerpos empleando haptenos con brazos espaciadores de longitud inferior o superior a dicho intervalo.<sup>105</sup>

Por su parte, el grupo de conjugación escogido debe permitir llevar a cabo la unión del hapteno a la proteína de manera ortogonal, es decir, sin producirse uniones por sitios diferentes y manteniendo inalteradas las estructuras del analito y de la proteína. Los grupos funcionales de conjugación más usuales son carboxilato (–COOH), amino (–NH<sub>2</sub>), sulfhidrilo (–SH) e hidroxilo (–OH), aunque también se han descrito ejemplos con vinilsulfonas,<sup>106</sup> azidas<sup>107</sup> y otros grupos funcionales.<sup>108</sup> El grupo funcional introducido dependerá de la estrategia de conjugación escogida, como se describirá en la sección 1.3.2.

En cuanto a la estructura del analito, lo ideal es que la inclusión del brazo espaciador tenga las mínimas repercusiones en las características estereoelectrónicas de la molécula original, maximizándose así la probabilidad de generar anticuerpos de elevada afinidad y especificidad hacia ésta.<sup>109</sup> La preparación de un hapteno de estas características a partir del propio analito no siempre es sencilla y a veces ni siquiera es posible por carecer éste de la funcionalización adecuada en el lugar donde se desea introducir el espaciador. Tradicionalmente se ha recurrido a hacerlo con el mínimo esfuerzo sintético posible, aprovechando incluso las posiciones reactivas del propio analito, tales como los grupos nucleofílicos –OH, –NH<sub>2</sub> o –SH.<sup>110</sup> Sin embargo, este tipo de estrategias pueden implicar modificaciones importantes de las propiedades conformacionales o electrónicas de la molécula inicial, así como la eliminación o el enmascaramiento de zonas de posible interacción con anticuerpos. Por ello, para obtener un hapteno funcionalizado “a la carta”, una de las mejores aproximaciones es la síntesis total, que si bien implica un mayor esfuerzo sintético, suele repercutir en anticuerpos de mayor afinidad y especificidad y por tanto en métodos inmunoquímicos más sensibles y selectivos.<sup>109,111</sup>

### *1.3.1.1. Recursos para el diseño racional de haptenos funcionalizados*

Aunque la síntesis total permite prácticamente el acceso a cualquier hapteno deseado, lo cierto es que no se sabe a ciencia cierta si éste es el más adecuado para generar inmunidad hasta que no se caracterizan experimentalmente los anticuerpos generados. Por ello, es útil un diseño racional previo de los haptenos basándose en las pautas descritas anteriormente y haciendo uso de dos recursos ampliamente utilizados con este fin: la modelización molecular y, sobretudo, el principio de Landsteiner.

Karl Landsteiner, científico austríaco descubridor de los grupos sanguíneos y galardonado por ello con el Premio Nobel de Medicina en 1930, centró gran parte de su investigación en las interacciones antígeno/anticuerpo haciendo uso de moléculas pequeñas ancladas a proteínas transportadoras a las que bautizó haptenos, como se ha indicado anteriormente.<sup>102</sup> Sus estudios le llevaron a concluir que la zona del hapteno más distal a la posición del brazo espaciador, y por tanto más alejada de la proteína transportadora, es la más accesible y por tanto la mejor reconocida por los anticuerpos. En cambio, la zona del hapteno más proximal al espaciador sería menos accesible por su mayor cercanía con la proteína transportadora, siendo por tanto más difícil el reconocimiento molecular. Según este razonamiento, que ha sido denominado

posteriormente “principio de Landsteiner”, para obtener anticuerpos que reconozcan una determinada zona del analito, el brazo espaciador en el hapteno funcionalizado debería colocarse lo más alejado posible de dicha zona. El principio de Landsteiner ha sido ampliamente utilizado para racionalizar el diseño de haptenos y para explicar posteriormente la especificidad de anticuerpos generados frente a este tipo de antígenos.<sup>112,113</sup> El cumplimiento de este principio también queda patente cuando se hace uso de haptenos fragmentarios, que únicamente exponen una parte de la estructura del analito al sistema inmunitario.<sup>114,115</sup>

Por otra parte, la modelización molecular aplicada al diseño de haptenos implica la determinación de la conformación de menor energía tanto del analito como de los posibles haptenos y su posterior comparación.<sup>116</sup> En general, se lleva a cabo en primer lugar un análisis conformacional exhaustivo mediante mecánica molecular hasta dar con las estructuras de mínima energía, que después se refinan mediante métodos semiempíricos basados en mecánica cuántica. El mismo tipo de cálculos puede usarse adicionalmente para obtener mapas de potencial electrostático, que sirven para conocer la distribución de densidad electrónica de las moléculas de interés.<sup>117</sup> En principio, la comparación de los modelos computacionales obtenidos permite asumir que los haptenos más adecuados son aquellos cuya conformación más estable es más similar a la del analito, y análogamente cuando se comparan distribuciones de densidad electrónica. Sin embargo, hay que tener siempre presente que un escenario en el que también está presente un anticuerpo puede dar lugar a que el analito y/o los haptenos adopten una conformación diferente a la hallada y que suponga una situación de energía global todavía más baja. Por ello, los resultados obtenidos empleando esta herramienta a nivel predictivo no deben tomarse al pie de la letra, sino que deben servir como orientación para decidir qué hapteno es el más adecuado. En cambio, la modelización molecular con fines explicativos se emplea frecuentemente para racionalizar la afinidad observada para nuevos anticuerpos al comparar diferentes haptenos.<sup>118</sup>

### **1.3.2. Preparación de conjugados proteína–hapteno**

Como se ha indicado previamente, un conjugado proteína–hapteno es el resultado de unir covalentemente un hapteno funcionalizado a una proteína transportadora (Figura 1.10, sección 1.3.1). Para ello, se hace uso de los grupos funcionales reactivos presentes en las cadenas laterales de los residuos de los aminoácidos que componen la

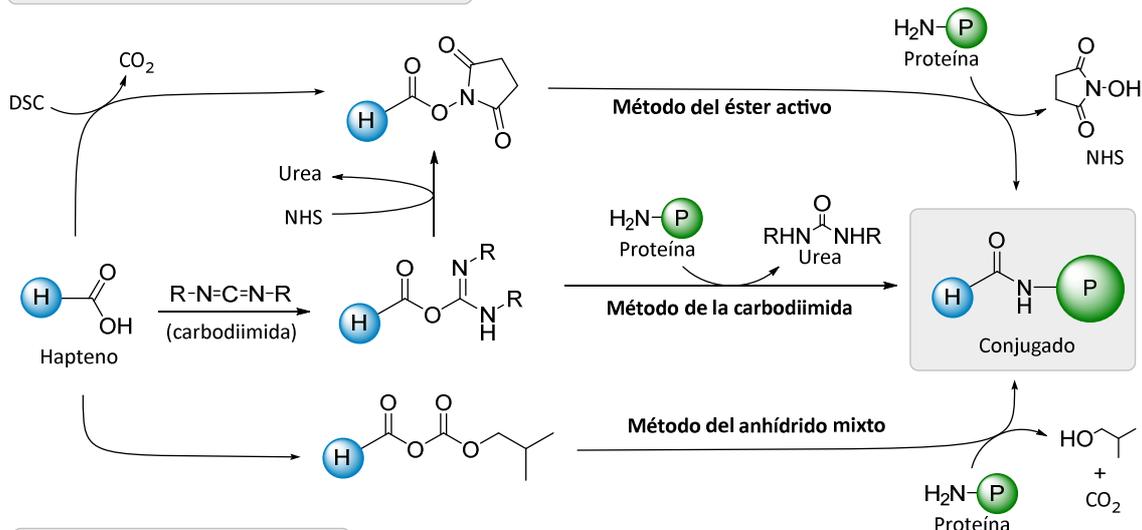
cadena polipeptídica, siendo los más frecuentes los grupos  $\epsilon$ -amino de residuos de lisina, los grupos carboxilato de residuos de aspartato y glutamato, y los grupos sulfhidrilo de residuos de cisteína. En principio, cualquier proteína exógena con suficientes grupos para conjugación accesibles sería válida para la preparación de un conjugado proteína–hapteno. Algunas de las más empleadas son las seroalbúminas bovina (BSA) y humana (HSA), la ovoalbúmina (OVA) y las hemocianinas de la lapa (KLH, *keyhole limpet hemocyanin*) y del cangrejo herradura (HCH, *horseshoe crab hemocyanin*).

La conjugación suele llevarse a cabo de forma directa, aunque también puede hacerse tras una derivatización previa de los grupos funcionales de la proteína, destacando la reacción de los grupos carboxilato de la macromolécula con diaminas como la etilendiamina con el fin de incrementar el número de grupos amino disponibles para la conjugación.<sup>119</sup> En consecuencia, existe un amplio abanico de posibilidades a la hora de preparar un conjugado proteína–hapteno.<sup>108</sup> Algunos métodos usuales de conjugación directa de haptenos funcionalizados a grupos amino y sulfhidrilo de la proteína se representan esquemáticamente en la Figura 1.11.

Entre las diferentes posibilidades, es muy habitual la preparación de haptenos con un grupo carboxilato en el extremo de su brazo espaciador para posteriormente llevar a cabo la conjugación sobre los grupos amino libres de la proteína, lo que da lugar a un enlace amida. La formación directa de este tipo de enlace a partir de un ácido carboxílico y una amina es costosa debido a la relativamente baja reactividad del ácido frente a la adición nucleofílica. En síntesis orgánica, este problema se resuelve clásicamente mediante una transformación previa del ácido carboxílico en un derivado más reactivo, como es el correspondiente cloruro de acilo. Para la preparación de bioconjugados se sigue una estrategia similar, aunque se emplean reactivos compatibles con la proteína para evitar su desnaturalización, como son los ésteres de cloroformiato (método del anhídrido mixto) o las carbodiimidias. Tras la activación, el derivado se hace reaccionar con la proteína a pH ligeramente básico para provocar la desprotonación de los grupos amino de ésta y favorecer así la conjugación.

El método de las carbodiimidias también puede combinarse con el uso de moléculas como la *N*-hidroxisuccinimida (NHS) para generar un éster de *N*-hidroxisuccinimidilo electrofílico, el cual también puede obtenerse mediante el tratamiento del hapteno con carbonato de *N,N'*-disuccinimidilo (DSC).<sup>120</sup> En este caso se hablaría del denominado método del éster activo, que se discutirá con detalle más

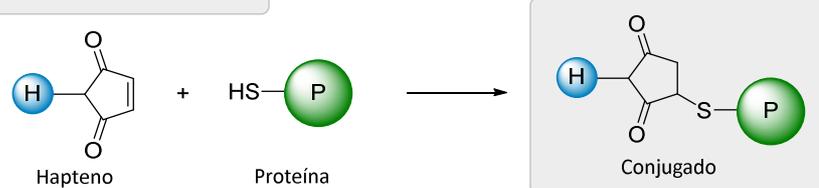
Métodos para haptenos con grupo carboxilo



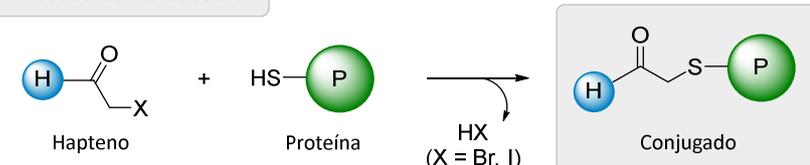
Conjugación vía base de Schiff



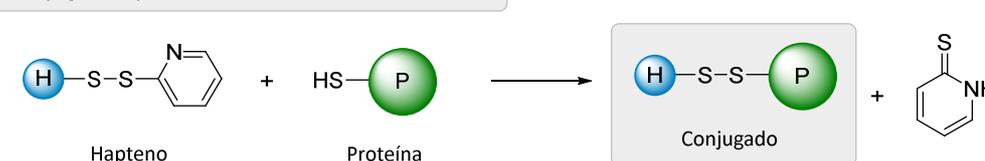
Método de la maleimida



Método del haloacetilo



Conjugación por intercambio de enlace disulfuro



**Figura 1.11.** Métodos más usuales de obtención de conjugados proteína–hapteno a partir de los grupos amino y sulfhidrilo libres de la proteína.<sup>108</sup>

adelante.<sup>121</sup> Una ventaja muy importante de esta variante es la posibilidad de purificar dicho éster, que es relativamente estable en condiciones anhidras, lo que evita posibles reacciones secundarias indeseadas y además facilita el control preciso de la

proporción de moléculas de hapteno conjugadas por molécula de proteína, parámetro conocido como relación molar hapteno/proteína (RM).

La RM de un conjugado proteína–hapteno es un parámetro cuya determinación reviste interés, ya que su valor óptimo es diferente en función de su finalidad. A modo de ejemplo, un conjugado con fines de inmunización requiere un valor moderadamente elevado de RM para favorecer la exposición del hapteno al sistema inmunitario, mientras que para conjugados destinados a ser empleados en inmunoensayos competitivos es recomendable un valor más reducido de RM, tal y como se detallará más adelante. La RM puede estimarse mediante espectrofotometría UV/vis cuando el hapteno absorbe radiación en esta región del espectro electromagnético. No obstante, la elevada capacidad actual de los equipos que hacen uso de técnicas como espectrometría de masas MALDI–TOF permite la medida precisa de la masa de macromoléculas, por lo que éstas también pueden usarse para el cálculo de la densidad hapténica de un conjugado.<sup>122</sup>

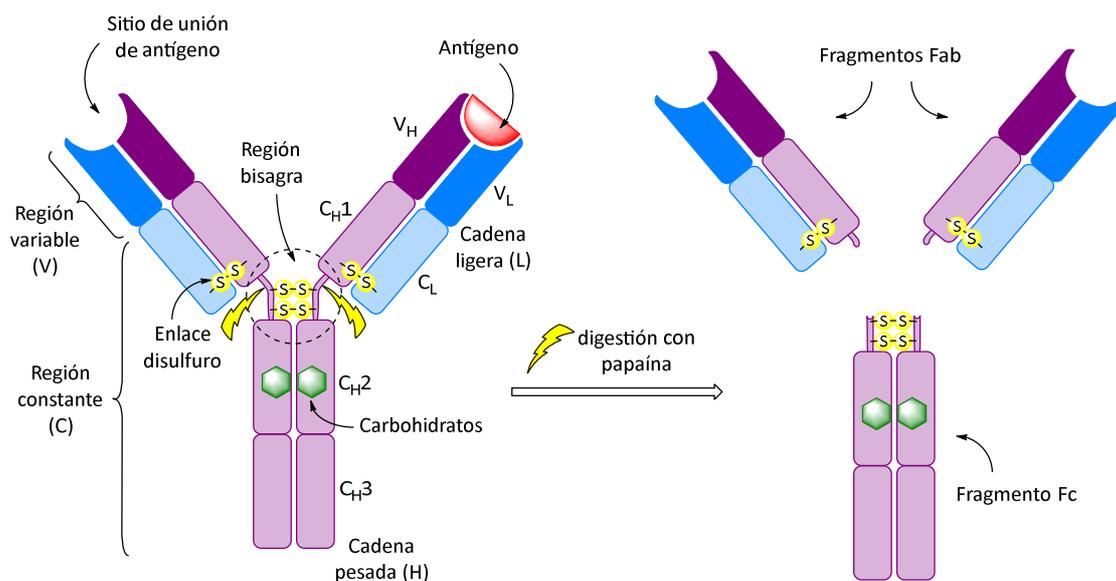
### **1.3.3. Generación de anticuerpos específicos**

La generación de inmunidad frente a un antígeno se traduce, entre otras cosas, en la biosíntesis y secreción masiva de anticuerpos en el organismo inmunizado por parte de células del sistema inmunitario, concretamente células plasmáticas o linfocitos B activados. Los anticuerpos, también llamados inmunoglobulinas (Ig), tienen la capacidad de unirse a su antígeno con una afinidad y especificidad extraordinarias, desencadenando después diferentes procesos para la eliminación del agente patógeno. Es precisamente esta elevada capacidad de reconocimiento molecular la que suscita el interés de obtenerlos con fines analíticos, pero también para aplicaciones biotecnológicas y biomédicas, como la inmunoterapia.<sup>123</sup> Algunos de los animales de laboratorio más empleados para la generación de anticuerpos son conejos, ratones y cabras.

#### *1.3.3.1. Estructura y clases de inmunoglobulinas*

Desde el punto de vista estructural, los anticuerpos son glicoproteínas cuya estructura simplificada recuerda a una “Y”. Para describirlos más detalladamente, se utilizará como modelo una Ig del tipo G, las más abundantes. Las IgG (Figura 1.12), de unos 150 kDa de peso, son heterodímeros constituidos por la unión de dos cadenas

polipeptídicas idénticas de 50 kDa y dos cadenas de 25 kDa también idénticas, denominadas respectivamente cadenas pesadas (H) y ligeras (L). Las cadenas pesadas se unen entre sí por dos enlaces disulfuro, mientras que cada una de ellas queda unida a una cadena ligera a través de otro enlace disulfuro. Por ello, las IgG son receptores bivalentes, con dos sitios de unión a antígeno o paratopos situados en los extremos *N*-terminal de las cadenas pesadas y ligeras, y por tanto capaces de unirse a dos moléculas de antígeno que expongan el mismo epítipo.



**Figura 1.12.** Representación esquemática de una inmunoglobulina G (IgG). Se indican los dominios ( $V_H$ ,  $V_L$ ,  $C_{H1}$ ,  $C_{H2}$ ,  $C_{H3}$  y  $C_L$ ), tipos de cadenas peptídicas (H y L) y regiones de su estructura (constante y variable), así como los fragmentos en que puede dividirse mediante proteólisis enzimática parcial con papaína (Fab y Fc).

Un análisis de la estructura primaria de las cadenas que componen las IgG revela que están formadas por unión de un cierto número de secuencias similares, aunque no idénticas entre sí, de unos 110 aminoácidos, denominadas dominios de inmunoglobulina. Las cadenas pesadas constan de 4 dominios de este tipo, mientras que las cadenas ligeras sólo contienen dos. Las secuencias de los dominios situados en el extremo *N*-terminal de ambos tipos de cadenas varían considerablemente de una IgG a otra, por lo que se conocen como dominios variables (V). Por otra parte, las secuencias del resto de dominios no cambian significativamente de una IgG a otra, por ello se denominan dominios constantes (C). De este modo, las cadenas ligeras están constituidas por dominios  $V_L$  y  $C_L$ , mientras que las cadenas pesadas constan de dominios  $V_H$ ,  $C_{H1}$ ,  $C_{H2}$  y  $C_{H3}$ . La agrupación de dominios  $C_H$  y  $C_L$  constituye la región constante de la IgG, mientras que la región variable está formada por los dominios  $V_H$  y

V<sub>L</sub>. Es precisamente en los extremos de estas últimas regiones donde tiene lugar la unión al antígeno, mientras que los dominios C<sub>H2</sub> están asociados a polisacáridos. Los diferentes dominios de una IgG se agrupan para dar lugar a tres lóbulos, obteniéndose así la forma de “Y”. En la región central de la macromolécula se sitúa la región bisagra, llamada así por su elevada flexibilidad, que permite la movilidad de los lóbulos.

La utilización de enzimas proteolíticas puede dar lugar a la ruptura de la IgG en diferentes fragmentos. Así, la utilización de papaína fragmenta selectivamente las cadenas pesadas en la región bisagra por encima de los enlaces disulfuro que las unen, lo que da lugar a la formación de tres fragmentos correspondientes a los tres lóbulos de la IgG original: dos fragmentos idénticos que contienen dominios constantes y variables, y por tanto los sitios de unión a antígeno, y un tercer fragmento que sólo contiene dominios constantes. Por su capacidad de reconocimiento molecular, los primeros se llaman fragmentos que unen antígeno (Fab, *fragment antigen binding*). Por su parte, el fragmento formado por los dominios C<sub>H2</sub> y C<sub>H3</sub> es cristizable, por ello se conoce como fragmento que cristaliza (Fc, *fragment that crystallizes*).

Las diferentes variaciones en las secuencias de las regiones constantes de las Ig dan lugar a diferencias en su tamaño, carga, solubilidad y función. Estas variaciones originan distintos tipos de cadenas pesadas y ligeras, lo que a su vez permite la clasificación de las Ig en varias clases y subclases. Las cadenas ligeras pueden ser de tipos  $\kappa$  o  $\lambda$ , mientras que los tipos de cadenas pesadas son  $\alpha$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\gamma$  y  $\mu$ . La función de una Ig no se ve afectada por la cadena ligera, pero está estrechamente relacionada con el tipo de cadena pesada que la conforma. Por ello, cada tipo de cadena pesada da lugar a una clase o isotipo de Ig: IgA (cadena  $\alpha$ ), IgD (cadena  $\delta$ ), IgE (cadena  $\epsilon$ ), IgG (cadena  $\gamma$ ) e IgM (cadena  $\mu$ ). Entre ellas, las IgG destacan por su mayoritaria presencia en el suero sanguíneo y por su mejorada afinidad y especificidad hacia los antígenos, lo que deriva del hecho de que se producen como parte de la maduración de la respuesta inmunitaria, tal y como se describirá en la sección 1.3.4. Por otra parte, el carácter hidrofóbico o hidrofílico de los aminoácidos más cercanos al extremo C-terminal de las cadenas pesadas determina si las Ig actuarán como receptores de membrana o bien como proteínas solubles secretadas al medio extracelular.

### 1.3.3.2. Tipos de anticuerpos según su modo de generación

En el contexto de la generación artificial de anticuerpos con fines analíticos, biomédicos o biotecnológicos, éstos pueden clasificarse en tres grandes categorías

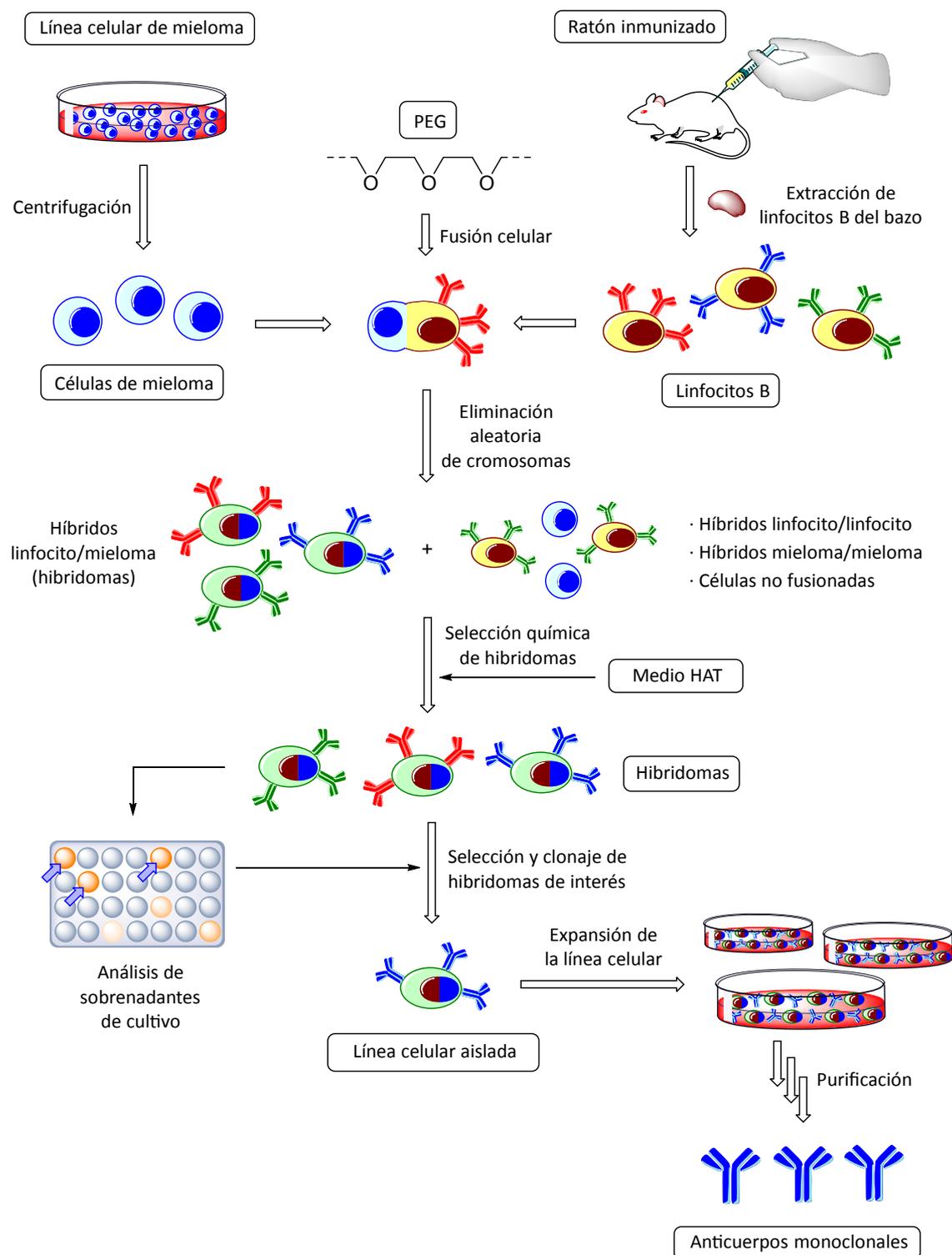
según su manera de obtenerse: policlonales, monoclonales o recombinantes. Los anticuerpos policlonales (pAbs) se obtienen a partir del suero sanguíneo del animal inmunizado, y constituyen una mezcla compleja de todos los tipos de anticuerpos generados con un mismo inmunógeno, cada uno de ellos procedente de un clon de linfocitos B distinto y por tanto con una afinidad y especificidad diferente. Por ello, sus características representan un promedio de la respuesta inmunitaria del animal, lo que puede ser útil para evaluar la idoneidad del inmunógeno empleado para la generación de anticuerpos. Su obtención es relativamente sencilla, económica y rápida, habitualmente de 3 a 4 meses, pero presentan como principal inconveniente su carácter limitado y su escasa reproducibilidad debido a la variabilidad entre animales inmunizados.

Los anticuerpos monoclonales (mAbs) son inmunoglobulinas obtenidas *in vitro* mediante la generación y cultivo de células especiales denominadas hibridomas,<sup>124</sup> como se describirá a continuación. Los mAbs se generan a partir de una única línea celular inmortal procedente de un clon de linfocitos B del animal inmunizado, por lo que su afinidad y especificidad están bien definidas y además pueden obtenerse de manera ilimitada y totalmente reproducible, a diferencia de lo que sucede con los pAbs. A cambio, su generación es más compleja, costosa y lenta (usualmente en torno a 7 meses), pero repercute en anticuerpos de muy elevado interés por sus excelentes propiedades.

Finalmente, los anticuerpos recombinantes (rAbs) se obtienen por aplicación de técnicas de biología molecular, partiendo de librerías génicas sintéticas o semisintéticas o bien tras el aislamiento de los genes que codifican las Ig en los hibridomas. La posterior clonación y expresión de éstos en otros organismos da lugar a anticuerpos con propiedades muy concretas.<sup>125</sup> Además, la utilización de este tipo de estrategias posibilita la modificación de las propiedades de unión al ligando por mutagénesis y un menor uso de animales de laboratorio.

#### 1.3.3.3. *Obtención de anticuerpos monoclonales*

Como se ha avanzado previamente, la generación de anticuerpos monoclonales se lleva a cabo mediante la aplicación de la tecnología de hibridomas, introducida inicialmente por Georges Köhler y Cesar Milstein en 1975.<sup>124</sup> Esta tecnología surgió como respuesta a la necesidad de obtener poblaciones homogéneas de anticuerpos con el fin de evitar los problemas de reproducibilidad asociados al uso de antisueros



**Figura 1.13.** Representación esquemática del procedimiento experimental para la obtención de anticuerpos monoclonales mediante generación de hibridomas.

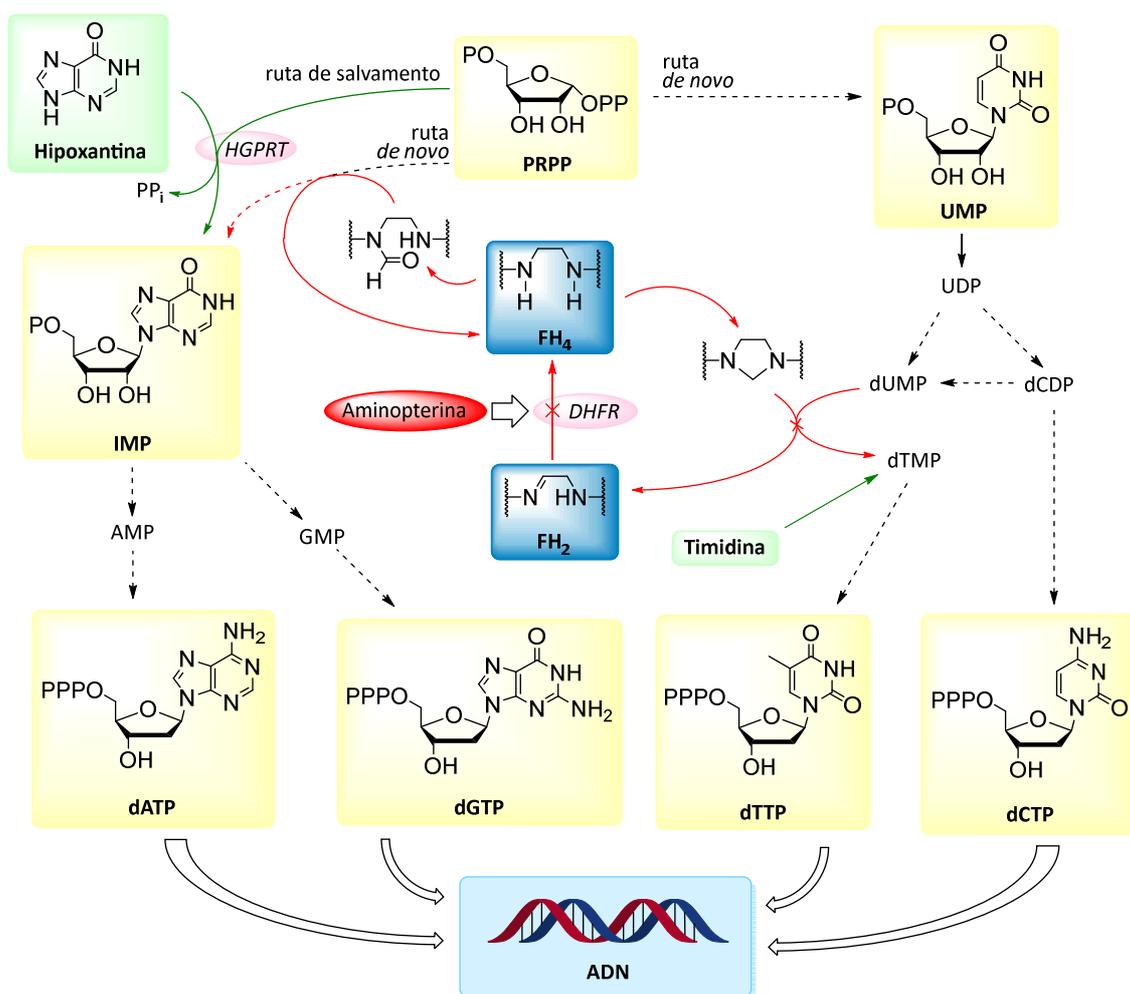
(anticuerpos policlonales) con diversos fines. La técnica desarrollada tuvo tal relevancia que ambos científicos recibieron por ello el Premio Nobel de Medicina en 1984. El procedimiento, esquematizado en la Figura 1.13, implica la fusión celular de linfocitos B del bazo de un animal inmunizado, usualmente un ratón, con células

tumorales de mieloma de la misma especie. Ello da lugar a la generación de células híbridas, denominadas hibridomas, con la capacidad simultánea de secretar el mismo anticuerpo que el linfocito B original y de replicarse indefinidamente. La selección, aislamiento y estabilización posterior de una línea celular concreta de hibridoma permite la producción de un solo tipo de anticuerpo en tanta cantidad como se necesite.

La fusión celular de linfocitos B y mielomas es necesaria para perpetuar la línea celular, ya que los linfocitos no sobreviven tiempos largos en cultivo celular *in vitro*. Para llevar a cabo la fusión se utiliza polietilenglicol (PEG), que es capaz de disolver parcialmente las membranas celulares, aunque con nula selectividad, lo que constituye el principal inconveniente de la técnica. En consecuencia, tras la eliminación aleatoria de material genético en las células binucleadas inicialmente formadas tras la fusión, se obtienen células híbridas de todos los tipos posibles: mieloma/mieloma, linfocito/linfocito e hibridomas propiamente dichos, además de células inalteradas. Tanto los híbridos mieloma/mieloma como los mielomas no fusionados podrían crecer indefinidamente junto a los hibridomas o incluso desplazarlos, por lo que es necesario un método de selección para eliminarlos. La selección química de hibridomas se consigue combinando una modificación genética introducida en los mielomas con la adición de aminopterina, lo que provoca que únicamente los hibridomas sean capaces de biosintetizar nucleótidos para generar nuevo ADN, necesario para su replicación indefinida. El método de selección y las rutas metabólicas implicadas se esquematizan en la Figura 1.14.

La aminopterina inhibe la dihidrofolato reductasa (DHFR), bloqueando la conversión de dihidrofolato ( $FH_2$ ) en tetrahidrofolato ( $FH_4$ ). Ello impide la síntesis *de novo* de monofosfato de inosina (IMP), precursor de los dos nucleótidos púricos presentes en el ADN (dATP y dGTP), y a su vez la conversión de monofosfato de uridina (dUMP) en monofosfato de timidina (dTMP), precursor del nucleótido pirimidínico dTTP. La maquinaria celular está preparada para estas situaciones con la inclusión de las denominadas rutas de salvamento, que constituyen una vía secundaria de biosíntesis de nucleótidos. Así, existe una ruta alternativa para obtener dTMP a partir de timidina por acción de la timidina quinasa, mientras que el IMP puede biosintetizarse a partir de pirofosfato de fosforribosilo (PRPP) e hipoxantina bajo catálisis de la hipoxantina guanina fosforribosil transferasa (HGPRT). La modificación genética llevada a cabo sobre los mielomas implica precisamente el silenciamiento de

esta enzima, por lo que ni los mielomas ni los híbridos mieloma/mieloma son capaces de sintetizar nucleótidos púricos por la vía de salvamento, cosa que sí pueden hacer los hibridomas al proceder de linfocitos B sin dicha modificación. Por ello, en presencia de aminopterina sólo los hibridomas pueden biosintetizar todos los nucleótidos mediante las rutas de salvamento y prosperar, siempre y cuando exista disponibilidad de hipoxantina y timidina. De este modo, para llevar a cabo la selección química se emplea como medio post-fusión el denominado medio HAT, suplementado con los tres componentes claves del proceso: hipoxantina, aminopterina y timidina.



**Figura 1.14.** Influencia del medio HAT en las rutas de biosíntesis *de novo* y de salvamento de desoxirribonucleótidos.

Transcurridos de 10 a 12 días desde la fusión celular, período durante el que se produce el crecimiento selectivo de hibridomas, se lleva a cabo un análisis de los sobrenadantes de cultivo para localizar células secretoras de anticuerpos específicos para el analito de interés. En este sentido, es muy frecuente la utilización de ELISA, y particularmente en el ámbito de los analitos de bajo peso molecular la modalidad

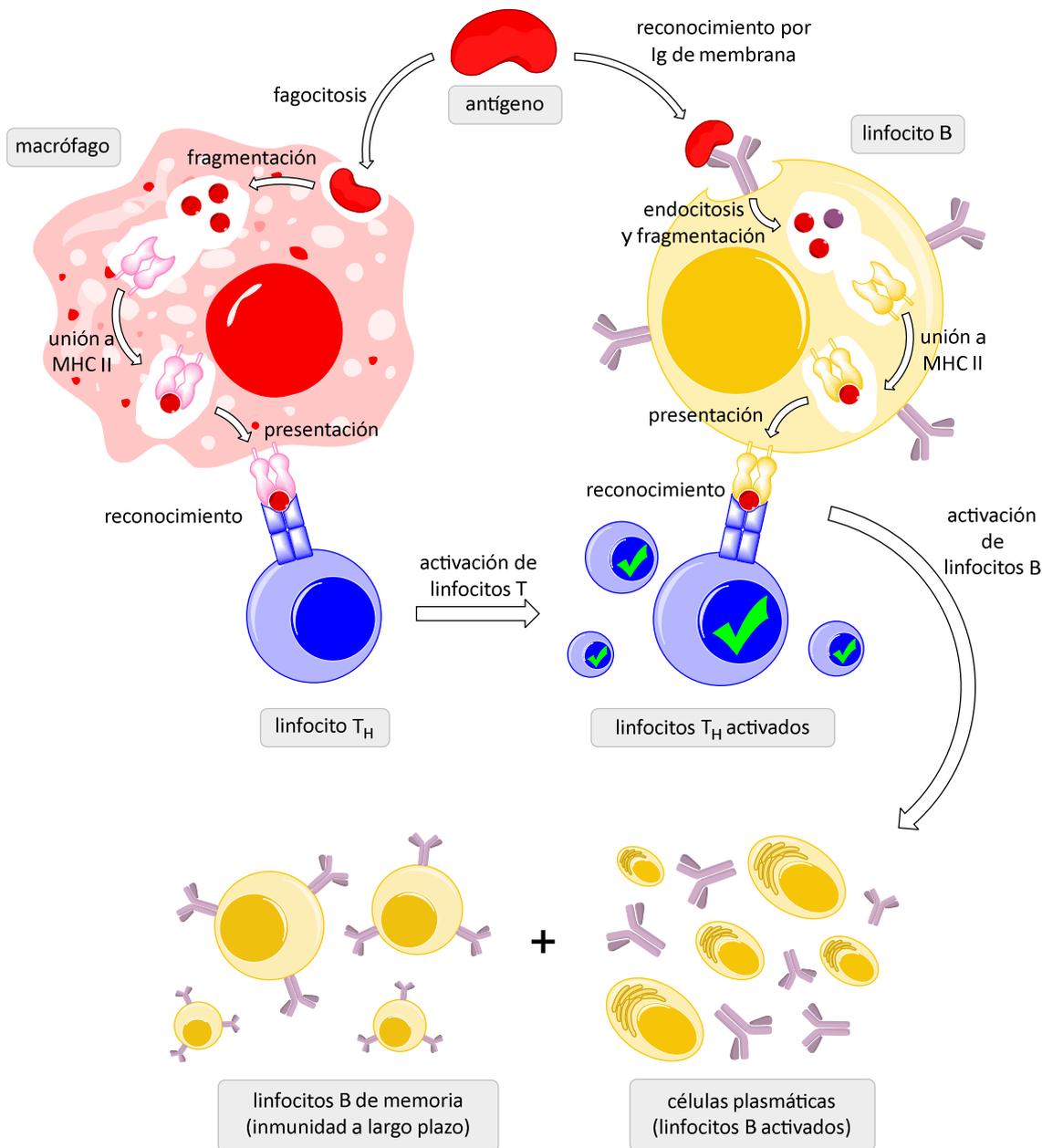
conocida como ELISA diferencial.<sup>126</sup> Adicionalmente, para seleccionar los hibridomas productores de los mejores anticuerpos es recomendable reevaluar mediante ELISA competitivo bidimensional los sobrenadantes con resultado positivo en el primer ensayo.<sup>127</sup>

Dado que un mismo pocillo de una microplaca de cultivo suele contener una mezcla de varios clones de hibridomas, de los cuales muy probablemente sólo uno de ellos genera anticuerpos para el analito de estudio, se lleva a cabo un proceso que conduce al aislamiento y estabilización de la línea celular deseada. El proceso se denomina clonaje o clonación, y habitualmente se lleva a cabo mediante el denominado método de dilución límite. Este método consiste en la homogeneización y dilución del contenido del pocillo para después sembrarlo en una nueva placa a razón de una sola célula por pocillo, lo que incrementa la probabilidad de obtener pocillos con un solo clon de hibridomas. Pasados varios días se reanalizan los sobrenadantes de cultivo, previa inspección de los pocillos al microscopio para localizar los pocillos con crecimiento celular, y se repite el ciclo varias veces hasta asegurar la monoclonalidad del hibridoma. Una vez aislada la línea celular híbrida, se cultiva en recipientes de tamaño cada vez mayor (expansión) hasta tener una cierta cantidad de células, parte de las cuales se conservan en N<sub>2</sub> líquido para su posterior utilización. El resto se utilizan para generar tanta cantidad de mAb como se desee, que posteriormente se extrae y purifica a partir del medio de cultivo.

#### **1.3.4. Métodos alternativos de inmunización**

La generación de inmunidad frente a un antígeno por parte del sistema inmunitario de los vertebrados, ya sea de forma natural frente a agentes patógenos o inducida por la inoculación deliberada de un inmunógeno, es un proceso complejo en el que participan de forma coordinada un gran número de elementos. La forma tradicional de generar inmunidad artificialmente es la inoculación periódica de un inmunógeno (un patógeno inactivado como en algunas vacunas o un conjugado proteína–hapteno en el caso de moléculas pequeñas), acompañado normalmente de una sustancia denominada adyuvante, que como se describirá más adelante actúa como un agente inmunopotenciador.<sup>128</sup> Sin embargo, en determinadas circunstancias no es posible la generación de respuesta inmunitaria mediante dicha metodología, por lo que es conveniente el desarrollo de métodos alternativos de inmunización que permitan acceder a anticuerpos en estas situaciones. En este sentido, es necesario un

conocimiento preciso de las diferentes etapas del proceso para comprender los factores de los que depende el éxito o no en la generación de anticuerpos de elevada afinidad y especificidad frente al antígeno.



**Figura 1.15.** Representación esquemática del mecanismo de la respuesta inmunitaria adaptativa frente a un antígeno de naturaleza peptídica.

Una vez que el organismo detecta la presencia del elemento extraño, se activa en primer lugar un conjunto de mecanismos destinados a su eliminación de forma rápida e inespecífica, lo que se conoce como respuesta inmunitaria innata.<sup>129</sup> Ésta se basa en la protección mediante barreras anatómicas (piel, mucosas, etc.) y fisiológicas (pH,

temperatura corporal), pero también humorales y celulares, entre las que destacan el sistema del complemento y la fagocitosis del antígeno por parte de leucocitos, en especial neutrófilos, células dendríticas y macrófagos. El sistema del complemento es un conjunto de proteínas presentes en el suero sanguíneo, que tras su activación mediante vías que pueden implicar o no la mediación de anticuerpos, promueven distintos procesos destinados a destruir el antígeno.<sup>129</sup> Por su parte, los leucocitos reclutados en el lugar de aparición del antígeno se encargan de su fagocitosis y posterior degradación intracelular. Aunque forme parte de la respuesta inmunitaria innata, la fagocitosis del antígeno por parte de macrófagos y/o células dendríticas es casi siempre el primer paso en la cascada de acontecimientos que provocan la adquisición de inmunidad específica frente a dicho antígeno, proceso denominado respuesta inmunitaria adaptativa y esquematizado en la Figura 1.15.<sup>130</sup>

El antígeno es fagocitado por un macrófago y se fusiona con lisosomas, donde se produce su degradación por parte de enzimas hidrolíticas para dar lugar a oligopéptidos del orden de 10 aminoácidos de longitud. Dichos péptidos son posteriormente capturados por las llamadas moléculas del complejo principal de histocompatibilidad de clase II (MHC II), desplazándose luego el complejo hasta la superficie del macrófago con el fin de presentar exteriormente el péptido capturado. La molécula de MHC II es una glicoproteína compuesta de dos cadenas peptídicas, las cuales forman un surco en el que puede unirse el péptido por interacciones con los residuos de los aminoácidos de la propia molécula de MHC II. Además, cada una de las cadenas contiene en el extremo opuesto al sitio de unión del péptido un dominio hidrofóbico para su anclaje a la membrana.

El complejo péptido/MHC II en la superficie del macrófago puede ser reconocido por un linfocito T auxiliar ( $T_H$ , también llamado T CD4+) a través de su receptor específico de antígeno. Dicho receptor es muy similar al fragmento Fab de las inmunoglobulinas (ver Figura 1.12, sección 1.3.3.1), ya que está formado por la unión de dos cadenas polipeptídicas con una región constante y otra variable, donde se halla el sitio de unión al antígeno (el complejo péptido/MHC II). Existen diversos mecanismos para generar una enorme variabilidad en dicho sitio de unión, lo que prácticamente posibilita el reconocimiento de cualquier complejo péptido/MHC II. Cada linfocito  $T_H$  expresa un solo tipo de receptor con especificidad por un solo complejo, de forma que su activación sólo tiene lugar cuando se produce un reconocimiento eficaz del complejo presentado por un macrófago u otra célula

presentadora. Una vez activado, el linfocito  $T_H$  prolifera (expansión clonal) y se diferencia en distintos tipos de células, y a su vez activa otros tipos de células inmunitarias, entre las que destacan especialmente los linfocitos T citotóxicos ( $T_C$ , también llamados T CD8+) y los linfocitos B, ambos específicos de antígeno. Los linfocitos  $T_C$  localizan y eliminan células propias infectadas con el antígeno, comunicándose con ellas de forma similar a la interacción con los macrófagos pero haciendo uso de moléculas de MHC de clase I (respuesta inmunitaria celular). Por su parte, son precisamente los linfocitos B los encargados, una vez son activados por los linfocitos  $T_H$ , de la generación de anticuerpos específicos para el antígeno (respuesta inmunitaria humoral).

Los linfocitos B, al igual que los macrófagos, tienen la capacidad de invaginar antígenos, con la diferencia de que en estos casos la endocitosis es mediada por Ig de membrana que actúan como receptores, y por tanto es específica. Al igual que los receptores de los linfocitos T, existen mecanismos para generar una gran variabilidad en las Ig, lo que posibilita el reconocimiento de prácticamente cualquier antígeno. Del mismo modo, cada linfocito B expresa un solo tipo de Ig de membrana con especificidad por un solo antígeno. Una vez endocitado, el complejo Ig/antígeno es degradado igualmente en péptidos de pequeño tamaño, que son capturados y presentados por una molécula de MHC II idéntica a la del macrófago. De este modo, si un linfocito  $T_H$  previamente activado por el reconocimiento de un cierto complejo péptido/MHC II, presentado por un macrófago, reconoce el mismo complejo presentado por un linfocito B, tiene lugar la activación de éste último. Ello conlleva su expansión clonal y su diferenciación en células plasmáticas y linfocitos B de memoria. Las células plasmáticas están preparadas para la secreción masiva de anticuerpos con idéntica capacidad de reconocimiento de antígeno que las Ig de membrana del linfocito B original, y sólo sobreviven unos pocos días hasta contener la infección. En cambio, los linfocitos B de memoria son capaces de perdurar en el tiempo incluso años, y constituyen la base de la inmunidad a largo plazo.

Mediante todo este sistema, que producido tras el primer contacto con el antígeno se denomina respuesta inmunitaria adaptativa primaria o simplemente respuesta inmunitaria primaria, se genera una defensa específica frente a un elemento extraño tanto a nivel celular (eliminación de células infectadas por linfocitos  $T_C$ , entre otras) como humoral (marcaje de antígenos con anticuerpos). Por otra parte, la generación de células de memoria posibilita una respuesta mucho más eficiente ante futuros

contactos con el antígeno, denominada respuesta inmunitaria secundaria, ya que el organismo estaría previamente enriquecido en linfocitos B específicos para el antígeno. En estos casos también se producen una serie de mutaciones en los anticuerpos y en los receptores de los linfocitos T, de manera que se seleccionan preferentemente aquellos mutantes que desarrollan los receptores con mejor capacidad de reconocimiento. Es decir, la respuesta inmunitaria secundaria se caracteriza por ser mucho más eficaz que la primaria y por dar lugar a un proceso de maduración de la afinidad y especificidad de los anticuerpos.

Aunque existen determinados antígenos que inducen la activación de los linfocitos B sin necesidad de interacción con linfocitos T<sub>H</sub> activados,<sup>131</sup> lo más habitual es que sea necesaria la activación previa de estos últimos, para lo cual es vital el primero paso de fagocitosis del antígeno por parte del macrófago. En este sentido, el tamaño del antígeno es un factor muy importante, ya que la fagocitosis por parte del macrófago se produce cuando éste detecta a su alrededor elementos extraños no solubles o material particulado, incluyendo bacterias y virus. Las proteínas exógenas, a pesar de ser inmunogénicas por su carácter macromolecular, son solubles y además demasiado pequeñas como para ser inmediatamente fagocitadas. Lo mismo se puede decir de las moléculas más pequeñas, que además no son inmunogénicas (ver sección 1.3.1). Por este motivo, cuando se inoculan proteínas o conjugados proteína–hapteno para generar anticuerpos es necesario emplear adyuvantes, como se ha apuntado al principio de esta sección. Un adyuvante es una sustancia o una mezcla de sustancias capaces de activar elementos de la respuesta inmunitaria innata (inflamación, reclutamiento de leucocitos, etc.) y a su vez de favorecer la respuesta inmunitaria adaptativa frente a antígenos que no cumplen los requisitos para ser eficazmente presentados al sistema inmunitario.

A lo largo de la historia se han desarrollado distintos tipos de adyuvantes, cada uno con unas características y una efectividad diferentes, algunos destinados específicamente a la generación de anticuerpos con fines experimentales.<sup>128</sup> En este caso, los más conocidos son las sales de aluminio (hidróxido, fosfato, etc.), con capacidad de formar geles, y los aceites minerales, que sirven para preparar emulsiones. Dentro de este último grupo se encuentra el adyuvante históricamente más empleado, conocido como adyuvante de Freund. Formulado por primera vez en 1937 por Jules Freund,<sup>132</sup> está compuesto por una mezcla de aceite de parafina y monooleato de manosa, y en su versión completa también contiene restos de

*Mycobacterium tuberculosis* inactivada. La mezcla vigorosa del antígeno (en medio acuoso) con el adyuvante (basado en un medio apolar) da lugar a una emulsión, que tras ser inoculada forma depósitos insolubles y permite una liberación lenta del antígeno. La naturaleza extraña de esta mezcla y de las bacterias de la versión completa del adyuvante en el lugar de inoculación atrae la presencia de leucocitos, de modo que en algún momento el antígeno infiltrado en la emulsión será invaginado por los macrófagos reclutados. A partir de este punto, si el antígeno tiene parte peptídica, será procesado por el propio sistema inmunitario tal y como se ha descrito anteriormente. Por sus excelentes resultados, se han descrito multitud de trabajos en los que se hace uso de este adyuvante con el fin de generar anticuerpos.<sup>133</sup>

Desde la perspectiva de desarrollar métodos alternativos de inmunización, y dada la gran sofisticación que caracteriza al sistema inmunitario una vez iniciado el proceso de respuesta adaptativa, la mejor opción es precisamente favorecer el paso de fagocitosis por parte del macrófago. Los adyuvantes tradicionales permiten llevar a cabo esta tarea, pero el principal inconveniente de algunos de ellos es que suelen tener efectos secundarios en el animal de laboratorio e incluso pueden ser tóxicos para el propio manipulador. Así, el adyuvante de Freund suele provocar heridas considerables en el animal inmunizado, típicamente necrosis local, inflamación granulomatosa o absceso. Por ello, en una sociedad cada vez más comprometida con el bienestar animal, es más necesaria que nunca la búsqueda de adyuvantes alternativos menos agresivos.<sup>128</sup> Otra opción es la utilización de inmunógenos con carácter autoadyuvante, y en este sentido, una aproximación cada vez más estudiada es llevar a cabo la inmunización haciendo uso de nanomateriales.

Los nanomateriales se definen como aquellos materiales cuyo tamaño oscila entre 1 y 1000 nm. Sus particulares propiedades los hacen útiles para un sinnúmero de aplicaciones de todo tipo, entre las que se incluyen las asociadas a su relación con el sistema inmunitario. Los nanomateriales pueden interactuar con diversos receptores celulares y proteínas para inducir la respuesta inmunitaria tanto a nivel humoral como celular. En función de sus características (tamaño, forma, carga superficial, etc.), diversos tipos de nanopartículas pueden modular la respuesta inmunitaria, ya sea activándola, inhibiéndola o incluso suprimiéndola.<sup>134-136</sup> Además, pueden ser fagocitados por células inmunitarias debido a su tamaño, similar al de los elementos mejor captados como virus o bacterias, y pueden emplearse como vehículos para el transporte de antígenos<sup>137,138</sup> y su posterior liberación controlada.<sup>139-141</sup> Estas

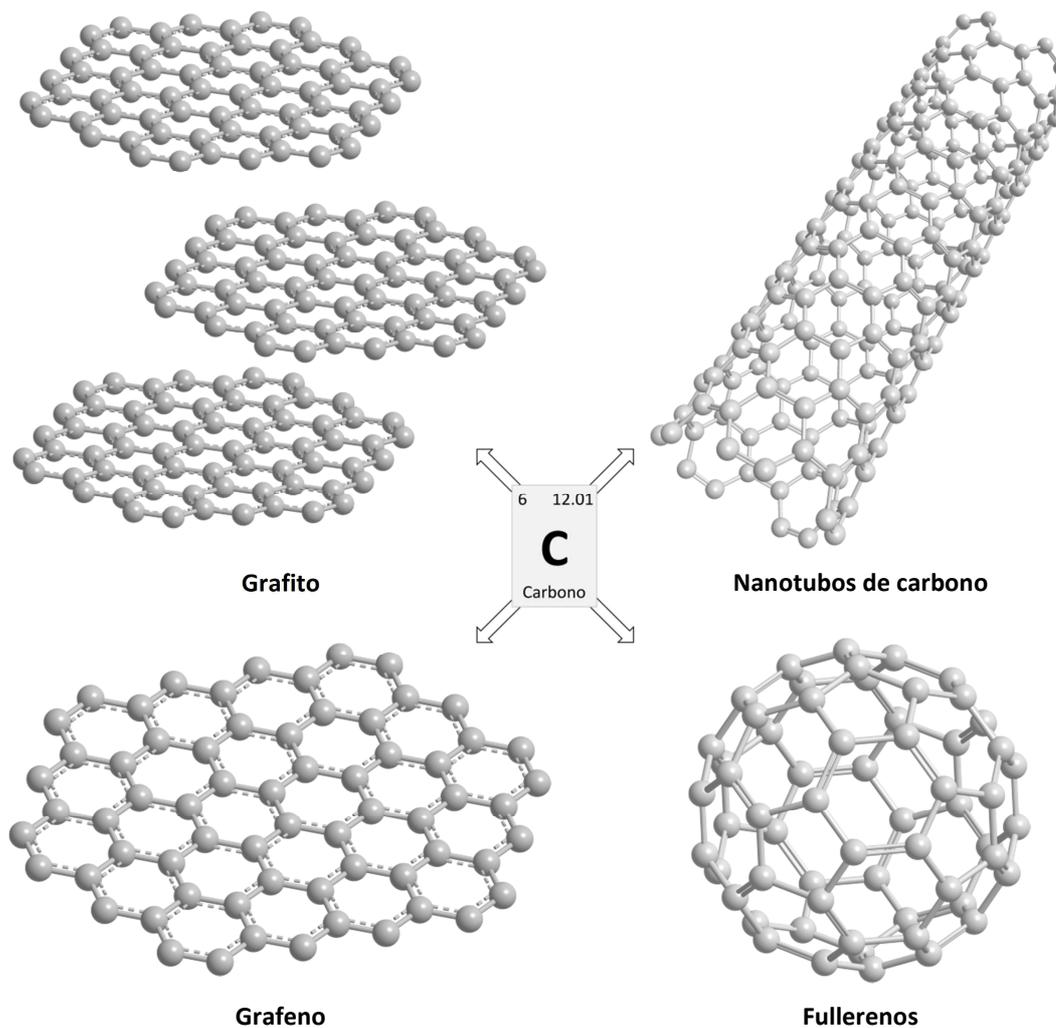
características los convierten en inmunógenos alternativos con potencial carácter adyuvante, ya que podrían favorecer la presentación de los antígenos al sistema inmunitario.

Existen dos grandes aproximaciones para llevar a cabo el transporte de un antígeno por parte de un nanomaterial. Un método consiste en el encapsulamiento del antígeno en el interior de un material biodegradable usualmente de tipo polimérico,<sup>142</sup> destacando el uso de ácido poliláctico-glicólico<sup>143,144</sup> e hidrogeles basados en poliacrilatos entrecruzados con puentes disulfuro.<sup>137</sup> Esta estrategia también está siendo investigada para emplearse con otras moléculas de interés biológico o biomédico, por ejemplo para el transporte y liberación controlada de fármacos en el sitio de acción concreto.<sup>145</sup> Otra posibilidad implica el transporte por adsorción o bien por unión covalente del antígeno a la superficie de un nanomaterial. En este caso se ha estudiado bastante el papel de las nanopartículas de oro, de las que se sabe bien que son capaces de activar la respuesta inmunitaria adaptativa.<sup>146,147</sup> Se ha descrito la generación de anticuerpos frente a antígenos soportados sobre este tipo de nanomaterial, con papel de vehículo transportador y a la vez de adyuvante, logrando respuestas comparables o incluso superiores a las obtenidas con adyuvantes tradicionales.<sup>148,149</sup> Del mismo modo, se está investigando el uso de otras nanoestructuras con la misma finalidad, como *nanobeads* metálicas,<sup>150</sup> nanopartículas basadas en polímeros orgánicos sintéticos<sup>151,152</sup> o nanotubos de carbono,<sup>153,154</sup> entre otros.

#### 1.3.4.1. *Conjugados basados en nanotubos de carbono*

No hay duda de que el carbono es uno de los elementos más versátiles de la naturaleza, pues en él se basan todas las formas de vida conocidas, la gran familia de compuestos químicos denominados genéricamente compuestos orgánicos, y una amplia gama de materiales y nanomateriales que con toda seguridad estarán presentes en nuestra vida cotidiana en un futuro próximo. Uno de los materiales más prometedores de la actualidad es el conocido como grafeno, un alótropo del carbono consistente en una lámina formada por un número indefinido de anillos de benceno fusionados, lo que da lugar a una red plana de átomos de carbono con hibridación  $sp^2$ . Esta estructura lo convierte en un material semiconductor, flexible y casi transparente, por lo que se prevé que tendrá un gran número de aplicaciones tecnológicas.

La manipulación de una lámina de grafeno origina otros alótopos del carbono, algunos de los cuales se muestran en la Figura 1.16. La apilación de láminas de grafeno da lugar al grafito, presente en la naturaleza y empleado para fabricar lápices, mientras que un plegamiento esférico con pérdida de algunos átomos de carbono da lugar a los conocidos fullerenos. Cuando el plegamiento de la lámina se produce de forma cilíndrica, se obtienen los llamados nanotubos de carbono, que fueron descritos por primera vez en 1991.<sup>155</sup>



**Figura 1.16.** Modelos tridimensionales para algunas formas alotrópicas del carbono, entre los que se incluyen los nanotubos de carbono. Las estructuras se han obtenido con el software ChemBio3D Ultra 13.0.

Los nanotubos de carbono pueden estar formados por una o varias capas de grafeno concéntricas, lo que da lugar a dos grandes subgrupos.<sup>156</sup> Cuando sólo constan de una lámina de grafeno enrollada se denominan nanotubos de pared simple (SWNT, *single-walled carbon nanotubes*), con un diámetro habitualmente de 1–2 nm. En

cambio, si los nanotubos están conformados por varias láminas de grafeno concéntricas se denominan nanotubos de pared múltiple (MWNT, *multi-walled carbon nanotubes*), lo que suele dar lugar a estructuras cilíndricas de unos 50–100 nm de grosor en función del número de capas. Ambos tipos de nanotubos pueden alcanzar longitudes de varias micras, pudiéndose observar su forma característica con claridad mediante microscopía electrónica.

Debido a su origen estructural, los nanotubos de carbono presentan unas propiedades físicas parecidas a las del grafeno en cuanto a conductividad eléctrica, flexibilidad y resistencia mecánica. En cuanto a sus propiedades químicas, la ausencia de enlaces o grupos funcionales polares en su estructura los hace ser muy insolubles en disolventes polares como el agua, y su carácter poliaromático los convierte en especies muy poco reactivas. De hecho, las reacciones típicas de funcionalización de nanotubos de carbono se suelen caracterizar por condiciones drásticas, tiempos de reacción elevados y rendimientos bajos.<sup>157</sup> Por ello, cada vez es más usual llevar a cabo la funcionalización de nanotubos de carbono empleando química asistida por microondas,<sup>158,159</sup> ya que estos nanomateriales han demostrado absorber muy eficientemente este tipo de radiación electromagnética,<sup>160</sup> lo que propicia una importante reducción del tiempo de reacción. Entre las estrategias más usuales para introducir un primer grupo funcional sobre los nanotubos, destacan la fragmentación oxidativa,<sup>161</sup> la inserción radicalaria<sup>162</sup> y la cicloadición 1,3-dipolar.<sup>163</sup>

En cuanto a sus aplicaciones biológicas y biotecnológicas, los nanotubos de carbono parecen ser materiales biocompatibles debido precisamente a su elevada inercia, y han demostrado ser capaces de ser invaginados por células sin alterar de modo alguno su funcionamiento normal.<sup>164</sup> Ello los convierte en vehículos adecuados para el transporte de diversas moléculas de interés tras su unión previa por adsorción o enlace covalente. Se han descrito ejemplos de conjugados basados en nanotubos de carbono para el transporte de fármacos<sup>165</sup> o ADN,<sup>166</sup> pero también de proteínas y péptidos con el fin de inmunizar animales.<sup>167</sup> En este sentido, los nanotubos de carbono emulan bien el tamaño y la forma de las bacterias, además de ser similares a éstas en cuanto a su insolubilidad en medio acuoso y su dispersabilidad. Por ello, su fagocitosis por parte de macrófagos debería resultar sencilla, lo que favorecería la entrega del antígeno al sistema inmunitario.

El uso de nanotubos de carbono también ha permitido la activación de la respuesta inmunitaria frente a antígenos de bajo peso molecular. Así, en nuestro laboratorio se

han obtenido anticuerpos de elevado título y afinidad hacia el fungicida azoxystrobin empleando complejos obtenidos por unión covalente de un conjugado proteína-hapteno derivado de dicho analito a nanotubos de carbono.<sup>168</sup> Se prepararon constructos haciendo uso de nanotubos de diferentes dimensiones, diferenciándose básicamente en su longitud y grosor, y se encontró que los mejores resultados se obtenían al emplear nanotubos gruesos y cortos, obtenidos por fragmentación oxidativa de nanotubos multicapa. Además, se encontró que los nanotubos ejercían cierto efecto adyuvante sin causar heridas a los animales inmunizados. Por todo ello, el uso de este tipo de inmunógenos constituye una alternativa muy prometedora a las metodologías tradicionales de inmunización.

### 1.4. Desarrollo de inmunoensayos

Una vez se han obtenido anticuerpos específicos para el analito de interés, es necesario evaluar su capacidad de reconocimiento molecular con el fin de seleccionar los más adecuados para desarrollar el método inmunoquímico deseado. Una vez escogidos los inmunorreactivos y diseñado el inmunoensayo, se debe llevar a cabo una optimización de sus diferentes variables experimentales para completar su desarrollo. Por último, para verificar que el método es cuantitativo y fiable, se debe proceder a su validación analítica frente a una técnica de referencia establecida previamente, usualmente de tipo cromatográfico.

#### **1.4.1. Caracterización de anticuerpos y diseño del inmunoensayo**

Las propiedades más importantes a la hora de caracterizar cualquier anticuerpo son su afinidad y especificidad hacia el analito de interés. La afinidad corresponde a la tendencia del anticuerpo a interaccionar con el analito, es decir, a la intensidad con la que se forma el complejo anticuerpo/analito. Dado que la afinidad de un anticuerpo es generalmente elevada, la afinidad suele expresarse en términos de disociación del complejo, de modo que un anticuerpo muy afín a su analito no tiende a disociarse de éste una vez se ha producido el reconocimiento.

Por su parte, la especificidad de un anticuerpo corresponde a su capacidad para reconocer exclusivamente el analito de interés, es decir, es la selectividad de la interacción. En principio, es deseable que un anticuerpo sea lo más específico posible para evitar posibles interferencias debidas al reconocimiento de compuestos con

estructuras similares a las del analito. Sin embargo, en ocasiones interesa el desarrollo de un método inmunoquímico genérico, capaz de medir la concentración de varias formas de un mismo analito o bien de compuestos diferentes pertenecientes a una misma familia.<sup>169</sup>

La caracterización de anticuerpos en términos de afinidad y especificidad puede llevarse a cabo mediante diferentes técnicas, entre las que se incluiría la propia técnica inmunoquímica en la que se basa el método que se desea desarrollar. En este sentido, una de las técnicas inmunoquímicas más empleadas en el caso de analitos de bajo peso molecular, como son los fungicidas fluopyram y penthiopyrad, es la modalidad de ELISA conocida como ELISA competitivo, dada su facilidad de uso y la rapidez en la obtención de resultados.

#### 1.4.1.1. *ELISA competitivo y sus distintos formatos*

Como se indicó en la sección 1.2.2, la técnica de ELISA es una de las más empleadas en inmunoquímica. Se basa en llevar a cabo la reacción antígeno/anticuerpo tras la inmovilización previa de uno de los componentes sobre un soporte sólido y el marcaje enzimático del inmunorreactivo no inmovilizado. Más tarde, se evalúa el grado de reconocimiento por adición de un sustrato de la enzima de marcaje que dé lugar a una señal interpretable, como absorbancia o luminiscencia. Aunque existen diferentes soportes, lo más habitual es que los inmunoensayos enzimáticos se lleven a cabo en microplacas de poliestireno de 96 pocillos, de modo que la inmovilización inicial se produce por adsorción inespecífica debida a la activación previa de la superficie mediante irradiación con rayos gamma.

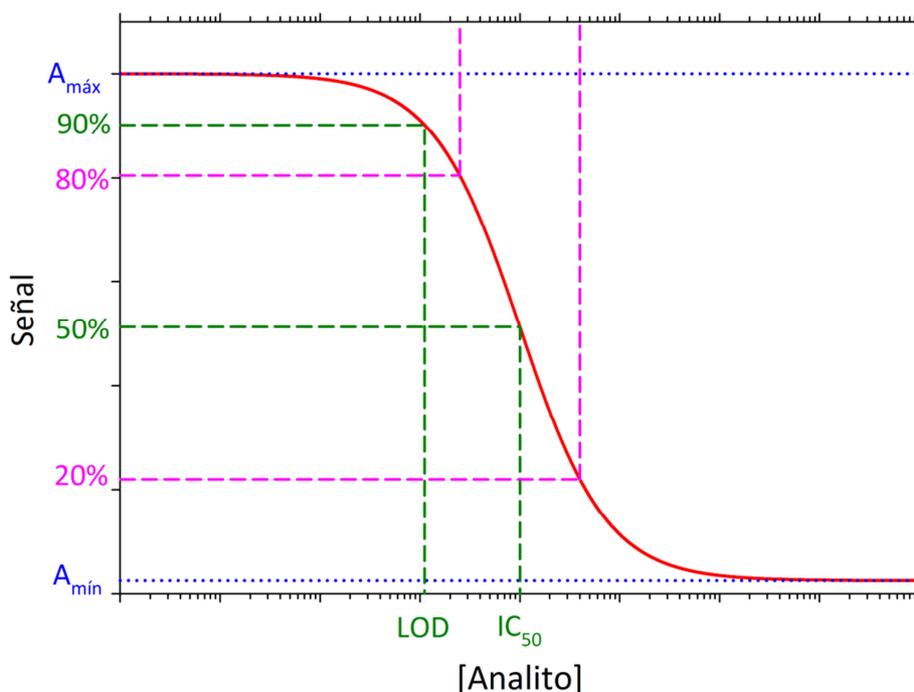
Las enzimas de marcaje más empleadas para ELISA son la fosfatasa alcalina (AP) y la peroxidasa de rábano picante (HRP, *horseradish peroxidase*). Como su propio nombre indica, la AP cataliza la hidrólisis de ésteres fosfato en medio básico, y se usa frecuentemente junto con el fosfato de *p*-nitrofenilo (PNPP) para generar un producto de hidrólisis cuantificable por espectrofotometría UV/vis. Por su parte, la HRP promueve la oxidación de ciertos sustratos por acción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, siendo los más habituales la 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB), la *o*-fenilenodiamina (OPD) y el ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) (ABTS), todos ellos cromogénicos. Por ejemplo, la OPD da lugar a una diimina anaranjada cuyo máximo de absorción en medio ácido se sitúa a 492 nm. La utilización de HRP también posibilita generar fluorescencia con ácido homovalínico (HVA) o bien quimioluminiscencia con luminol.<sup>170</sup>

Un formato típico de ELISA para el análisis de macromoléculas o incluso microorganismos es el conocido como ensayo sándwich, que implica la inmovilización inicial de un anticuerpo, seguida de la adición de la especie de análisis, y finalmente un segundo anticuerpo que la reconoce por un epítipo distinto al primero. Este tipo de ensayos no pueden llevarse a cabo con moléculas pequeñas como los fungicidas, ya que, como se describió en la sección 1.3.1, sólo pueden unirse simultáneamente a una molécula de anticuerpo por constituir un único epítipo. Por tanto, la caracterización mediante inmunoensayo enzimático en placa de anticuerpos dirigidos a moléculas de pequeño tamaño debe hacerse mediante ELISA competitivo.

En esta modalidad de ELISA, las moléculas de analito compiten con moléculas de un conjugado proteína–hapteno por unirse al anticuerpo, y la señal se genera después a partir de la cantidad de conjugado que ha interactuado con el anticuerpo. Este último debe añadirse en proporción limitante para que exista una competición real. En ausencia de analito se formará la máxima cantidad posible de complejo anticuerpo/conjugado, dando lugar a la señal máxima del ensayo. En cambio, la presencia de analito desplaza al conjugado y reduce la señal, hasta llegar al valor mínimo cuando el primero se halla en exceso. Dado que cuanto mayor sea la cantidad de analito reconocida menor será la de conjugado, y viceversa, la señal generada en un ELISA competitivo es inversamente proporcional a la concentración de analito.

La representación de la señal de un ELISA competitivo en función de la concentración de analito en escala semilogarítmica proporciona una curva sigmoide como la que se muestra en la Figura 1.17. Esta representación suele denominarse curva de inhibición, ya que representa el grado de inhibición de la interacción entre anticuerpo y conjugado debida a la presencia del analito. Una curva de inhibición generalmente lleva asociados cuatro parámetros: la asíntota superior, correspondiente a la señal máxima del ensayo ( $A_{m\acute{a}x}$ ); la asíntota inferior, que representa la señal mínima ( $A_{m\acute{i}n}$ ) o ruido de fondo; la concentración en el punto de inflexión y la pendiente de la curva en éste. El punto de inflexión se sitúa a una concentración de analito tal que reduce la señal del ensayo a la mitad del valor de  $A_{m\acute{a}x}$  cuando  $A_{m\acute{i}n}$  tiende a valer cero. Por este motivo, la concentración en el punto de inflexión se denomina tradicionalmente  $IC_{50}$ , y generalmente se utiliza como estimación numérica de la sensibilidad del ensayo, siendo ésta mayor cuanto menor es el valor del parámetro. La  $IC_{50}$  también puede emplearse en condiciones limitantes como

estimación de la constante de equilibrio de disociación del complejo analito/anticuerpo.



**Figura 1.17.** Modelo de curva de inhibición sigmoide obtenida en un ELISA competitivo, obtenida como representación de la señal del ensayo (absorbancia, fluorescencia, etc.) frente a la concentración de analito en escala semilogarítmica. Se han resaltado las asíntotas máxima ( $A_{máx}$ ) y mínima ( $A_{mín}$ ) de la curva, así como el rango de trabajo, el límite de detección (LOD) y la concentración de analito en el punto de inflexión de la curva ( $IC_{50}$ ).

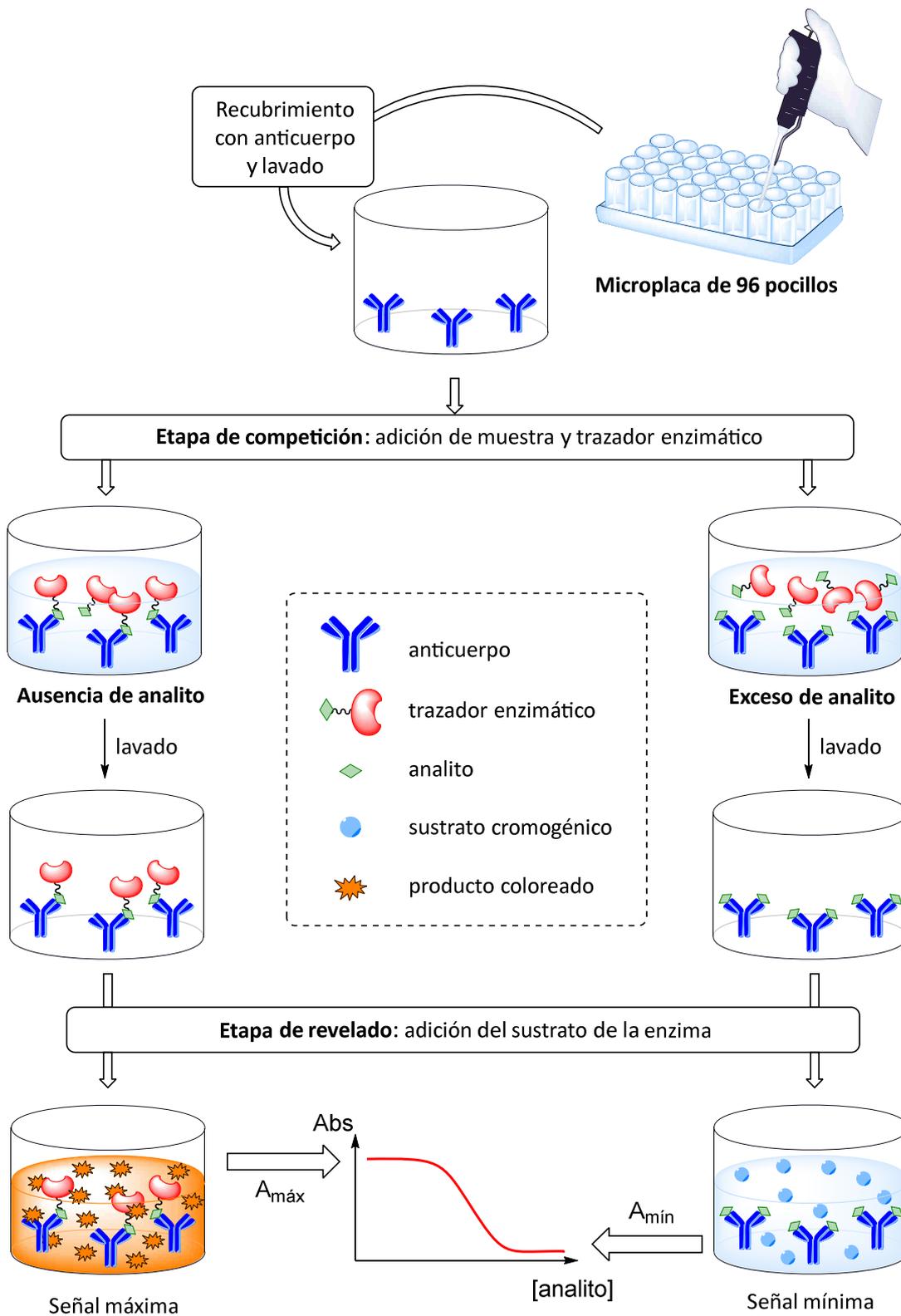
Desde el punto de vista analítico, la curva de inhibición se emplea en un ELISA competitivo como curva de calibrado, de manera que tras obtener ésta a partir de una serie de patrones de analito, puede deducirse la concentración de analito en una muestra por interpolación. Se suele aceptar como límite de detección (LOD) la concentración que reduce la señal un 10% respecto a  $A_{máx}$ , mientras que el rango o intervalo de trabajo suele tomarse como el intervalo entre las concentraciones que dan lugar a reducciones de la señal del 20% y del 80% respecto a  $A_{máx}$ .

Existen diversos formatos para llevar a cabo un ELISA competitivo en función de qué inmunorreactivo se inmoviliza inicialmente, aunque todos ellos tienen en común al menos tres etapas: el recubrimiento o tapizado inicial de la superficie de los pocillos, la competición entre analito y conjugado por unirse al anticuerpo, y el revelado de la

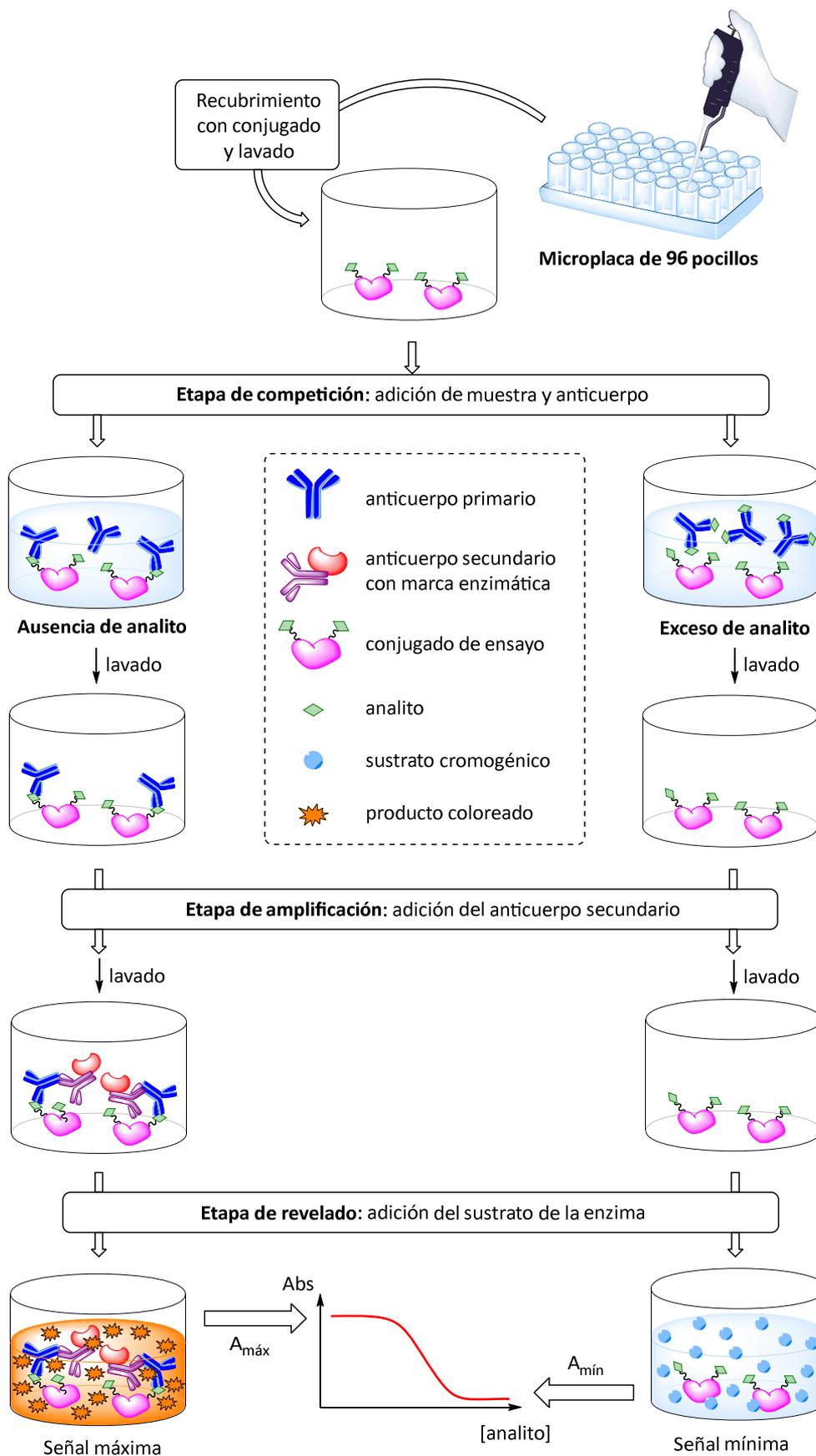
actividad enzimática. Entre cada etapa del ensayo se intercala un lavado de los pocillos, que tiene como finalidad eliminar todo aquello que no haya quedado retenido.

Un formato de ELISA competitivo muy frecuente consiste en la inmovilización inicial del anticuerpo, seguida de la competición entre el analito libre y un conjugado enzima–hapteno (trazador enzimático). Dicho conjugado se prepara previamente siguiendo las estrategias descritas en la sección 1.3.2, siendo deseable que posea una baja densidad hapténica para llevar a cabo la competición de la forma más equilibrada posible. Dado que el propio conjugado de competición ya posee la marca enzimática, la señal se genera directamente tras esta etapa, habiéndose efectuado por tanto un ensayo en formato de anticuerpo inmovilizado con detección directa, o simplemente ensayo en formato directo (Figura 1.18). No obstante, la inmovilización inicial del anticuerpo se produce aleatoriamente, lo que puede provocar el bloqueo de las zonas de unión a antígeno o incluso la desnaturalización parcial o total del anticuerpo. Por ello, existe una variante de este formato en la que el anticuerpo se adiciona tras el recubrimiento inicial de los pocillos con otro anticuerpo capaz de unirse específicamente al primero por su isotipo. Esta modalidad se conoce como ensayo de captura.

Otro formato muy habitual implica llevar a cabo el tapizado de los pocillos con un conjugado proteína–hapteno, que debe estar basado en una proteína distinta a la empleada en el conjugado de inmunización para evitar un posible reconocimiento de ésta por parte de los anticuerpos. Posteriormente se adicionan el analito y el anticuerpo, que puede unirse al analito para permanecer en disolución, o bien al conjugado para quedar retenido sobre la superficie tapizada. Puesto que tras la competición no existe marca enzimática, se adiciona después un anticuerpo similar al empleado en los ensayos de captura pero conjugado a una enzima (anticuerpo secundario). Tras el marcaje del anticuerpo retenido en la competición con ayuda del anticuerpo secundario, se revela la actividad enzimática. Se efectúa así un ensayo en formato de conjugado inmovilizado con detección indirecta, o sencillamente ensayo en formato indirecto (Figura 1.19).



**Figura 1.18.** Representación esquemática de un ELISA competitivo en formato de anticuerpo inmovilizado con detección directa.

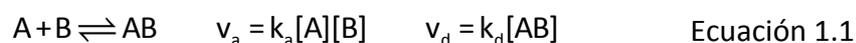


**Figura 1.19.** Representación esquemática de un ELISA competitivo en formato de conjugado inmobilizado con detección indirecta.

### 1.4.1.2. Evaluación cinética y termodinámica

Una forma más básica de caracterizar la interacción antígeno/anticuerpo es su evaluación desde los puntos de vista cinético y termodinámico. Así, los parámetros de mayor interés que pueden proporcionar estudios de este tipo son las constantes de velocidad y de equilibrio asociadas al proceso. Dada la gran diversidad existente de métodos inmunoquímicos, esta información puede ser útil para decidir posteriormente si un anticuerpo es adecuado o no para el método que se desea desarrollar, o si sería más adecuado para otra técnica. Por ejemplo, un anticuerpo capaz de unirse de forma rápida e intensa al antígeno sería muy útil para ELISA pero no tanto para el desarrollo de una columna de inmunoafinidad, puesto que quedaría excesivamente retenido sobre el lecho cromatográfico y no sería fácil su posterior elución.

Como se describió en el apartado 1.3.3, una inmunoglobulina es un reactivo bivalente, con dos sitios de unión equivalentes para la interacción con el antígeno. En el caso que nos ocupa, el antígeno es una molécula pequeña. Cuando ambas especies se mezclan, tiene lugar la unión reversible de una o dos moléculas de antígeno al anticuerpo, de modo que una vez se igualan las velocidades de asociación y disociación se alcanza el equilibrio. La estequiometría de la interacción puede controlarse si las concentraciones de anticuerpo (B) y antígeno (A) son similares y además muy pequeñas, considerando la elevada afinidad de los anticuerpos. Ello disminuye la extensión del equilibrio para la segunda unión de antígeno y por tanto simplifica el proceso a una interacción 1:1 (Ecuación 1.1). Los procesos de asociación y disociación del complejo (AB) son reacciones elementales, por lo que la velocidad es de segundo orden en sentido directo ( $v_a$ ) y de primer orden en sentido inverso ( $v_d$ ), siendo las respectivas constantes de velocidad  $k_a$  y  $k_d$ .

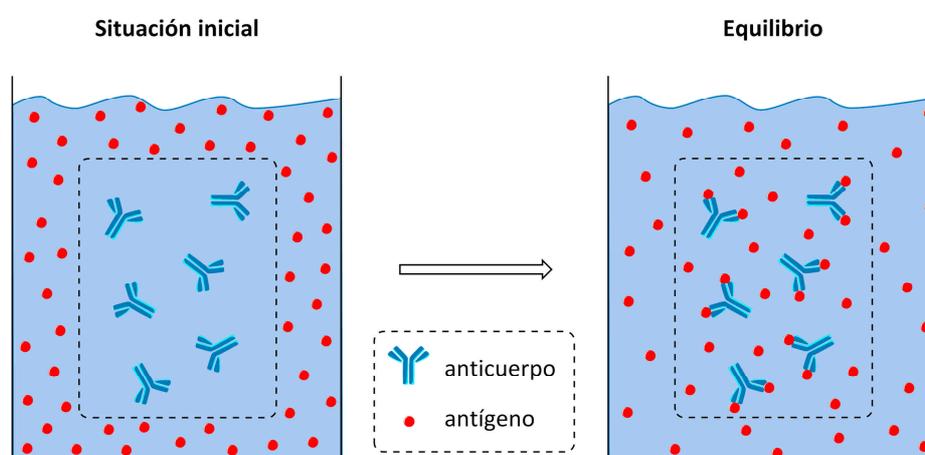


En el equilibrio, las velocidades en ambos sentidos se igualan y la constante de equilibrio de asociación o constante de afinidad,  $K_A$ , es igual al cociente de  $k_a$  y  $k_d$ . Su inversa se denomina constante de disociación,  $K_D$ , y corresponde al cociente de  $k_d$  y  $k_a$  (Ecuación 1.2).

$$K_A = \frac{k_a}{k_d} = \frac{[AB]}{[A][B]} \quad K_D = \frac{1}{K_A} = \frac{k_d}{k_a} = \frac{[A][B]}{[AB]} \quad \text{Ecuación 1.2}$$

La caracterización cinética y termodinámica de la interacción antígeno/anticuerpo pasa por la determinación experimental de las constantes  $k_a$ ,  $k_d$ ,  $K_A$  y  $K_D$ . Se han

descrito ejemplos para la obtención de algunos o todos estos parámetros mediante métodos tan diversos como inmunoprecipitación, transferencia de fluorescencia o ELISA,<sup>171-173</sup> pero la técnica clásicamente más empleada en el caso de moléculas pequeñas es sin duda la diálisis de equilibrio. El procedimiento consiste en introducir una cantidad constante del anticuerpo en una membrana de diálisis, ponerla en contacto con disoluciones de antígeno de concentraciones variables hasta alcanzar el equilibrio (Figura 1.20). A partir de la medida de la concentración libre de antígeno en el equilibrio dentro y fuera de la membrana se puede calcular la concentración de antígeno unida al anticuerpo, y el posterior tratamiento de los datos permite estimar el valor de la constante de afinidad.

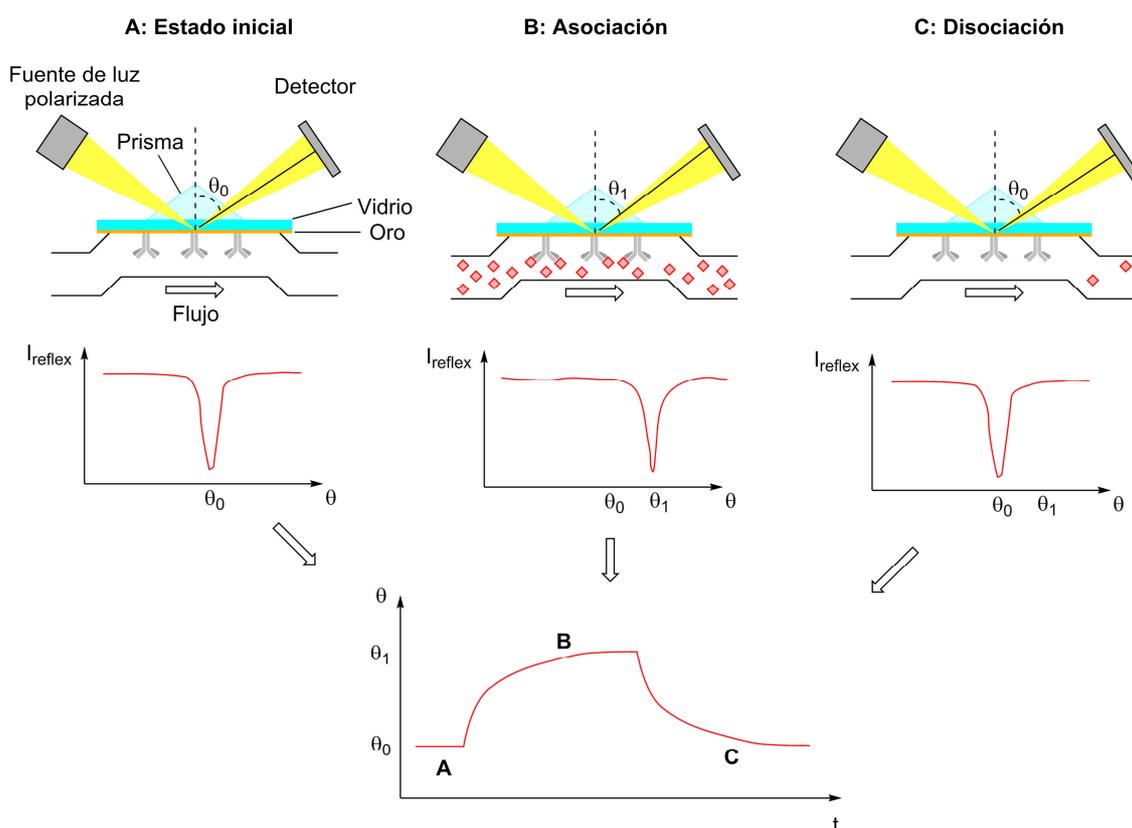


**Figura 1.20.** Representación esquemática de un experimento de diálisis de equilibrio.

Una técnica de desarrollo relativamente reciente que permite la determinación de todas estas constantes es la resonancia de plasmones superficiales (SPR por sus siglas en inglés). Este fenómeno físico fue inicialmente observado a principios del siglo XX por R. M. Wood,<sup>174</sup> y tras varias décadas de investigación fue implementada entre 1980 y 1990 como técnica de análisis. Mediante SPR, es posible seguir en tiempo real una interacción entre dos biomoléculas sobre la superficie de un chip sin necesidad de utilizar ningún tipo de marcaje, lo que la convierte en una técnica analítica de gran interés.

La Figura 1.21 representa esquemáticamente la forma en que se produce el fenómeno de SPR y cómo éste se traduce en una señal procesable. La resonancia puede tener lugar cuando se sitúa una fina capa de un material conductor entre dos medios de índices de refracción distintos. Así, el sistema consta de un chip formado por una película metálica, por ejemplo de oro, unida a un soporte de vidrio de índice

de refracción relativamente elevado, de manera que la cara metálica se pone en contacto con una conducción por la que se hace pasar un flujo de tampón, con índice de refracción menor. Sobre el anverso se hace incidir luz monocromática polarizada en condiciones de reflexión total interna, lo que da lugar a la aparición de una onda evanescente. Esta onda se propaga en paralelo a la superficie y por la cara de menor índice de refracción, es decir, la que está en contacto con el tampón. La amplitud de la onda evanescente decae de forma exponencial con la distancia al chip, por lo que sólo es efectiva en su superficie, aproximadamente en un rango igual a la mitad de la longitud de onda del haz incidente. A un determinado ángulo de incidencia de la luz polarizada, grupos de electrones de valencia de la película metálica, denominados plasmones, pueden absorber energía a través de la onda evanescente, produciéndose así la resonancia. La luz reflejada por el chip en función del ángulo de incidencia se recoge en un detector de fila de diodos, de modo que la resonancia se detecta como una pérdida de intensidad de luz al ángulo de incidencia al que se produce el fenómeno, el cual coincide con el ángulo de reflexión.



**Figura 1.21.** Generación del fenómeno de resonancia de plasmones superficiales y su utilización para la monitorización de las interacciones producidas en la superficie del chip en un equipo de SPR de tipo Biacore (abreviaturas:  $I_{\text{reflex}}$  = intensidad de luz reflejada,  $\theta$  = ángulo de reflexión).

El valor concreto del ángulo de resonancia depende del índice de refracción del medio por el que se propaga la onda evanescente, es decir, la superficie del chip en la cara por la que discurre el flujo de tampón. Puesto que la composición modifica el índice de refracción, los cambios de composición que se producen en la superficie dan lugar a pequeñas variaciones en el ángulo de resonancia, que son registradas por el detector a lo largo del tiempo. Para que esto suceda, la superficie de oro se recubre de una matriz, por ejemplo de dextrano, sobre la que se pueden inmovilizar moléculas como las proteínas. Un ejemplo se muestra en la Figura 1.21, en la que se tiene un chip sobre cuya superficie se ha inmovilizado covalentemente un anticuerpo, siendo el ángulo de resonancia inicial  $\theta_0$ . Cuando se hace pasar un flujo de disolución que contienen al antígeno, se produce la asociación y se modifica la composición de la superficie, por lo que el ángulo de resonancia pasa a ser  $\theta_1$ . Al volver a pasar tampón, el antígeno se disocia gradualmente hasta volver a alcanzarse el ángulo de resonancia inicial. La curva que resulta de representar la respuesta (variación de ángulo de resonancia) en función del tiempo se denomina sensograma, y su análisis permite determinar las constantes cinéticas y termodinámicas mediante ajuste matemático a diferentes modelos de interacción.

La variación del ángulo de resonancia se expresa habitualmente en términos de unidades de respuesta (RU), siendo 1 RU la diezmilésima parte de un grado sexagesimal. La respuesta de SPR es directamente proporcional a la masa que se sitúa sobre la superficie del chip, y por tanto, a igual número de moléculas, una sustancia de elevado peso molecular proporciona más respuesta que otra de bajo peso molecular.<sup>175</sup> No obstante, esta limitación puede eliminarse maximizando la relación señal/ruido, ya sea incrementando la cantidad de molécula que se inmoviliza sobre el chip o empleando equipos de mayor rendimiento. Otra opción existente es la realización de un ensayo competitivo, que permite evaluar la interacción con una molécula pequeña por desplazamiento de una molécula parecida pero de mayor peso molecular, la cual es mucho más fácil de detectar.<sup>176</sup>

### **1.4.2. Optimización de la sensibilidad: Uso de haptenos heterólogos**

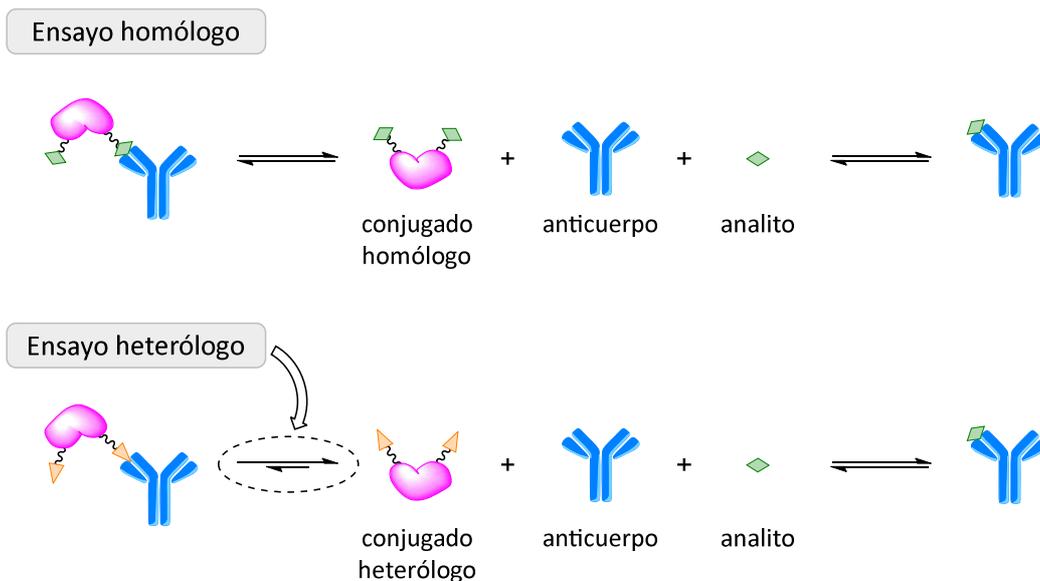
La sensibilidad de un inmunoensayo es el umbral de concentración de analito a partir del cual se observa un reconocimiento molecular significativo de éste por parte del anticuerpo. La sensibilidad de un ELISA competitivo está estrechamente relacionada con la capacidad que tiene el analito de desplazar al conjugado

competidor del anticuerpo, y por tanto viene determinada por el balance entre los equilibrios analito/anticuerpo y conjugado/anticuerpo. Por ello, cualquier limitación del equilibrio de reconocimiento molecular anticuerpo/conjugado debería poder repercutir en el aumento de la sensibilidad.

Se han descrito diferentes formas de mejorar la sensibilidad de un inmunoensayo competitivo mediante la modificación de distintos parámetros, como las concentraciones de inmunorreactivos o las variables fisicoquímicas del ensayo que pueden afectar al reconocimiento molecular (pH, fuerza iónica, tiempos y temperaturas de incubación, etc.).<sup>177</sup> No obstante, la estrategia que suele proporcionar los mejores resultados es la heterología, basada en el uso de conjugados competidores constituidos por los denominados haptenos heterólogos.

En un ELISA competitivo, la etapa de competición puede llevarse a cabo empleando un conjugado derivado del mismo hapteno que se empleó en la inmunización, o bien un conjugado derivado de otro hapteno. En el primer caso se hablaría de ensayo homólogo y por extensión de conjugado y hapteno homólogos, mientras que en el segundo caso se llevaría a cabo un ensayo heterólogo, aplicándose la misma denominación al conjugado empleado y al hapteno constituyente. Puesto que un hapteno heterólogo en principio es reconocido en menor medida que el hapteno homólogo, en un ensayo heterólogo habrá una mayor cantidad de anticuerpo libre respecto a un ensayo homólogo llevado a cabo en las mismas condiciones. Esta situación conlleva la formación de una mayor cantidad de complejo anticuerpo/analito, de modo que el aumento aparente de la afinidad del anticuerpo hacia el analito da lugar a un incremento en la sensibilidad del inmunoensayo (Figura 1.22).

Para que la sensibilidad de un inmunoensayo competitivo pueda ser mejorada por heterología, es necesario que el hapteno heterólogo sea reconocido, si bien en menor medida que el homólogo. De otro modo no se obtendría señal inicial. Esto implica que la estructura del heterólogo debe ser ligeramente distinta a la del homólogo, evitando modificaciones drásticas que podrían conllevar la ausencia de reconocimiento y por tanto la imposibilidad de llevar a cabo el inmunoensayo. Las heterologías más frecuentes implican la introducción del brazo espaciador en posiciones diferentes (heterología de posición),<sup>178</sup> cambios en la longitud o estructura de éste (heterología de brazo espaciador)<sup>179</sup> o incluso leves modificaciones en el esqueleto del analito (generalmente adición, variación o eliminación de sustituyentes).<sup>180</sup>



**Figura 1.22.** Comparación de los equilibrios de reconocimiento molecular anticuerpo/analito y anticuerpo/conjugado en inmunoensayos competitivos homólogos y heterólogos.

### 1.4.3. Validación y aplicación del inmunoensayo

Tras la selección de los inmunorreactivos más adecuados, es necesario llevar a cabo un estudio de caracterización del propio inmunoensayo con el fin de evaluar su comportamiento frente a la variación de parámetros fisicoquímicos relevantes (pH, fuerza iónica, temperatura y tiempo de incubación, presencia de disolventes orgánicos, etc.), así como para optimizar sus valores en caso de ser necesario. Una vez terminado el estudio, se puede dar por desarrollado el inmunoensayo.

Finalizado el desarrollo del inmunoensayo, se procede a su utilización sobre muestras previamente determinadas con el objetivo de comprobar que el ensayo es realmente aplicable. Debido a la especificidad de las reacciones antígeno/anticuerpo, las muestras líquidas pueden analizarse en muchos casos directamente o tras una simple dilución en el tampón más adecuado para el ensayo, aunque también cabe la posibilidad analizar en su lugar un extracto orgánico derivado de la muestra. La obtención de extractos es necesaria para el análisis de muestras sólidas y semisólidas. En el caso de la extracción de residuos de plaguicidas en alimentos, el método de extracción oficial de la EFSA y de la AOAC International (*Association of Analytical Communities*) es el denominado QuEChERS (*Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe*),<sup>181-183</sup> desarrollado en 2003 por Anastassiades y colaboradores y que se describirá con detalle en la sección 3.8.1. Por otra parte, la aplicación a muestras

reales puede conllevar la aparición de interferencias relacionadas con la propia naturaleza de la muestra que alteran el resultado final, dando lugar a lo que se conoce como efecto matriz. En estos casos, se busca la forma de eliminar dicho efecto para poder llevar a cabo los ensayos correctamente, lo que puede hacerse en muchos casos mediante simple dilución o, en el caso de analizar extractos orgánicos, llevando a cabo una etapa previa de limpieza del extracto.

Finalmente, debe comprobarse si el inmunoensayo desarrollado proporciona resultados cuantitativos totalmente fiables, o bien si su carácter es semicuantitativo o simplemente cualitativo. Existen diferentes métodos para llevar a cabo la validación de un método analítico, uno de los cuales consiste en el análisis de muestras suplementadas con una concentración conocida de analito (muestras dopadas o fortificadas), lo que permite determinar la exactitud y precisión del método desarrollado. También es muy frecuente validar nuevos métodos mediante el análisis de muestras de concentración desconocida y la comparación estadística de los resultados obtenidos con los que proporciona un método analítico de referencia. Algunas estrategias para la comparación de métodos analíticos se discutirán con más detalle en la sección 3.8.4.



## 2. OBJETIVOS

La presente Tesis Doctoral tiene como principal objetivo el desarrollo de métodos inmunoanalíticos para la detección de dos fungicidas de nueva generación inhibidores de la succinato deshidrogenasa, fluopyram y penthiopyrad, en muestras de origen alimentario con elevada sensibilidad y selectividad. Con el propósito de lograrlo, se han planteado los siguientes objetivos específicos:

- ❖ Diseño y síntesis de análogos funcionalizados de fluopyram y penthiopyrad (haptenos) mediante la introducción de un brazo espaciador en distintas posiciones de la molécula original. Con ello se pretende disponer de haptenos con orientaciones espaciales alternativas para generar anticuerpos frente a un mismo analito y en su caso incrementar mediante heterología la sensibilidad de los métodos inmunoquímicos desarrollados.
- ❖ Preparación de una serie de conjugados proteína–hapteno por unión covalente de los haptenos sintetizados a diversas proteínas transportadoras, con o sin actividad enzimática, para su uso en el proceso de inmunización o para llevar a cabo la caracterización de dichos anticuerpos y el desarrollo de los inmunoensayos deseados.
- ❖ Generación de una colección de anticuerpos de elevada afinidad y especificidad, tanto policlonales como monoclonales, frente a fluopyram y penthiopyrad.

- ❖ Caracterización de los anticuerpos generados en términos de afinidad y especificidad frente a fluopyram y penthiopyrad, empleando para ello la técnica de ELISA competitivo. En el caso de los anticuerpos monoclonales, determinar también sus características cinéticas y termodinámicas mediante la técnica de resonancia de plasmones superficiales.
- ❖ Evaluación de la utilidad de estructuras basadas en nanotubos de carbono para el proceso de inmunización frente a moléculas pequeñas como fluopyram y penthiopyrad.
- ❖ Optimización de las condiciones de ensayo y evaluación de la influencia de distintas variables fisicoquímicas sobre los principales parámetros analíticos de los inmunoensayos seleccionados.
- ❖ Aplicación de los inmunoensayos desarrollados al análisis de fluopyram y penthiopyrad en muestras de alimentos. Evaluación del efecto matriz, determinación de la exactitud y precisión de los inmunoensayos, y validación de los resultados frente a un método analítico de referencia.
- ❖ Demostración del interés real de los inmunoensayos desarrollados mediante un estudio de transferencia de los fungicidas fluopyram y penthiopyrad en un proceso de transformación de alimentos como la vinificación.

## 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 3.1. Síntesis de haptenos para fluopyram

La primera etapa en el desarrollo de cualquier inmunoensayo es la obtención de anticuerpos de elevada afinidad y especificidad hacia el analito de interés (en este caso, los fungicidas fluopyram y penthiopyrad). Esta situación debería poder lograrse presentando al sistema inmunitario de los animales inmunizados un antígeno con estructura idéntica, o lo más parecida posible, a la del analito. Por este motivo, el correcto diseño de los haptenos es fundamental para la obtención de anticuerpos de elevada afinidad y especificidad hacia el analito de interés. El caso ideal es aquél en el que la introducción del brazo espaciador modifica mínimamente todas las características estéricas, electrónicas y conformacionales del analito original. Lógicamente, la preparación del hapteno más adecuado en base a estas consideraciones no siempre es posible a partir del propio analito, por lo que debe llevarse a cabo la preparación del mismo a través de una ruta sintética. No obstante, el esfuerzo sintético requerido suele tener su recompensa en la generación de anticuerpos de mayor calidad, que eventualmente permiten el desarrollo de un mejor y más sensible inmunoensayo.

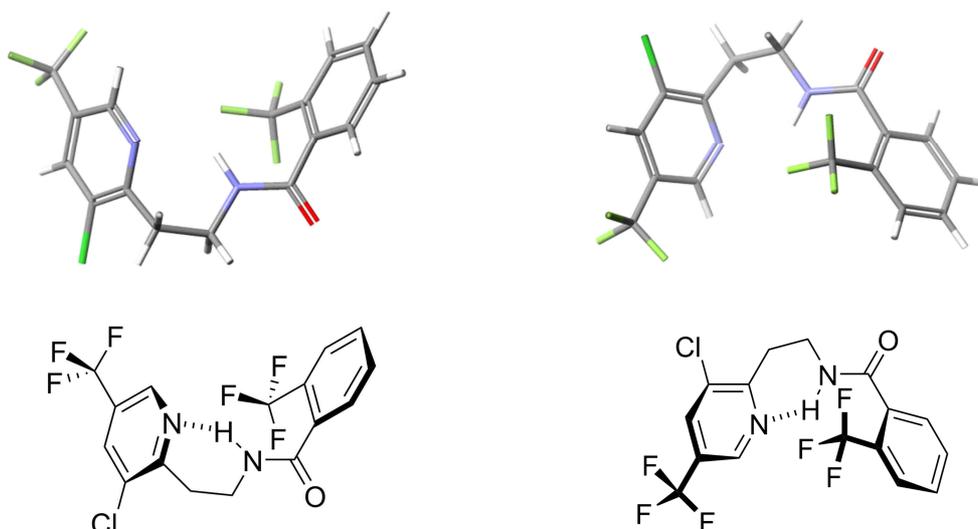
Por otro lado, la inmunización con un único hapteno, independientemente de lo bien diseñado que esté, no garantiza la producción de los anticuerpos deseados. Por ello, es habitual la preparación de una colección de haptenos para un mismo analito,

que suelen diferir entre ellos en la posición y en ocasiones en la estructura y/o longitud del brazo espaciador. Esta estrategia permite la exposición de la estructura del analito al sistema inmunitario desde orientaciones complementarias, aumentando así la probabilidad de generar una mejor respuesta inmunitaria, y a su vez, la disponibilidad de haptenos heterólogos para la posterior mejora de la sensibilidad de los inmunoensayos.

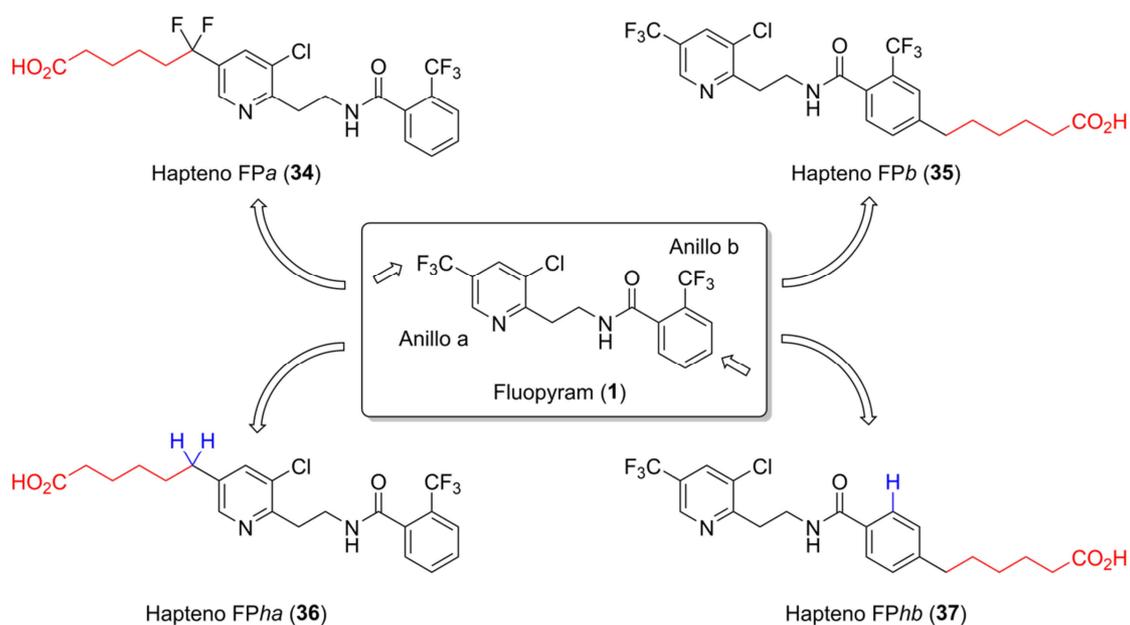
### 3.1.1. Diseño y análisis retrosintético de haptenos para fluopyram

Teniendo en cuenta las premisas generales para el diseño de haptenos y considerando la conformación de mínima energía de fluopyram (**1**, Figura 3.1), se decidió en primer lugar preparar dos haptenos, situando en cada uno el brazo espaciador en posiciones distales de la molécula, y siendo éste en ambos casos una cadena hidrocarbonada de cinco o seis eslabones finalizada en un grupo carboxilo para la posterior conjugación a las correspondientes proteínas transportadoras. En uno de los haptenos se introduciría el brazo espaciador en el grupo trifluorometilo del anillo de piridina (hapteno *FPa*, **34**), de modo que se sacrificaría la presencia de uno de los tres átomos de flúor para minimizar las interacciones estéricas con el resto de sustituyentes del anillo. En el otro hapteno, el brazo espaciador se situaría unido directamente al anillo de benceno, reemplazando a un átomo de hidrógeno y quedando así alejado del resto de sustituyentes del anillo (hapteno *FPb*, **35**). Estos haptenos se destinarían a la producción de anticuerpos.

Además de los dos haptenos anteriores, se planteó la síntesis de otros dos haptenos para fluopyram con estructuras similares a las de los dos ya propuestos, pero sin la presencia de los grupos fluorados junto al anillo donde se situara el brazo espaciador. De este modo, se decidió preparar un hapteno similar al hapteno *FPa* en el que se cambiaría el grupo *gem*-difluoruro unido al anillo de piridina por un grupo metileno (hapteno *FP<sub>ha</sub>*, **36**), y otro hapteno derivado del hapteno *FPb* en el que el grupo trifluorometilo unido al anillo de benceno fuese sustituido por un átomo de hidrógeno (hapteno *FP<sub>hb</sub>*, **37**). Por su menor similitud estructural con el fungicida, estos dos haptenos, heterólogos de los anteriores, se destinarían a la preparación de conjugados de ensayo potencialmente útiles para mejorar la sensibilidad de los inmunoensayos. Las estructuras de todos los haptenos propuestos para fluopyram se recogen en la Figura 3.2.



**Figura 3.1.** Conformación de mínima energía de fluopyram observada desde dos puntos de vista distintos (izquierda y derecha) y representada tanto con el modelo de barras (arriba) como en dibujo ChemDraw (abajo). La geometría se calculó computacionalmente mediante mecánica molecular (MM3) y posteriormente se refinó con MOPAC empleando parámetros PM3. En las estructuras ChemDraw se ha resaltado un enlace de hidrógeno intramolecular entre el átomo de nitrógeno piridínico y el átomo de hidrógeno del nitrógeno de amida, enlace que estaría reforzado por la interacción simultánea del mismo hidrógeno con los átomos de flúor del grupo  $\text{CF}_3$  espacialmente cercano.<sup>184,185</sup>



**Figura 3.2.** Haptenos propuestos para fluopyram (**1**). Las letras a y b hacen referencia al anillo aromático en el que se introduce el brazo espaciador, y la letra h a la naturaleza heteróloga del hapteno.

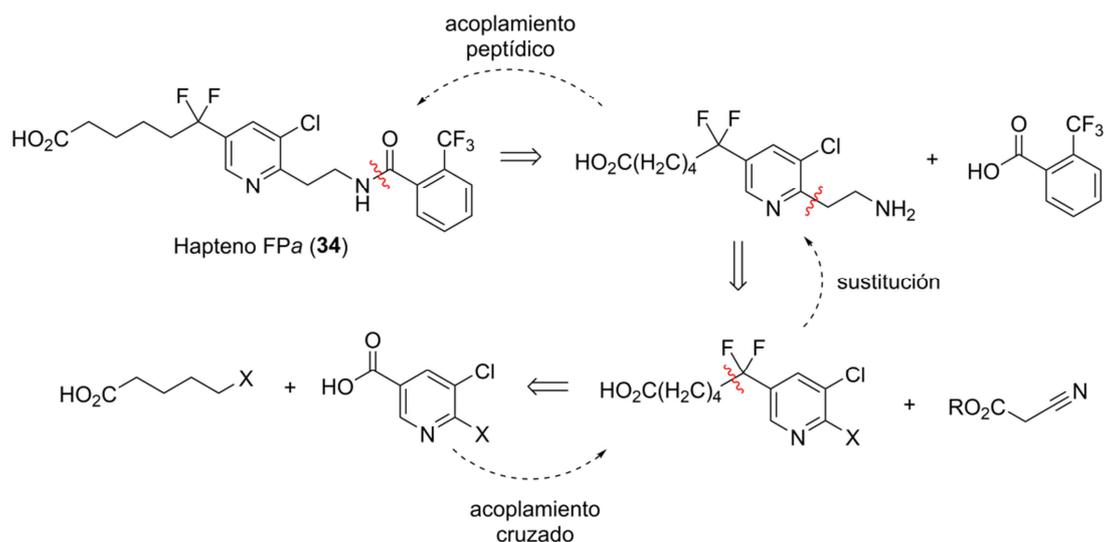
Los cuatro haptenos propuestos presentan un esqueleto común de *N*-(2-(3-cloropiridin-2-il)etil)benzamida, que podría prepararse por formación de un enlace amida entre los derivados de ácido benzoico y de 2-(3-cloropiridin-2-il)etan-1-amina adecuados para cada hapteno. La preparación de esta última agrupación se podría llevar a cabo por sustitución nucleofílica aromática a partir de una 3-cloropiridina adecuada con un buen grupo saliente en posición C-2, y de un reactivo de dos carbonos con carácter nucleofílico en uno de ellos y una función nitrogenada en el otro, como lo son los derivados de ácido 2-cianoacético o de vinilamina, o bien sus equivalentes sintéticos.

Por otra parte, la introducción de los brazos espaciadores se podría llevar a cabo por unión de un precursor adecuado al bloque aromático correspondiente mediante metodologías de formación de enlaces carbono-carbono. La estrategia concreta en cada caso, incluyendo el orden de ensamblaje de los distintos bloques, condicionaría por tanto la naturaleza y funcionalización previa de los distintos precursores empleados.

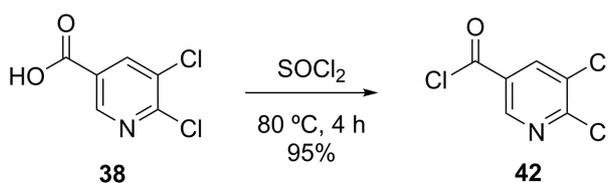
### 3.1.2. Síntesis del hapteno FP $\alpha$

Inicialmente se diseñó una primera ruta para la obtención del hapteno FP $\alpha$  (**34**) en la que se pretendía introducir el brazo espaciador tras la formación del esqueleto completo del analito. Siguiendo esta estrategia pudo efectuarse el ensamblaje del cuerpo central del hapteno deseado, pero tras realizar varios intentos no pudo efectuarse satisfactoriamente la introducción del brazo espaciador. Por ello, la síntesis del hapteno FP $\alpha$  se llevó finalmente a cabo mediante una secuencia sintética convergente en la que se ensambló el esqueleto de fluopyram tras introducir previamente el brazo espaciador en el bloque piridínico (Figura 3.3). Como sustratos iniciales se emplearon los compuestos comerciales ácido 5,6-dicloronicotínico (**38**), 5-bromopentanoato de metilo (**39**), ácido 2-(trifluorometil)benzoico (**40**) y 2-cianoacetato de *terc*-butilo (**41**).

La síntesis del hapteno FP $\alpha$  se inició a partir del ácido 5,6-dicloronicotínico (**38**), que se convirtió de forma casi cuantitativa en su correspondiente cloruro de ácido **42** por tratamiento con SOCl<sub>2</sub> a reflujo (Esquema 3.1).<sup>186</sup> Este producto resultó ser bastante estable, pudiendo ser almacenado durante tiempo prolongado sin experimentar degradación.

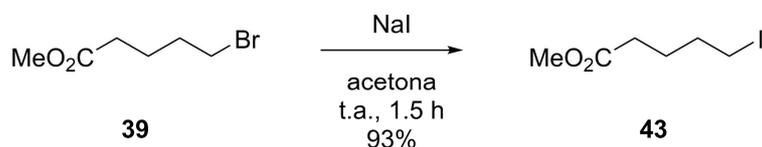


**Figura 3.3.** Análisis retrosintético del hapteno FPα (**34**). R es un grupo alquilo, y X hace referencia a una agrupación con buena aptitud como grupo saliente (halógeno, sulfonato, etc.).



**Esquema 3.1.** Formación del cloruro de ácido **42** a partir del ácido **38**.

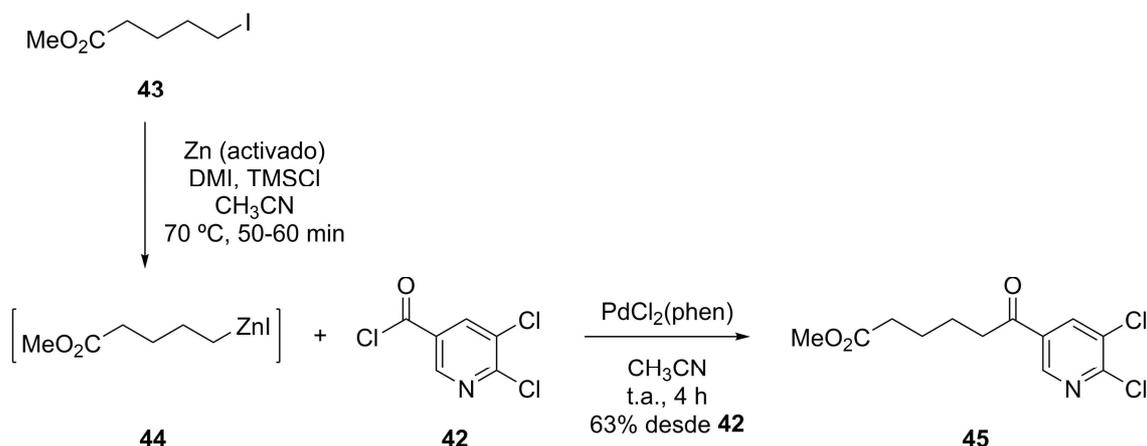
En paralelo, se obtuvo el sustrato precursor del brazo espaciador **43** haciendo reaccionar el bromoéster comercial **39** con NaI en condiciones estándar de sustitución nucleofílica (Esquema 3.2).<sup>187,188</sup> Este intercambio de halógeno se efectuó para mejorar su aptitud como grupo saliente en la siguiente etapa de la síntesis. Por otra parte, el grupo carboxilo se introdujo protegido como éster metílico para permanecer inalterado en posteriores etapas en las que se emplearían condiciones ligeramente ácidas.



**Esquema 3.2.** Reacción de sustitución nucleofílica para la obtención del yodoéster **43**.

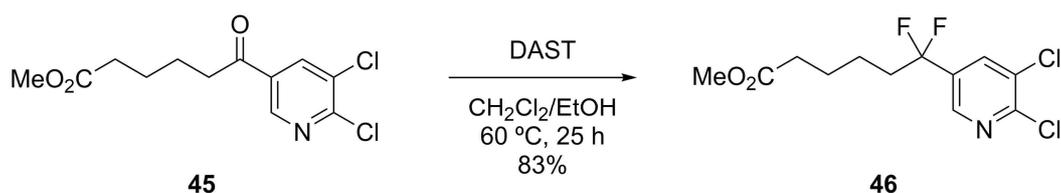
Una vez obtenidos los compuestos **42** y **43**, se llevó a cabo entre ellos una reacción de acoplamiento de Negishi en las condiciones descritas por Iwai y colaboradores,<sup>189</sup> que permiten efectuar el proceso de forma quimioselectiva sobre el cloruro de ácido.

De este modo, se generó *in situ* el yoduro de alquilzinc **44** por tratamiento del compuesto **43** con Zn en polvo activado,<sup>190</sup> y éste se hizo reaccionar con el compuesto **42**. En contraste con el resultado previo obtenido en los intentos fallidos de acoplamiento análogo en la secuencia propuesta inicialmente, en este caso sí se obtuvo la cetona **45**, aunque con rendimiento moderado (Esquema 3.3).



Esquema 3.3. Reacción de acoplamiento de Negishi para la obtención de la cetona **45**.

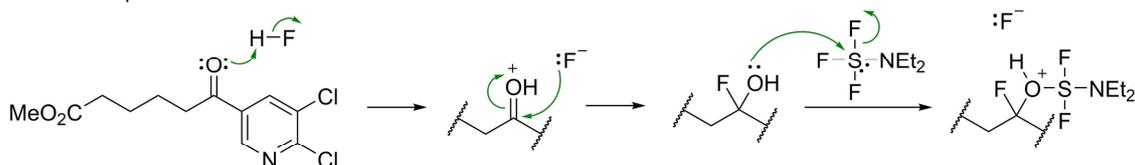
El último paso antes de completar la funcionalización del brazo espaciador fue la conversión del grupo carbonilo de la cetona obtenida en un difluoruro geminal. Esta conversión se llevó a cabo por tratamiento de la cetona **45** con trifluoruro de dietilaminoazufre (DAST) y una pequeña cantidad de etanol (EtOH) para generar una cantidad catalítica de HF, obteniéndose así el compuesto buscado **46** con buen rendimiento (Esquema 3.4).<sup>191</sup>



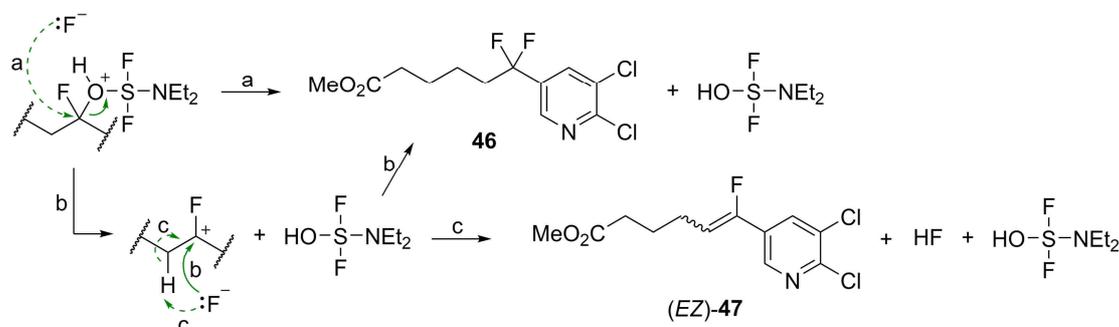
Esquema 3.4. Obtención del compuesto **46** por fluoración de la cetona **45**.

La reacción tuvo lugar quimiosselectivamente en presencia del éster debido a la menor electrofilia de su grupo carbonilo, por lo que los iones fluoruro generados en el transcurso de la reacción se adicionaron más rápidamente al grupo carbonilo cetónico. También se aisló como subproducto una pequeña cantidad del vinilfluoruro **47** (6%), cuya formación es habitual en reacciones de este tipo con compuestos carbonílicos enolizables y se debe a la desprotonación del carbocatión intermedio formado en el proceso (Esquema 3.5).

Adición del primer átomo de flúor:



Adición del segundo átomo de flúor y formación del vinilfluoruro **47**:



**Esquema 3.5.** Mecanismo para la conversión de **45** en **46** y formación del producto secundario **47** (a: mecanismo de sustitución nucleofílica bimolecular; b: mecanismo de sustitución nucleofílica unimolecular; c: desprotonación del carbocatión).

La síntesis del hapteno continuó con la introducción del puente entre los anillos aromáticos, para lo que se empleó una adaptación de la estrategia sintética que se ha descrito para la síntesis de fluopyram, en la que se emplea un éster del ácido 2-cianoacético para introducir en el anillo de piridina la agrupación etilamino ( $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}$ ) requerida.<sup>12</sup> De este modo, se trató el compuesto **46** con 2-cianoacetato de *tert*-butilo (**41**) en presencia de  $\text{Cs}_2\text{CO}_3$  como base y acelerando el proceso con microondas (MW), lo que condujo al producto de sustitución nucleofílica aromática **48** con un rendimiento moderado (Esquema 3.6). Las condiciones de reacción, y en particular el uso de  $\text{Cs}_2\text{CO}_3$  como base, fueron escogidas considerando la experiencia previa en nuestro grupo con transformaciones similares.<sup>111</sup>

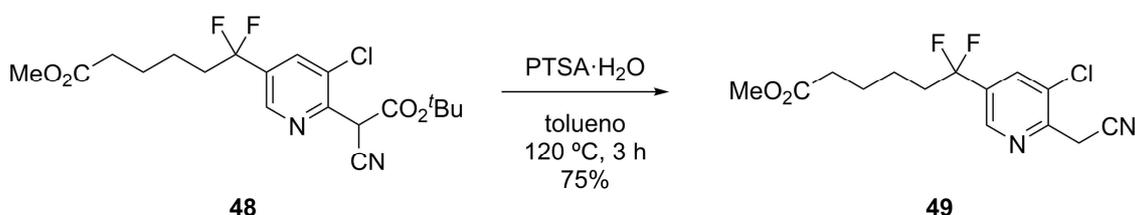


**Esquema 3.6.** Reacción de sustitución nucleofílica aromática entre los compuestos **41** y **46** para la síntesis del compuesto **48**.

En la reacción anterior, la base arranca con facilidad un protón del grupo metileno del compuesto **41**, que es relativamente ácido debido a la estabilización del carbanión resultante por deslocalización electrónica entre el nitrilo y el éster. La sustitución se

produce de forma regioselectiva en la posición C-6 del anillo de piridina de **46** debido a la estabilidad del complejo carbaniónico intermedio generado tras la adición del nucleófilo en dicha posición.

Si bien en la etapa anterior fue necesaria la presencia del grupo éster para aumentar la acidez de **41**, dicho grupo debía ser eliminado una vez completada la reacción de sustitución. Para ello, el compuesto **7** se calentó a reflujo de tolueno con una cantidad catalítica de ácido *para*-toluenosulfónico (PTSA), lo que dio lugar al producto **49** con un 75% de rendimiento (Esquema 3.7). La reacción es formalmente una hidrólisis del éster *terc*-butílico seguida de una descarboxilación térmica, pero dado que el proceso se lleva a cabo en condiciones anhidras, es más probable la pérdida del grupo *terc*-butilo en forma de isobuteno. Este proceso tiene lugar con facilidad con catálisis ácida, lo que justifica la utilización de un éster *terc*-butílico y no otro en la etapa anterior.



**Esquema 3.7.** Preparación del nitrilo **49** por hidrólisis y descarboxilación de **48**.

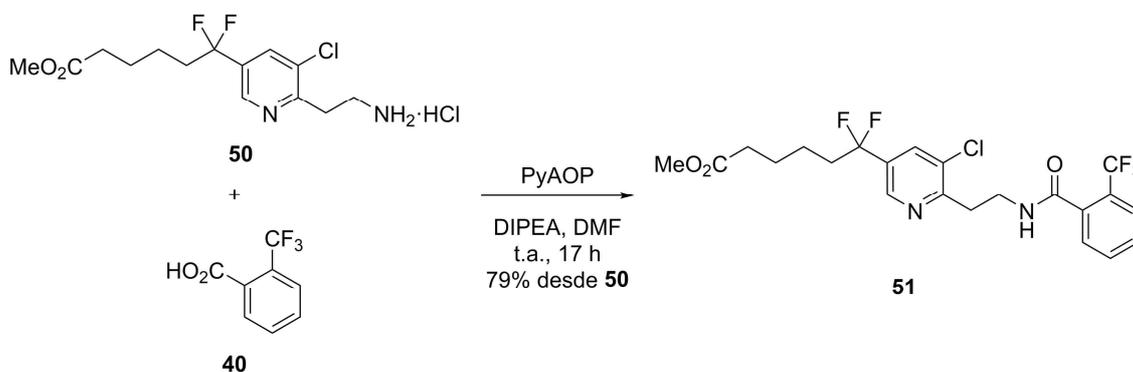
A continuación se efectuó la hidrogenación catalítica del nitrilo **49**, empleando una presión de H<sub>2</sub> relativamente baja para evitar la hidrogenolisis del enlace C–Cl, con la consiguiente deshalogenación del anillo de piridina. La reacción se llevó a cabo bajo 1 atm de H<sub>2</sub>, empleando PtO<sub>2</sub> como catalizador y en presencia de HCl,<sup>192</sup> con lo que se obtuvo el hidrocloreto **50** con un rendimiento aceptable, sin detectarse la presencia de cantidades apreciables del producto de deshalogenación (Esquema 3.8).



**Esquema 3.8.** Hidrogenación catalítica del nitrilo **49** para obtener el hidrocloreto **50**.

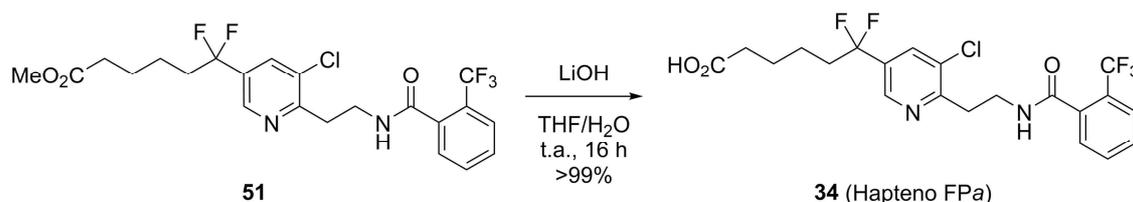
El último paso en el ensamblaje del esqueleto del hapteno fue la formación del enlace amida entre la amina obtenida por neutralización del hidrocloreto **50** y ácido 2-(trifluorometil)benzoico (**40**). Este paso se llevó a cabo empleando el reactivo de

acoplamiento PyAOP [hexafluorofosfato de 7-azabenzotriazol-1-il-oxitris(pirrolidino)-fosfonio],<sup>193,194</sup> lo que dio lugar con buen rendimiento a la amida **51** (Esquema 3.9). Varios intentos previos para la formación de la amida **51** a través de la reacción del cloruro del ácido **40** y la amina derivada del hidrocloreuro **50**, tal como está descrito para la reacción análoga en la síntesis del fungicida,<sup>12</sup> resultaron infructuosos.



**Esquema 3.9.** Obtención de la amida **51** por acoplamiento peptídico entre **50** y **40**.

Para finalizar, el hapteno *FPa* (**34**) se obtuvo tras la desprotección del grupo carboxilo del brazo espaciador. La reacción de saponificación se llevó a cabo en condiciones suaves, haciendo reaccionar el éster metílico con LiOH disuelto en una mezcla de THF y agua a temperatura ambiente, lo que condujo con rendimiento prácticamente cuantitativo al hapteno deseado (Esquema 3.10).<sup>195</sup> Por lo tanto, considerando la ruta completa, el hapteno *FPa* (**34**) se preparó en un total de ocho etapas a partir del ácido 5,6-dicloronicotínico (**38**) con un 8% de rendimiento global.

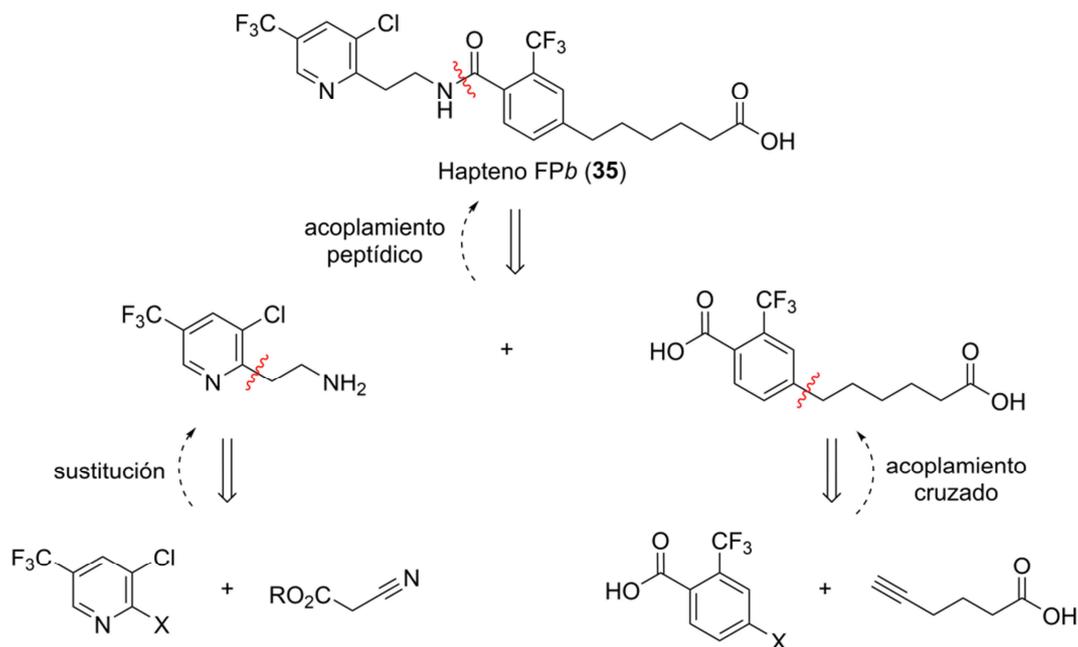


**Esquema 3.10:** Hidrólisis del éster metílico **51** para dar lugar al hapteno *FPa* (**34**).

### 3.1.3. Síntesis del hapteno *FPb*

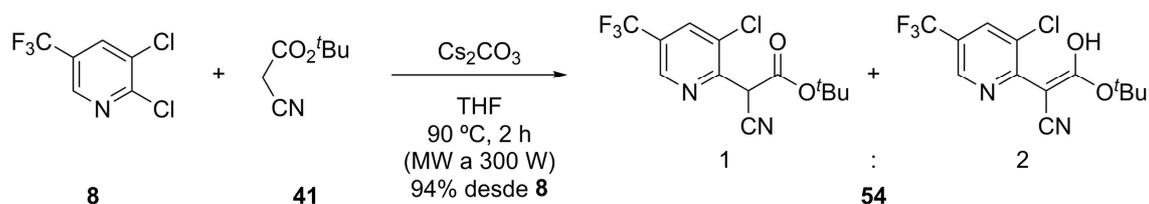
El hapteno *FPb* (**35**) se preparó igualmente mediante una secuencia sintética convergente, de modo que se construyó el esqueleto completo del hapteno tras la introducción del brazo espaciador en el bloque homoaromático (Figura 3.4). Los sustratos iniciales empleados en este caso fueron los compuestos comerciales

2,3-dicloro-5-(trifluorometil)piridina (**8**), ácido 4-nitro-2-(trifluorometil)benzoico (**52**), 2-cianoacetato de *tert*-butilo (**41**), y ácido hex-5-inoico (**53**).



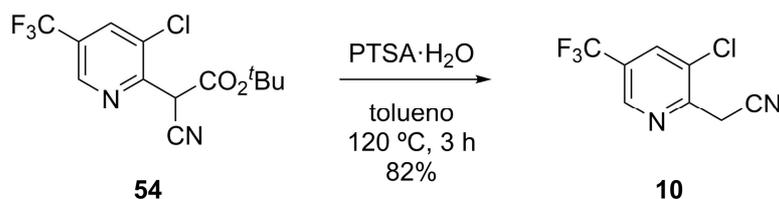
**Figura 3.4.** Análisis retrosintético del hapteno FPb (**35**). R es un grupo alquilo, y X hace referencia a una agrupación con buena aptitud como grupo saliente (halógeno, sulfonato, etc.).

La síntesis se inició con la construcción del bloque correspondiente al anillo de piridina y al puente de unión con el sistema bencénico. De este modo, partiendo de la cloropiridina comercial **8**, se siguió la misma metodología que la empleada en la conversión de la cloropiridina **46** en el hidrocloreuro **50**,<sup>12,111</sup> es decir, se llevó a cabo en primer lugar una reacción de sustitución nucleofílica aromática regioselectiva con 2-cianoacetato de *tert*-butilo (**41**). Esta transformación proporcionó el compuesto **54** con excelente rendimiento (Esquema 3.11). Tal y como se observó tanto por RMN-<sup>1</sup>H como por RMN-<sup>13</sup>C, dicho compuesto en disolución existe como una mezcla tautomérica en la que predomina el tautómero enólico frente al tautómero cetónico. Esta característica se debe probablemente a la conjugación resultante del doble enlace del enol tanto con el anillo aromático como con el grupo nitrilo.

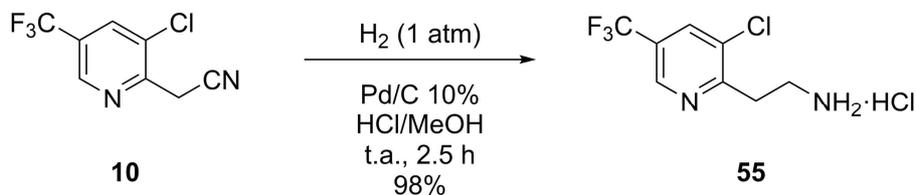


**Esquema 3.11.** Síntesis del compuesto **54** a partir de los reactivos comerciales **8** y **41**.

Posteriormente, se efectuó la hidrólisis y descarboxilación térmica del derivado **54** con catálisis ácida, obteniéndose con buen rendimiento el nitrilo **10** (Esquema 3.12).<sup>12</sup> Para completar la construcción del bloque piridínico, se procedió a la hidrogenación catalizada por Pd al 10% sobre carbono (Pd/C) del nitrilo **10** en presencia de HCl para capturar la amina en forma de hidrocloreto (**55**), cuya formación fue prácticamente cuantitativa (Esquema 3.13).<sup>12,192</sup>

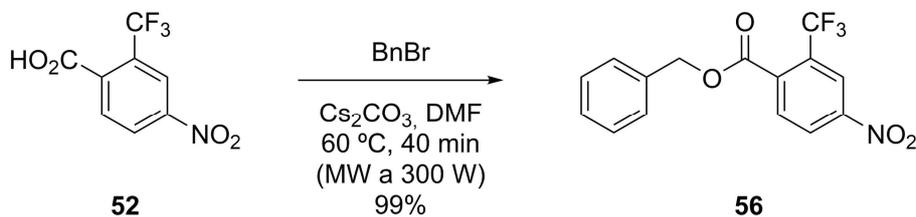


**Esquema 3.12.** Hidrólisis formal y descarboxilación térmica de **54** para dar el nitrilo **10**.



**Esquema 3.13.** Hidrogenación catalítica del nitrilo **10** que origina el hidrocloreto **55**.

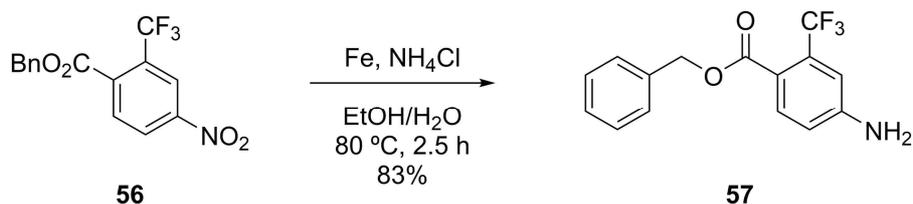
En paralelo, se inició la construcción del bloque correspondiente al anillo homoaromático que incorpora el brazo espaciador. De este modo, el ácido benzoico comercial **52** se protegió en primer lugar como éster bencílico mediante una reacción de sustitución nucleofílica con bromuro de bencilo en condiciones estándar y promovida por microondas, lo que dio lugar cuantitativamente al éster bencílico **56** (Esquema 3.14).



**Esquema 3.14.** Protección del ácido benzoico **52** en forma de éster bencílico **56**.

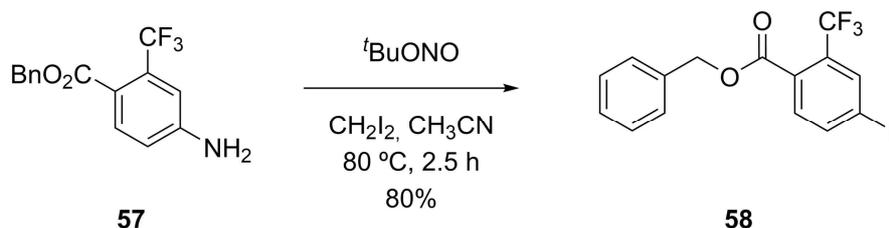
Una vez protegido el grupo carboxilo, fue necesario modificar el sustituyente en posición C-4 del anillo aromático de **56** por otro apto para la reacción de Sonogashira que se pretendía llevar a cabo posteriormente, en concreto por un átomo de yodo. De

este modo, en primer lugar se efectuó una reducción con hierro que convirtió el nitroderivado **56** en la anilina **57** con buen rendimiento (Esquema 3.15).<sup>196</sup>



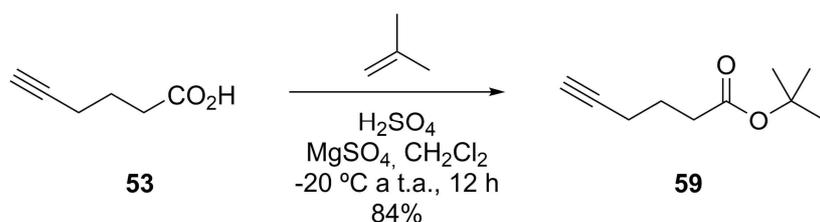
**Esquema 3.15.** Preparación de la anilina **57** por reducción del nitroderivado **56**.

Posteriormente, la anilina **57** fue convertida eficazmente en el yodobenceno **58** por tratamiento con nitrito de *tert*-butilo a reflujo de acetonitrilo en presencia de diyodometano (Esquema 3.16).<sup>197</sup> En estas condiciones, que fueron descritas por primera vez por Nair y colaboradores para la modificación de nucleósidos,<sup>198</sup> se forma inicialmente una sal de arenodiazonio que tras perder nitrógeno evoluciona a un radical fenilo. Dicho radical abstrae un átomo de yodo del  $\text{CH}_2\text{I}_2$  para formar el producto final.



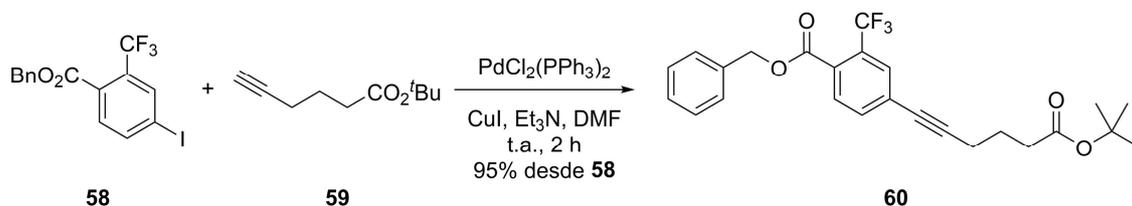
**Esquema 3.16.** Transformación de la anilina **57** en el yodobenceno **58**.

Antes de efectuar la reacción de introducción del brazo espaciador, se protegió el grupo carboxilo de éste en forma de éster *tert*-butílico. De este modo, el ácido comercial **53** se trató con isobuteno gas con catálisis ácida y en presencia de  $\text{MgSO}_4$  anhidro para atrapar la humedad, todo ello en un sistema sellado bajo atmósfera inerte. Estas condiciones condujeron a la formación del éster deseado (**59**) por adición electrofílica de los cationes *tert*-butilo generados a partir del isobuteno al grupo carboxilo de **53** (Esquema 3.17).<sup>199</sup>



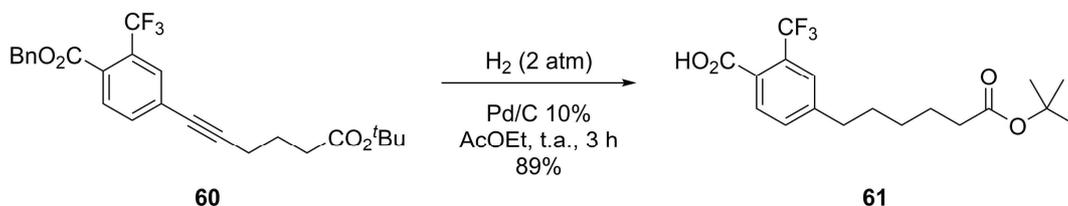
**Esquema 3.17.** Síntesis de **59** por reacción del ácido hex-5-inoico (**53**) con isobuteno.

Una vez preparados los compuestos **58** y **59**, se procedió a su unión mediante una reacción de Sonogashira,<sup>200</sup> empleando trietilamina como base,  $\text{PdCl}_2(\text{PPh}_3)_2$  como precatalizador y  $\text{CuI}$  como cocatalizador para la generación *in situ* del organocuprato intermedio.<sup>201</sup> Con estas suaves condiciones de reacción se obtuvo en 2 h el alquino deseado **60** con excelente rendimiento (Esquema 3.18).



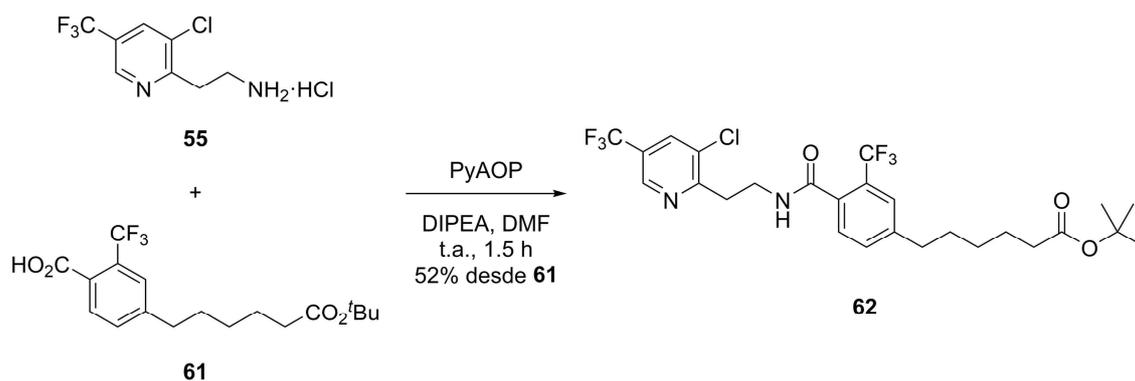
**Esquema 3.18.** Preparación del compuesto **60** mediante una reacción de Sonogashira.

Completada la construcción del bloque deseado, se llevó a cabo simultáneamente la hidrogenación del triple enlace  $\text{C}\equiv\text{C}$  y la desprotección selectiva del éster bencílico por hidrogenólisis. Para ello se empleó una presión de 2 atm de  $\text{H}_2$  y  $\text{Pd/C}$  al 10% como catalizador, lo que condujo al derivado **61** con muy buen rendimiento (Esquema 3.19). Esta estrategia, que incluye la elección previa de los grupos protectores para los grupos carboxilo, permitió llevar a cabo las dos transformaciones citadas en una sola etapa, además de permitir que el grupo carboxilo del brazo espaciador permaneciese protegido.



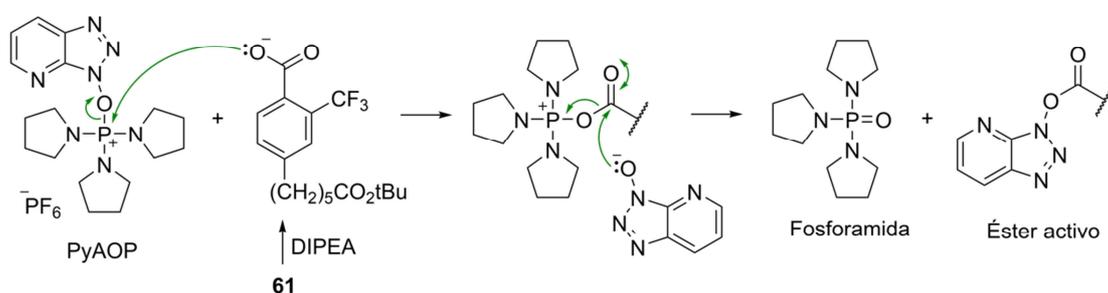
**Esquema 3.19.** Hidrogenación e hidrogenólisis de **60** para proporcionar el ácido **61**.

Una vez preparados los bloques sintéticos **55** y **61**, se llevó a cabo el acoplamiento de ambos por formación de un enlace amida, empleando de nuevo el reactivo de acoplamiento peptídico PyAOP en medio básico, lo que dio lugar con rendimiento moderado a la amida **62** (Esquema 3.20).<sup>194</sup> En estas condiciones se genera *in situ* un éster activo de 1-hidroxi-7-azabenzotriazol, reacción impulsada por la formación de un enlace doble  $\text{P}=\text{O}$  en la fosoramida generada como subproducto. Dicho éster activo reacciona fácilmente con la amina para dar lugar a la amida deseada (Esquema 3.21).<sup>193</sup>

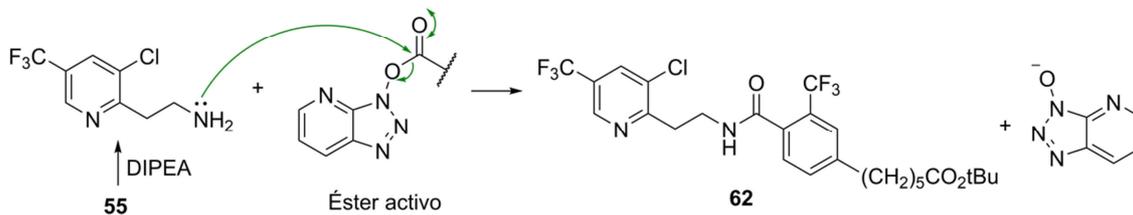


**Esquema 3.20.** Acoplamiento peptídico entre **55** y **61** para proporcionar la amida **62**.

Formación del éster activo de 1-hidroxi-7-azabenzotriazol:

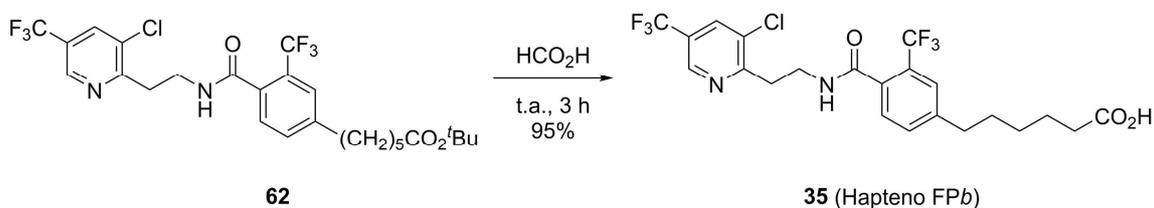


Formación de la amida:



**Esquema 3.21.** Mecanismo del acoplamiento peptídico que da lugar a la amida **62**.

Por último, se efectuó la desprotección del grupo carboxilo en el brazo espaciador por tratamiento del éster *tert*-butílico **62** con ácido fórmico, lo que condujo en condiciones suaves y con excelente rendimiento al hapteno FPb (**35**, Esquema 3.22).<sup>202</sup>

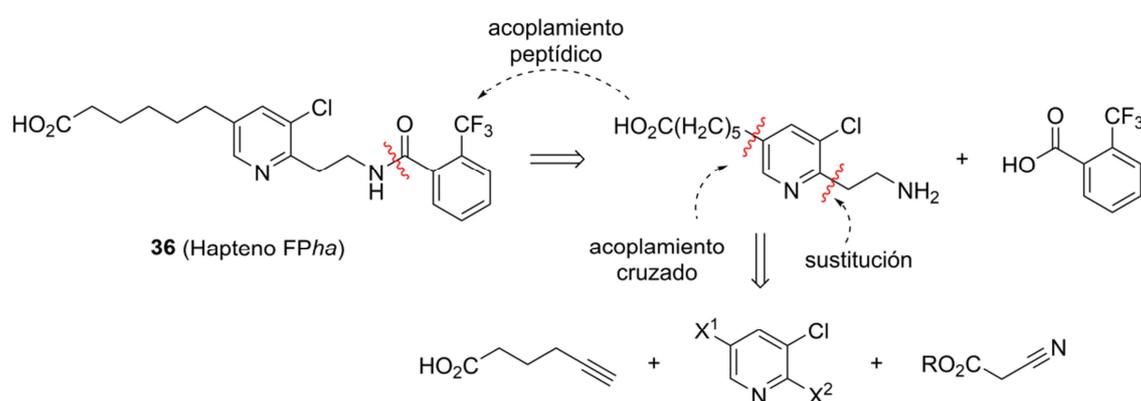


**Esquema 3.22.** Hidrólisis del éster *tert*-butílico **62** para dar lugar al hapteno FPb (**35**).

En resumen, considerando el conjunto de la secuencia sintética, el hapteno *FPb* se obtuvo en 11 pasos a partir del ácido 4-nitro-2-(trifluorometil)benzoico (**52**) con un 27% de rendimiento global.

### 3.1.4. Síntesis del hapteno *FPha*: Obtención del hapteno *FPha'*

La estrategia sintética diseñada para la síntesis del hapteno *FPha* (**36**) se basó en la que se ha descrito anteriormente para la preparación del hapteno *FPa* (**34**). De este modo, en primer lugar se uniría el brazo espaciador al bloque heteroaromático, y posteriormente se formaría el esqueleto del hapteno deseado (Figura 3.5).



**Figura 3.5.** Análisis retrosintético del hapteno *FPha* (**36**). R es un grupo alquilo, y  $X^1$  y  $X^2$  hacen referencia a agrupaciones con buena aptitud como grupo saliente (halógeno, sulfonato, etc.) diferentes entre sí para llevar a cabo reacciones regioselectivas.

En base a esta estrategia, un primer intento de obtener el hapteno deseado se llevó a cabo de forma similar a los dos haptenos anteriores, es decir, mediante el acoplamiento inicial del brazo espaciador al anillo de piridina, seguido de la unión de la agrupación etilamino que serviría como puente de unión entre los anillos aromáticos. Sin embargo, siguiendo este orden sólo fue posible la introducción del brazo espaciador, siendo infructuosos todos los intentos de conectar después la agrupación etilamino mediante reacciones de sustitución nucleofílica aromática análogas a las descritas para los haptenos *FPa* (Esquema 3.6) y *FPb* (Esquema 3.11). Por ello, la secuencia inicialmente propuesta se rediseñó de modo que ambas agrupaciones se introdujeran paralelamente en lugar de secuencialmente, como se había intentado sin éxito.

En primer lugar, y partiendo de 5-bromo-2,3-dicloropiridina (**63**), se llevó a cabo la ya descrita sustitución nucleofílica aromática regioselectiva con 2-cianoacetato de

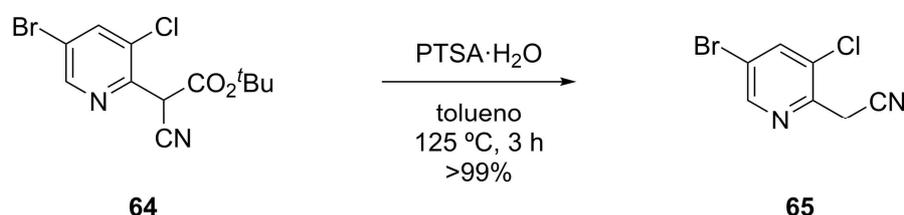
*tert*-butilo (**41**).<sup>12,111</sup> En contraste con el intento inicial, en este caso sí se observó avance de la reacción, formándose el producto deseado **64** con un 76% de rendimiento (Esquema 3.23).



**Esquema 3.23.** Reacción de sustitución nucleofílica aromática entre los derivados **41** y **63** que da lugar al compuesto **64**.

Esta diferencia de comportamiento probablemente radica en la diferente estabilización del complejo carbaniónico resultante de la adición inicial del nucleófilo a la posición C-2 del anillo de piridina. Así, en el caso de **63**, el sustituyente en posición C-5 es un átomo de bromo capaz de estabilizar la carga negativa del complejo por efecto inductivo atractor. Por el contrario, dicho sustituyente en el correspondiente sustrato de la secuencia inicial fue la cadena alquílica del brazo espaciador, que probablemente desestabiliza la carga negativa por efecto inductivo dador. En base a los resultados obtenidos, dicho efecto, aun siendo débil, parece ser suficiente como para impedir que se produzca la reacción de sustitución nucleofílica aromática en la posición C-2.

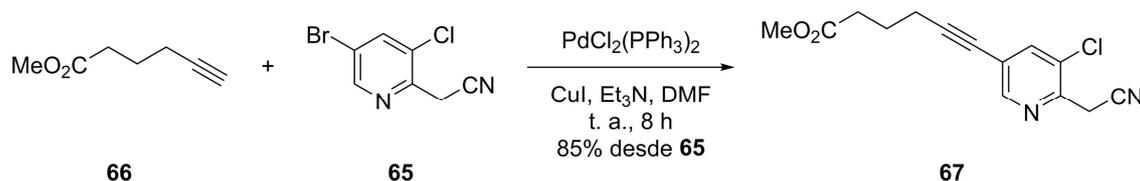
Una vez completada la sustitución, y siguiendo la estrategia habitual, se calentó el éster *tert*-butílico **64** en reflujo de tolueno y en presencia de PTSA en cantidad catalítica, lo que condujo a la formación del nitrilo **65** con buen rendimiento (Esquema 3.24).<sup>12</sup>



**Esquema 3.24.** Hidrólisis y descarboxilación de **64** que da lugar al nitrilo **65**.

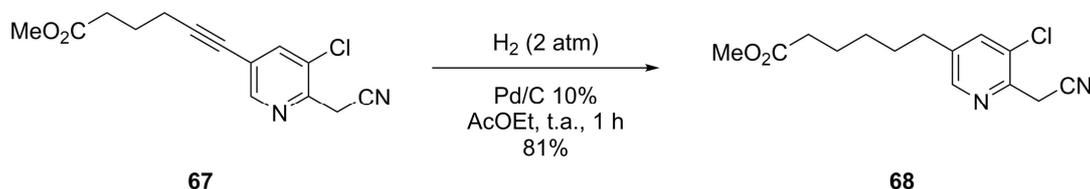
Antes de proceder a la hidrogenación del nitrilo **65** se llevó a cabo la introducción del brazo espaciador mediante una reacción de Sonogashira empleando las condiciones descritas con anterioridad.<sup>201</sup> En este caso el alquino empleado fue hex-5-inoato de metilo (**66**), con el grupo carboxilo protegido como éster metílico. De

este modo, el acoplamiento cruzado entre **65** y **66** proporcionó el producto deseado **67** con excelente rendimiento (Esquema 3.25).



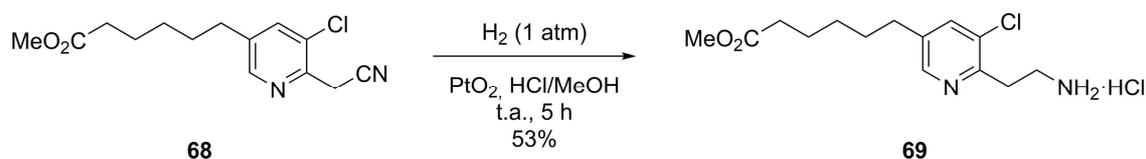
**Esquema 3.25.** Preparación del alquino **67** mediante una reacción de Sonogashira.

Una vez enlazados el anillo de piridina y el precursor del brazo espaciador, se pretendía llevar a cabo la hidrogenación simultánea de los enlaces triples  $\text{C}\equiv\text{C}$  y  $\text{C}\equiv\text{N}$  presentes en la estructura de **67**, simplificando así la secuencia sintética. La reacción se efectuó bajo una presión de  $\text{H}_2$  de 2 atm y empleando  $\text{Pd/C}$  al 10% como catalizador heterogéneo. Tras 1 h de reacción en estas condiciones se observó únicamente la reducción completa del enlace triple  $\text{C}\equiv\text{C}$ . Desafortunadamente, la prolongación de los tiempos y/o el aumento de la presión de  $\text{H}_2$  no condujeron a la reducción del nitrilo, sino a la hidrogenólisis del enlace  $\text{C}-\text{Cl}$ . Por lo tanto, la hidrogenación de **67** (que a nuestro pesar resultó ser quimioselectiva) condujo exclusivamente al producto **68**, aunque con buen rendimiento (Esquema 3.26).



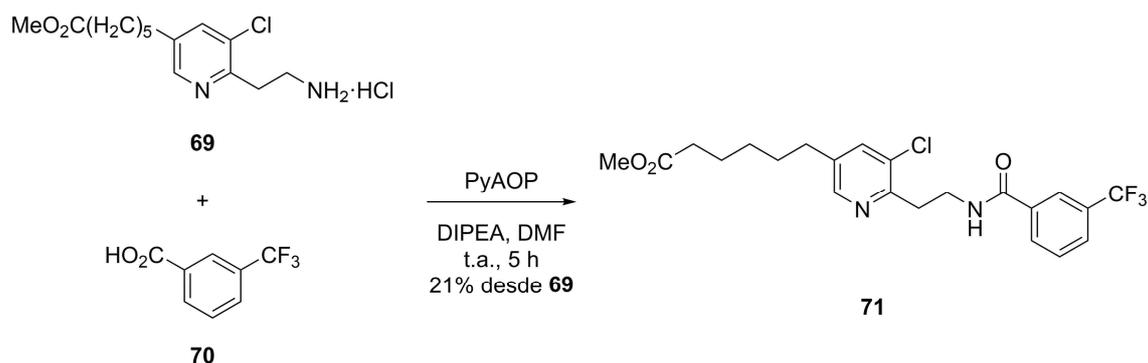
**Esquema 3.26.** Obtención del compuesto **68** por hidrogenación catalítica de **67**.

La reacción anterior evidenció la ineficacia del sistema catalítico empleado para hidrogenar el nitrilo. Por ello, y teniendo en cuenta la similitud estructural entre los compuestos **68** y **49** (con el que sí había sido posible la hidrogenación del nitrilo), se decidió usar como catalizador  $\text{PtO}_2$  y llevar a cabo el proceso en  $\text{HCl}$  metanólico para obtener el hidrocloruro de la amina.<sup>12,192</sup> En estas condiciones la reacción sí tuvo lugar, obteniéndose de esta forma el hidrocloruro **69**, aunque con rendimiento moderado.



**Esquema 3.27.** Hidrogenación del nitrilo **68** para proporcionar el hidrocloruro **69**.

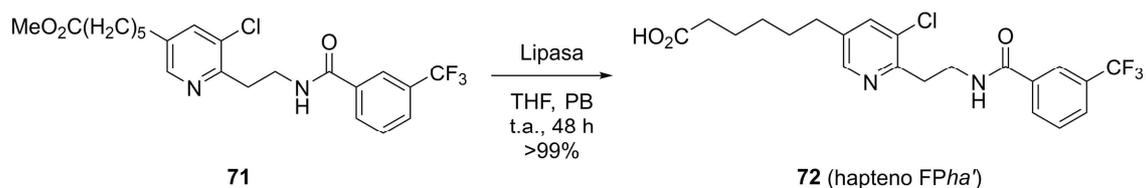
Una vez preparado el hidrocloreto **69**, se procedió a su acoplamiento peptídico mediado por PyAOP con el sintón correspondiente al anillo homoaromático.<sup>194</sup> De acuerdo con el hapteno deseado, el reactivo correspondiente debía ser ácido 2-(trifluorometil)benzoico (**40**), pero por error se empleó en su lugar el ácido 3-(trifluorometil)benzoico (**70**), por lo que se obtuvo la amida de estructura **71** con un rendimiento bajo (Esquema 3.28).



**Esquema 3.28.** Preparación de la amida **71** por acoplamiento peptídico entre **69** y **70**.

Consecuentemente, la estructura de la amida obtenida (**71**) difería en la posición del grupo trifluorometilo respecto a la estructura inicialmente deseada. No obstante, en lugar de repetir la reacción con el ácido inicialmente planteado, y dada la limitada cantidad del precursor **69** en aquel momento, se decidió continuar con el compuesto preparado. Esta decisión se tomó teniendo en cuenta que la finalidad del hapteno *FPha* fue siempre la de utilizarlo como hapteno heterólogo de ensayo para intentar mejorar la sensibilidad de los futuros inmunoensayos y no la de producir anticuerpos. Así, el cambio casual de posición de este grupo trifluorometilo con respecto a su posición en el fungicida permitiría evaluar la influencia de esta variable, o incluso dar lugar a inmunoensayos de mayor sensibilidad.

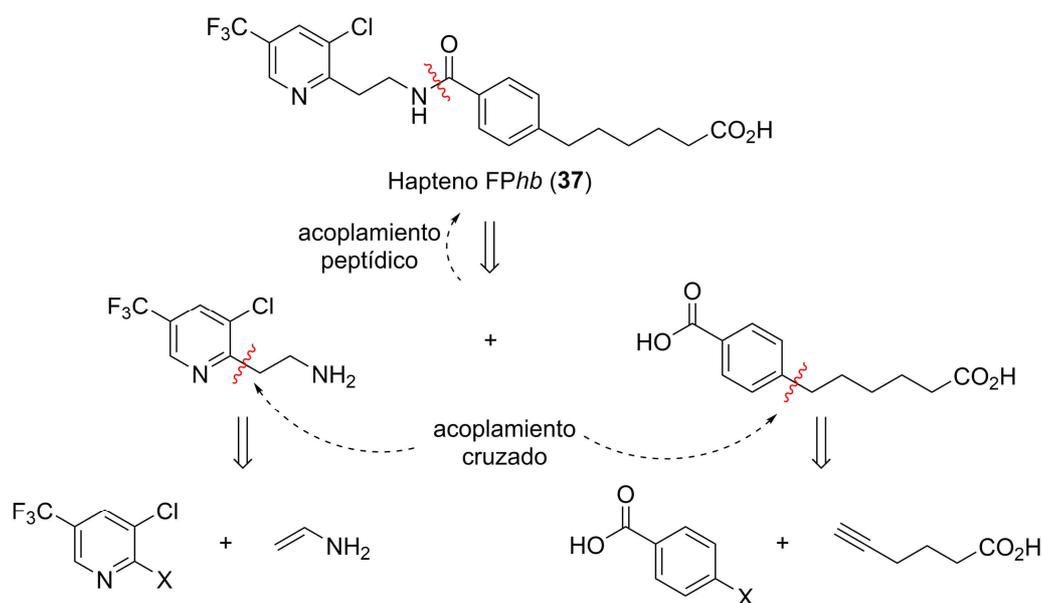
Por tanto, la hidrólisis del éster metílico **71** condujo cuantitativamente al hapteno *FPha'* (**72**), de estructura regioisomérica respecto a la inicialmente prevista (**36**). En este caso la reacción se llevó a cabo con catálisis enzimática heterogénea, empleando lipasa B de *Candida antarctica* inmovilizada en un soporte sólido y tampón fosfato sódico 100 mM a pH 7.4 (PB) como disolvente (Esquema 3.29). De este modo, y considerando toda la ruta sintética, el hapteno *FPha'* (**72**) se obtuvo en un total de 7 etapas a partir de 5-bromo-2,3-dicloropiridina (**63**) con un 8% de rendimiento global.



**Esquema 3.29.** Hidrólisis enzimática del éster metílico **71** para dar lugar al hapteno FPha' (**72**).

### 3.1.5. Síntesis del hapteno FPhb

La ruta sintética para la obtención del hapteno FPhb (**37**) se diseñó de forma equivalente a la del hapteno FPb (**35**), puesto que la única diferencia estructural entre ambos reside en la sustitución del grupo 2-trifluorometilo en el anillo homoaromático de FPb por un átomo de hidrógeno en FPhb. Esto se tradujo en la utilización de ácido 4-yodobenzoico comercial (**73**) para la síntesis del bloque homoaromático, con funcionalización adecuada para introducir el brazo espaciador en la posición C-4 mediante una reacción de Sonogashira (Figura 3.6).



**Figura 3.6.** Análisis retrosintético del hapteno FPhb (**37**). X hace referencia a una agrupación con buena aptitud como grupo saliente (halógeno, sulfonato, etc.).

Al igual que sucedió en la secuencia de obtención del hapteno FPb (**35**), el bloque heteroaromático a emplear sería el hidrocloreto **55**, cuya preparación a partir de la cloropiridina **8** ha sido descrita en la sección 3.1.3. A nivel experimental, la obtención del compuesto **55** por hidrogenación del nitrilo **10** resultó ser problemática, con resultados poco reproducibles e incluso sin producirse reacción en algunos intentos.

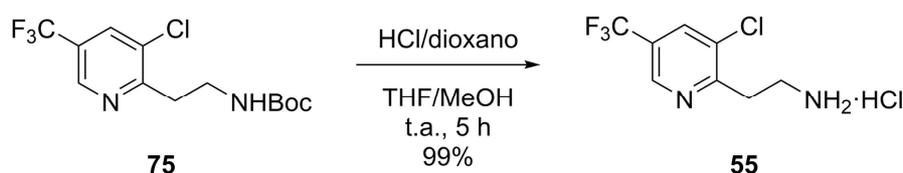
Por ello, se exploró la posibilidad de preparar el hidrocloreto **55** mediante una metodología alternativa con la que se evitara la reacción de hidrogenación. Para ello, se efectuó en primer lugar una reacción de acoplamiento de Suzuki–Miyaura entre (2-((*tert*-butoxicarbonil)amino)etil)trifluoroborato de potasio (**74**) y la cloropiridina **8**, que condujo con rendimiento moderado al compuesto **75** (Esquema 3.30).<sup>203</sup>



**Esquema 3.30.** Preparación del compuesto **75** mediante una reacción de acoplamiento de Suzuki–Miyaura.

Con la metodología anterior fue posible introducir en un solo paso la agrupación etilamino protegida como carbamato de *tert*-butilo, aunque el rendimiento de esta transformación fue menor que el observado en la reacción de sustitución nucleofílica aromática entre **8** y **41** (Esquema 3.11, 94% frente a 53%). Este descenso de reactividad, ya descrito para este tipo de reacción con algunos sustratos derivados de la 2-cloropiridina, puede estar relacionada con la formación de un complejo dimérico de Pd(II) tras la adición oxidativa que de algún modo dificulta el acoplamiento cruzado.<sup>204</sup> Otra posible explicación para este resultado podría ser la competición de la reacción deseada con la deshalogenación de la posición C-2 de **14**, como consecuencia de una eliminación de hidruro β en el intermedio de transmetalación, seguida de la eliminación reductiva del hidruro de Pd(II) resultante. No obstante, el producto de deshalogenación no fue aislado ni detectado espectroscópicamente.

Una vez introducida exitosamente la agrupación etilamino, la posterior hidrólisis del grupo carbamato por tratamiento de **75** con HCl metanólico proporcionó cuantitativamente el hidrocloreto **55** (Esquema 3.31).<sup>205</sup>

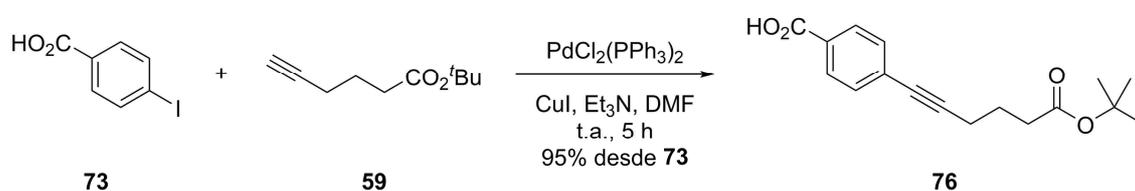


**Esquema 3.31.** Obtención alternativa del hidrocloreto **55** a partir del carbamato **75**.

De este modo, esta estrategia alternativa permitió la conversión de **8** en **55** en dos pasos con un 52% de rendimiento global. A pesar de que con la estrategia original fue

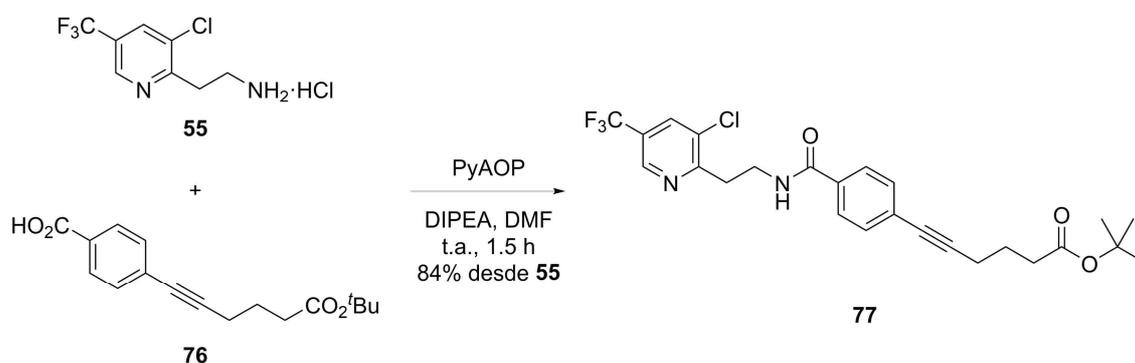
posible obtener este compuesto con un rendimiento del 76% en tres pasos, desde el punto de vista práctico la nueva estrategia resultó más conveniente, dados los problemas de reproducibilidad observados previamente en la etapa de hidrogenación del nitrilo **10** (Esquema 3.13) y ya documentados en las diferentes secuencias sintéticas descritas en la bibliografía para el propio fluopyram.<sup>12,26–28</sup>

De forma paralela, se efectuó una reacción de Sonogashira entre el yodoareno comercial **73** y el alquino **59**, cuya preparación se ha descrito anteriormente (sección 3.1.3, Esquema 3.17), para obtener con excelente rendimiento el compuesto **76** (Esquema 3.32).<sup>201</sup>



**Esquema 3.32.** Reacción de Sonogashira entre **73** y **59** que da lugar al compuesto **76**.

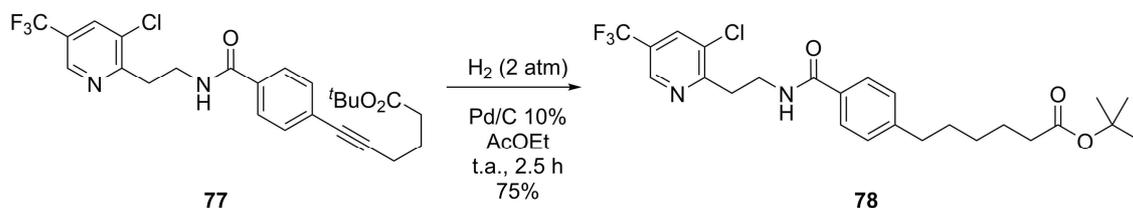
Una vez acoplado el brazo espaciador al sintón homoaromático, se completó el esqueleto del hapteno tras preparar la amida **77** por acoplamiento peptídico entre el ácido **76** y el hidrocloreto **55**, mediado por el reactivo PyAOP como en los casos anteriores.<sup>194</sup>



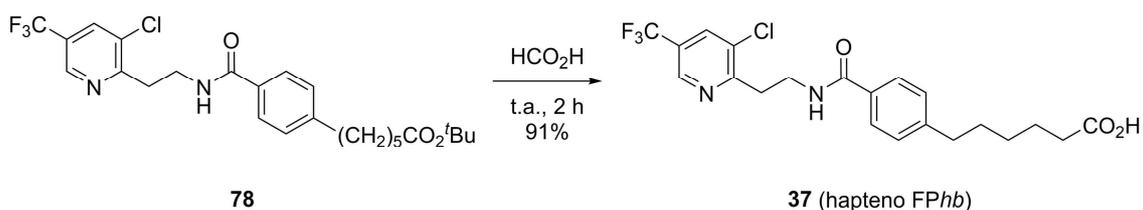
**Esquema 3.33.** Preparación de la amida **77** por acoplamiento peptídico de **55** y **76**.

Finalmente, el hapteno *FPhb* (**37**) se obtuvo tras la hidrogenación del enlace triple C≡C de **77** con catálisis heterogénea de Pd/C al 10% (Esquema 3.34), seguida del tratamiento del compuesto resultante (**78**) con ácido fórmico en condiciones suaves para lograr la hidrólisis del éster *terc*-butílico (Esquema 3.35).<sup>202</sup> De este modo, considerando la estrategia sintética alternativa para la obtención del hidrocloreto **55**,

el hapteno *FPhb* fue sintetizado con un 30% de rendimiento global en 7 etapas a partir de 2,3-dicloro-5-(trifluorometil)piridina (**8**).



**Esquema 3.34.** Hidrogenación del compuesto **77** para dar lugar a **78**.



**Esquema 3.35.** Obtención del hapteno *FPhb* (**37**) por hidrólisis ácida del éster **78**.

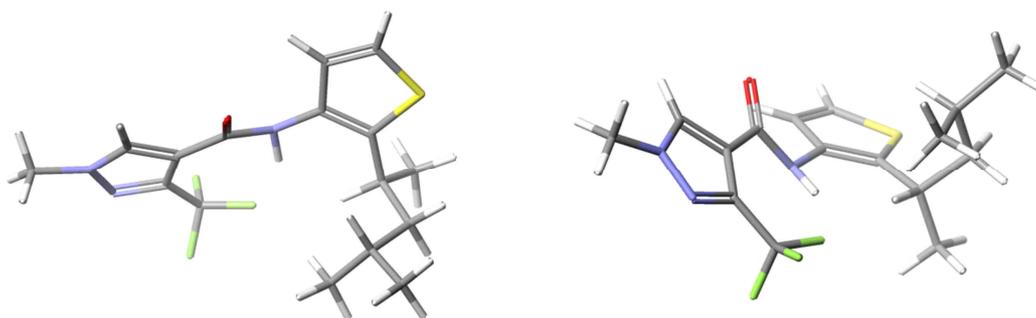
## 3.2. Síntesis de haptenos para penthiopyrad

### 3.2.1. Diseño y análisis retrosintético de haptenos para penthiopyrad

Siguiendo la misma estrategia racional que se llevó a cabo con el fungicida fluopyram, y considerando igualmente la conformación de mínima energía de penthiopyrad (**16**, Figura 3.7), se planeó en primer lugar la preparación de tres haptenos para este fungicida, en los que los brazos espaciadores finalizados en grupos carboxilo se introducirían en posiciones opuestas de la estructura del fungicida. Así, el brazo espaciador de uno de ellos sería una prolongación del grupo metilo unido al anillo de pirazol (hapteno *PPa*, **79**). En los otros dos haptenos se aprovecharía la existencia previa del grupo 4-metilpentan-2-ilo unido al anillo de tiofeno, de modo que en uno se reemplazaría dicho grupo por un brazo espaciador de tipo lineal (hapteno *PPb*, **80**) y en el otro se utilizaría el propio grupo 4-metilpentan-2-ilo como brazo espaciador tras incorporar un grupo carboxilo terminal (hapteno *PPm*, **81**). Todos estos haptenos fueron posteriormente destinados a la producción de anticuerpos para penthiopyrad.

La presencia de un estereocentro en el átomo de carbono que enlaza directamente con el anillo de tiofeno confiere quiralidad a la estructura del fungicida (**16**). Por ello, y

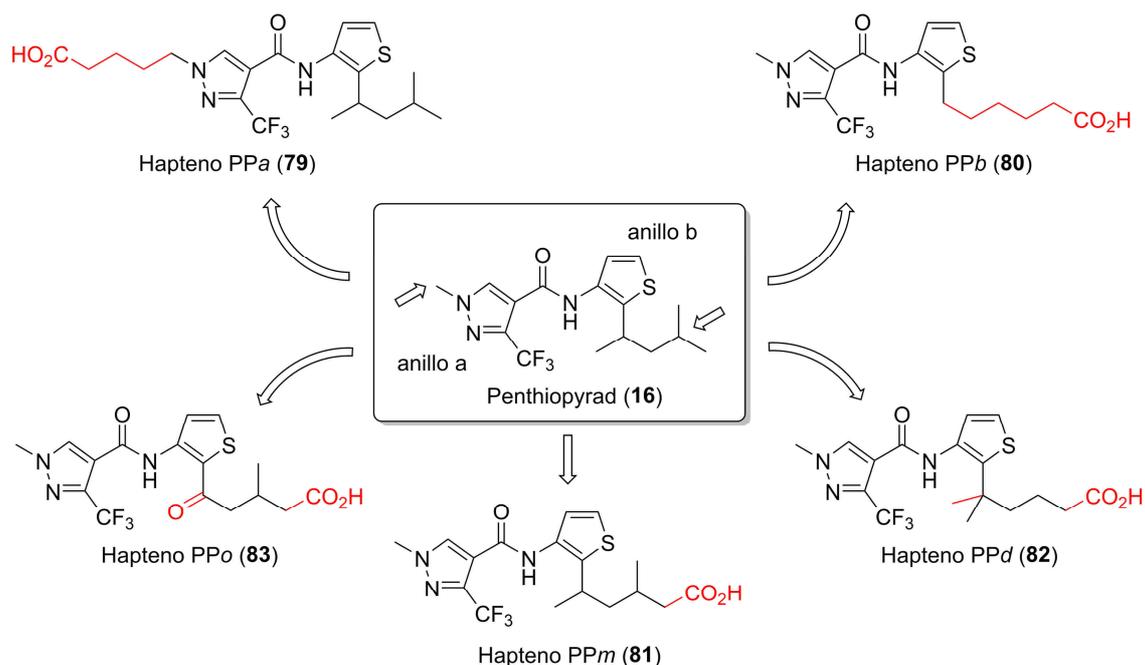
dada la generalmente elevada estereoespecificidad de los anticuerpos,<sup>206</sup> resultaría de gran interés obtener anticuerpos capaces de reconocer indistintamente a los dos posibles enantiómeros, ya que los formulados comerciales hacen uso del fungicida racémico y por tanto cabe la posibilidad de hallar residuos de ambos enantiómeros en los alimentos contaminados. De este modo, se planteó inicialmente la síntesis de un cuarto hapteno en el que dicho carbono estereogénico tuviera dos sustituyentes metilo (hapteno P*Pd*, **82**), quedando así representados los dos enantiómeros del fungicida en un solo hapteno.



**Figura 3.7.** Conformación de mínima energía de penthiopyrad observada desde dos puntos de vista distintos. La geometría se calculó computacionalmente mediante mecánica molecular (MM3) y posteriormente se refinó con MOPAC empleando parámetros PM3.

Adicionalmente, se empleó también como hapteno uno de los intermedios preparados en la síntesis del hapteno P*Pm*, descrita más adelante. En este último hapteno, el carbono estereogénico de penthiopyrad estaría formalmente desmetilado y oxidado a grupo carbonilo (hapteno P*Po*, **83**). Las estructuras de todos los haptenos propuestos para el fungicida penthiopyrad se recogen en la Figura 3.8.

A la vista de las estructuras de los cinco haptenos inicialmente propuestos, puede apreciarse que la formación de un enlace amida entre derivados adecuados de ácido 1-metil-3-(trifluorometil)-1*H*-pirazol-4-carboxílico y de tiofen-3-amina podría proporcionar el esqueleto principal común a los cinco haptenos y al fungicida. Por otra parte, tanto el fragmento 4-metilpentan-2-ilo del hapteno P*Pα*, presente también en el propio fungicida, como los precursores adecuados de los brazos espaciadores en el resto de haptenos, podrían introducirse en la posición C-2 del anillo de tiofeno aprovechando su reactividad intrínseca frente a electrófilos y la presencia del sustituyente nitrogenado en posición C-3 para controlar la regioselectividad.



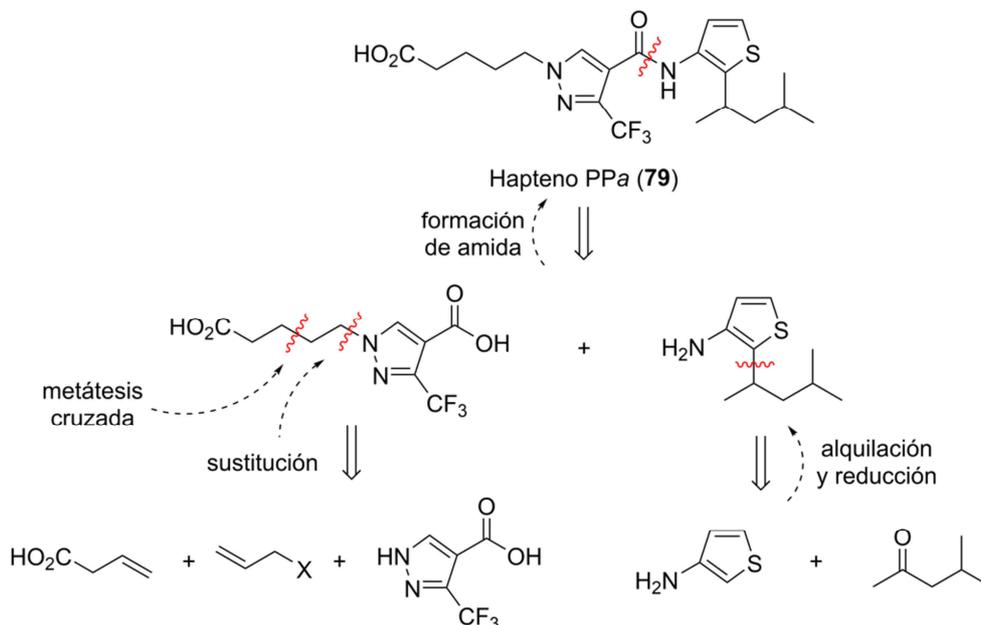
**Figura 3.8.** Haptenos inicialmente diseñados para el fungicida penthiopyrad (**16**). Las letras a y b hacen referencia a los dos anillos aromáticos del fungicida, la letra m al grupo metilo del extremo del fragmento alifático, la letra d a la presencia de dos grupos metilo geminales en el hapteno PPD (**82**) y la letra o al átomo de oxígeno de la cetona existente en el hapteno PPO (**83**).

### 3.2.2. Síntesis del hapteno PPa

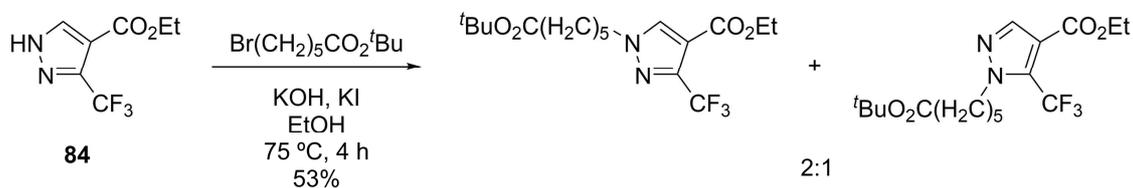
Para la preparación del hapteno PPa (**79**) se planeó una secuencia convergente, en la cual se formaría el esqueleto principal tras introducir el brazo espaciador en el anillo de pirazol y el grupo 4-metilpentan-2-ilo en el anillo de tiofeno (Figura 3.9). Los reactivos de partida empleados para la formación del esqueleto fueron 3-(trifluorometil)-1*H*-pirazol-4-carboxilato de etilo (**84**), 4-metilpentan-2-ona (**29**) y 3-aminotiofeno-2-carboxilato de metilo (**26**). Por otra parte, para la obtención del brazo espaciador se partió de bromuro de alilo (**85**) y de ácido but-3-enoico (**86**).

En el caso de este hapteno fueron empleados dos precursores para ensamblar el brazo espaciador mediante una metátesis cruzada, una estrategia diferente a cualquiera de los casos comentados hasta ahora, en los que se empleó un solo precursor con el número de átomos de carbono deseados. En un primer momento se pretendía seguir la estrategia habitual y efectuar la alquilación del pirazol **84** con 6-bromohexanoato de *terc*-butilo, lo que habría dado lugar a un hapteno con un brazo espaciador lineal de seis átomos de carbono. Sin embargo, al llevar a cabo esta reacción empleando KOH como base y una cantidad catalítica de KI para generar *in situ*

el yoduro de alquilo correspondiente, se obtuvo una mezcla 2:1 de productos de alquilación en posiciones N-1 y N-2, los cuales no pudieron separarse mediante los métodos cromatográficos habituales (Esquema 3.36).

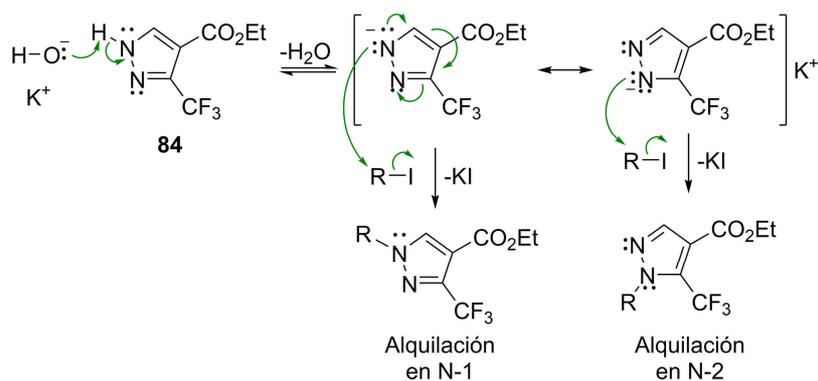


**Figura 3.9.** Análisis retrosintético del hapteno PPa (**79**). X hace referencia a una agrupación con buena aptitud como grupo saliente (halógeno, sulfonato, etc.).



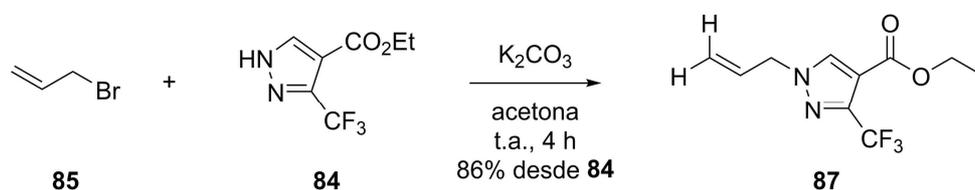
**Esquema 3.36.** Alquilación del pirazol **84** con 6-bromohexanoato de *terc*-butilo.

La formación del producto alquilado en la posición N-2 puede explicarse por la isomerización del anillo de pirazol en medio básico (Esquema 3.37). La baja regioselectividad observada, que no se modificó de manera sustancial al utilizar otras bases, sugirió que la isomerización en las condiciones de reacción empleadas era más rápida que la reacción de sustitución nucleofílica deseada. Por este motivo, y ante las posibles dificultades que pudieran surgir en la hidrólisis quimioselectiva del éster etílico, cuya presencia fue necesaria para evitar una alquilación indeseada en el grupo carboxilo, se modificó la estrategia inicial tal y como se describe a continuación.



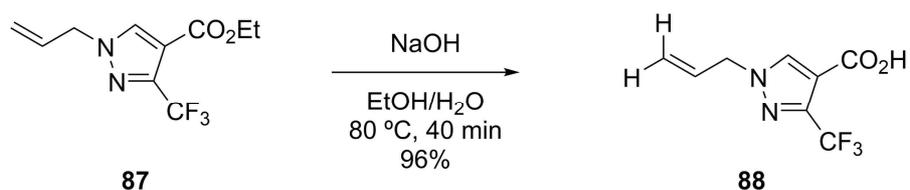
**Esquema 3.37.** Mecanismo de formación de los dos isómeros de alquilación del pirazol **84** con RBr empleando KOH como base, siendo R =  $(\text{CH}_2)_5\text{CO}_2^t\text{Bu}$ .

En primer lugar, se llevó a cabo la alquilación del pirazol **84** con bromuro de alilo (**85**) y utilizando  $\text{K}_2\text{CO}_3$  como base.<sup>207</sup> En este caso, la reacción de alquilación condujo a una mezcla 40:1 del derivado alílico **87** y de su isómero de alquilación en N-2, siendo por tanto una transformación mucho más regioselectiva (Esquema 3.38). Aparentemente, en estas condiciones, y dada la mayor reactividad del haluro alílico, existe un mayor control cinético de la reacción de alquilación que favorece la misma por la posición nitrogenada más reactiva. Aunque esta reacción ya había sido descrita con anterioridad,<sup>207</sup> en nuestro caso el producto deseado **87** se obtuvo con mayor regioselectividad disminuyendo el tiempo de reacción a 4 h.



**Esquema 3.38.** Alilación regioselectiva del pirazol **84** que origina el compuesto **87**.

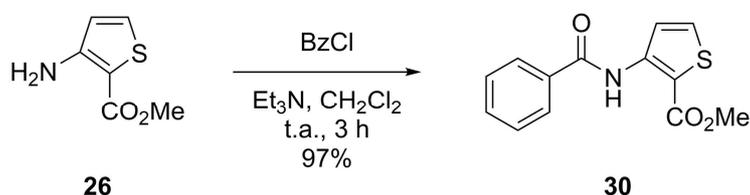
Además de solucionar el problema de la regioselectividad, la reacción anterior permitió la incorporación de un punto de anclaje para el resto del brazo espaciador, pero sin incorporar el grupo carboxilato terminal. Por este motivo, la hidrólisis alcalina del éster etílico de **87** para dar **88** pudo llevarse a cabo de forma prácticamente cuantitativa (Esquema 3.39).<sup>208</sup>



**Esquema 3.39.** Preparación del ácido **88** por saponificación del éster etílico **87**.

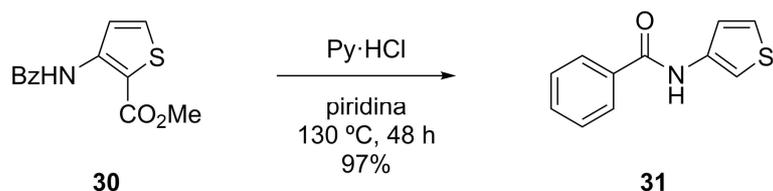
En paralelo, se preparó el bloque sintético correspondiente al anillo de tiofeno mediante una estrategia similar a la que se ha descrito para la síntesis de penthiopyrad, es decir, partiendo del compuesto **26**.<sup>38</sup> Este precursor contaba con un grupo metoxicarbonilo en la misma posición donde se debía introducir el fragmento 4-metilpentan-2-ilo, por lo que *a priori* podría haber resultado más conveniente partir de tiofen-3-amina, sin dicho grupo. Sin embargo, se han descrito dificultades a la hora de aislar y manipular dicho compuesto, que por ello sólo puede encontrarse comercialmente en forma de sales.<sup>209</sup> La utilización del compuesto **26**, que además resultó ser más asequible económicamente que la tiofen-3-amina, evitó estos problemas. A ello se sumó la existencia de condiciones de reacción suaves para la eliminación por descarboxilación en medio ácido del grupo metoxicarbonilo.<sup>210</sup>

En primer lugar, se llevó a cabo la protección del grupo amino, tanto para evitar posibles adiciones electrofílicas a dicho grupo en etapas posteriores como para controlar el estado de activación del anillo aromático frente a sustituciones electrofílicas. Para ello, se decidió imitar la estrategia descrita en la síntesis del fungicida y protegerlo en forma de amida, para lo que se trató el compuesto **26** con cloruro de benzoílo en condiciones suaves.<sup>211</sup> La reacción proporcionó de forma cuantitativa el producto benzoilado **30** (Esquema 3.40).



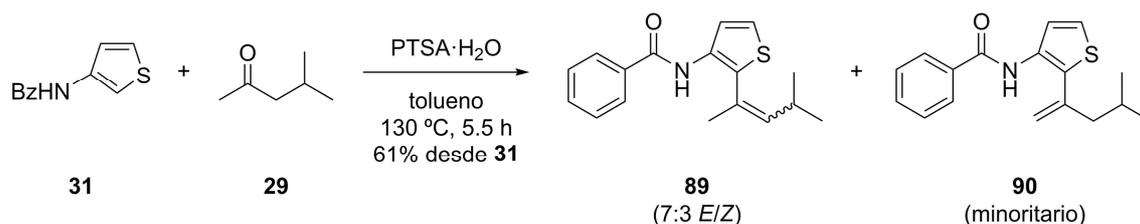
**Esquema 3.40.** Protección del grupo amino de **26** en forma de benzamida.

Posteriormente se procedió a la eliminación del grupo metoxicarbonilo de la posición C-2 del anillo de tiofeno mediante una reacción de descarboxilación. La transformación se llevó a cabo haciendo reaccionar el éster **30** con cloruro de piridinio (Py·HCl) en piridina a reflujo, lo que dio lugar cuantitativamente al producto **31** (Esquema 3.41). La reacción, formalmente una hidrólisis seguida de descarboxilación y descrita inicialmente por Coutts y colaboradores,<sup>210</sup> tiene lugar en condiciones relativamente suaves y requiere de la presencia de un dador prótico en posición contigua al grupo metoxicarbonilo, función que al parecer puede desempeñar en este caso el átomo de hidrógeno de la amida a pesar de su reducida acidez.



**Esquema 3.41.** Obtención del compuesto **31** a partir del éster metílico **30**.

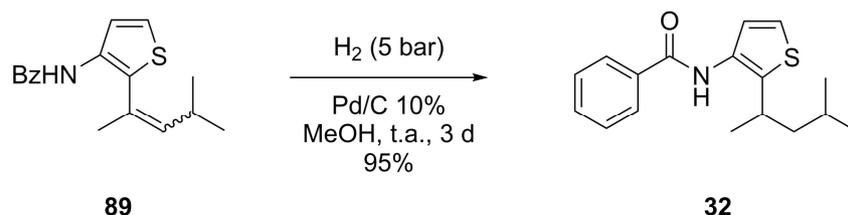
Una vez eliminado el sustituyente en la posición C-2 del anillo de tiofeno en el derivado **31**, ya era posible la introducción del grupo alifático deseado. Para ello, se hizo reaccionar dicho compuesto con 4-metilpentan-2-ona (**29**) en reflujo de tolueno con catálisis ácida, lo que propició una reacción de sustitución electrofílica aromática ( $S_EAr$ ) regioselectiva para formar el enlace simple C–C buscado. En estas condiciones el alcohol formado se deshidrató para proporcionar una mezcla 7:3 de los isómeros geométricos *E/Z* del alqueniltiofeno **89** y una pequeña cantidad ( $\approx 6\%$ ) del isómero **90** (Esquema 3.42),<sup>38</sup> un resultado consistente con un control termodinámico del proceso de eliminación.



**Esquema 3.42.** Reacción de alquilación en medio ácido del tiofeno **31** con la cetona **29**.

Es bien sabido que la estructura electrónica de los anillos de tiofeno hace que sean altamente reactivos frente a electrófilos en posiciones C-2 y C-5. Además, en el caso del compuesto **31**, la presencia del grupo benzamido en posición C-3 aporta densidad electrónica adicional a la posición C-2, y por tanto dirige a dicha posición la adición inicial del electrófilo **90**. Estas características justifican la regioselectividad de la transformación anterior.

Para completar la introducción del grupo 4-metilpentan-2-ilo, se efectuó la hidrogenación catalítica del enlace doble C=C formado con catálisis heterogénea de Pd/C. La utilización de condiciones habituales y tiempos cortos de reacción condujo a hidrogenaciones incompletas, por lo que fue necesario llevar a cabo el proceso a una presión de H<sub>2</sub> de 5 atm durante 3 días para lograr la transformación total de **89** en el derivado **32** (Esquema 3.43).



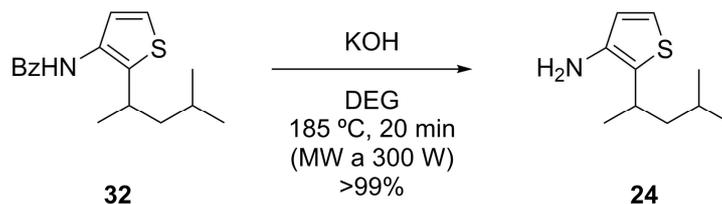
**Esquema 3.43.** Preparación del compuesto **32** por hidrogenación catalítica de **89**.

La causa más probable de la dificultad observada en la hidrogenación del doble enlace es la congestión estérica existente en el entorno del mismo, a la que se suma la conjugación con el anillo aromático. De hecho, se observó una variación importante en los desplazamientos químicos de RMN para algunos núcleos pertenecientes al anillo en el compuesto **89** respecto a los valores observados en otros productos de la secuencia sintética, lo que probablemente se debió a la combinación de la conjugación con la influencia de la anisotropía magnética en el entorno del enlace C=C. A modo de ejemplo, el desplazamiento químico de  $^1\text{H}$  para el hidrógeno en posición C-4 del anillo de tiofeno, con un valor de 7.94 ppm en el compuesto **89**, pasó a ser de 7.41 ppm en **32**, y con excepción del compuesto **24**, se mantuvo en un valor similar en las posteriores etapas de la secuencia.

Para terminar la preparación del bloque sintético correspondiente al anillo de tiofeno, se procedió a la desprotección del grupo amino derivatizado inicialmente a benzamida. En un primer momento se ensayaron las condiciones descritas en la bibliografía para llevar a cabo la hidrólisis ácida de **32** en una mezcla a reflujo de HCl y ácido acético durante 27 h.<sup>38</sup> El resultado fue una mezcla carbonizada con una cantidad mínima del producto buscado. Nuevos intentos con otras condiciones habituales de hidrólisis ácida para amidas proporcionaron resultados similares, por lo que se decidió tratar de llevar a cabo el proceso mediante hidrólisis alcalina.

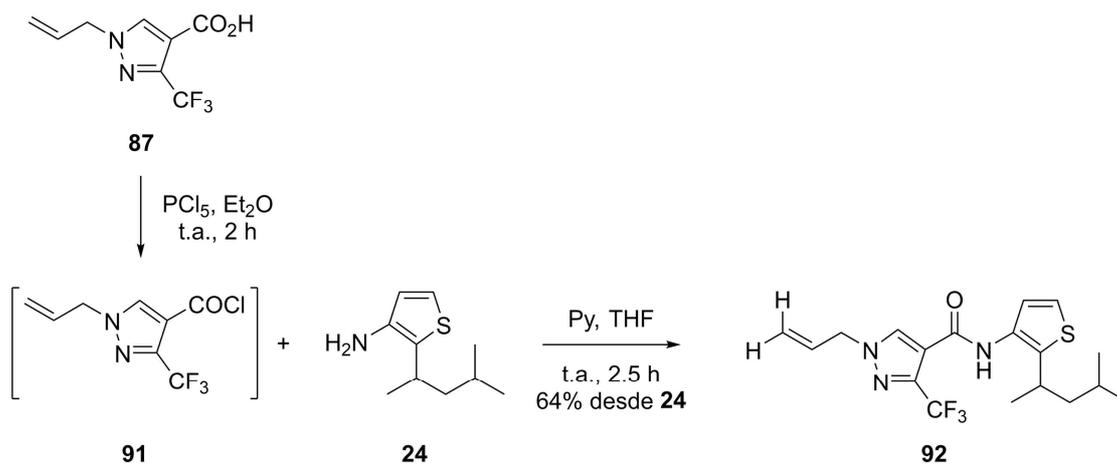
Un primer intento de hidrólisis básica en el que se trató la amida **32** con NaOH al 20% a reflujo durante 22 h no dio lugar al producto deseado,<sup>212</sup> pero a diferencia de lo que sucedió en los diversos intentos de hidrólisis ácida, tampoco se produjo la descomposición del material de partida. Ante esta situación, se decidió repetir la reacción empleando como fuente de calor la irradiación con microondas durante 3 h, lo que provocó la formación de una pequeña cantidad de la amina buscada **24**. De este modo, tras un proceso de optimización, la hidrólisis alcalina de **32** pudo llevarse a cabo de forma prácticamente cuantitativa en tan solo 20 min con un gran exceso de KOH y

empleando como disolvente dietilenglicol (DEG), cuyo elevado punto de ebullición permitió realizar el proceso a 185 °C (Esquema 3.44).



**Esquema 3.44.** Obtención del aminotiofeno **24** por hidrólisis alcalina de **32**.

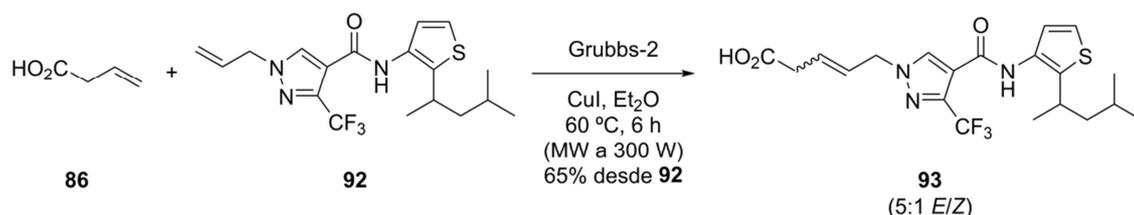
En este punto, con los dos bloques sintéticos ya preparados, se procedió a su acoplamiento por formación de un enlace amida. Para ello, en primer lugar se preparó el cloruro de ácido **91** por tratamiento del ácido **87** con  $\text{PCl}_5$ ,<sup>213</sup> y éste se hizo reaccionar posteriormente con el aminotiofeno **24** en presencia de piridina para neutralizar el HCl formado en la reacción.<sup>38</sup> De este modo, la amida deseada **92** se obtuvo con rendimiento moderado en dos etapas (Esquema 3.45).



**Esquema 3.45.** Reacción de formación de la amida **92**.

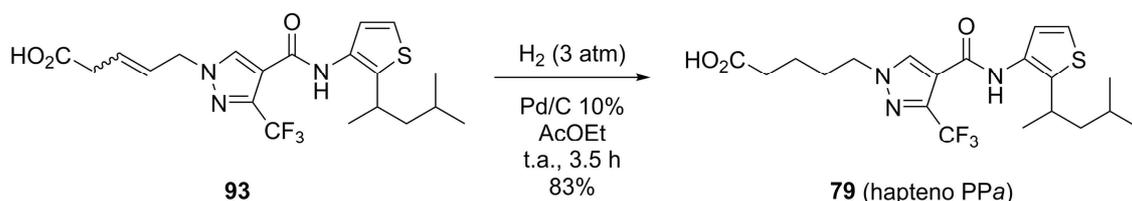
Con este último paso se completó la síntesis del esqueleto del hapteno, por lo que se retomó el ensamblaje del brazo espaciador a partir del doble enlace C=C introducido en la etapa de alilación inicial de la secuencia (Esquema 3.38). Como se ha adelantado previamente, para hacerlo se llevó a cabo una reacción de metátesis cruzada entre el compuesto **92** y el ácido but-3-enoico (**86**), empleando para ello el sistema catalítico propuesto por Lipshutz y colaboradores. Este sistema se compone de catalizador de Grubbs de 2ª generación [abreviadamente Grubbs-2, cuyo nombre completo es (1,3-bis(2,4,6-trimetilfenil)-2-imidazolidinilideno)dicloro(fenilmetileno)(triciclohexilfosfina)rutenio(II)] y CuI, que acelera la reacción tanto por la estabilización del

rutenio por parte del anión yoduro como por el efecto secuestrante de fosfinas del Cu(I).<sup>214</sup> La reacción llevada a cabo en estas condiciones dio lugar al producto de metátesis **93**, una mezcla 5:1 de los isómeros *E/Z*, con un rendimiento del 65% en base al material de partida recuperado (**92**, 15%) (Esquema 3.46).



**Esquema 3.46.** Reacción de metátesis cruzada entre los compuestos **86** y **92** para proporcionar el alqueno **93**.

Por último, y una vez completada la construcción de todo el esqueleto carbonado del hapteno, se efectuó la hidrogenación catalítica del enlace doble C=C de **93**, dando lugar con buen rendimiento al hapteno PPa (**79**, Esquema 3.47). Haciendo balance de toda la secuencia, el hapteno se preparó a partir de 3-aminotiofeno-2-carboxilato de metilo (**26**) con un 19% de rendimiento global para 11 etapas.

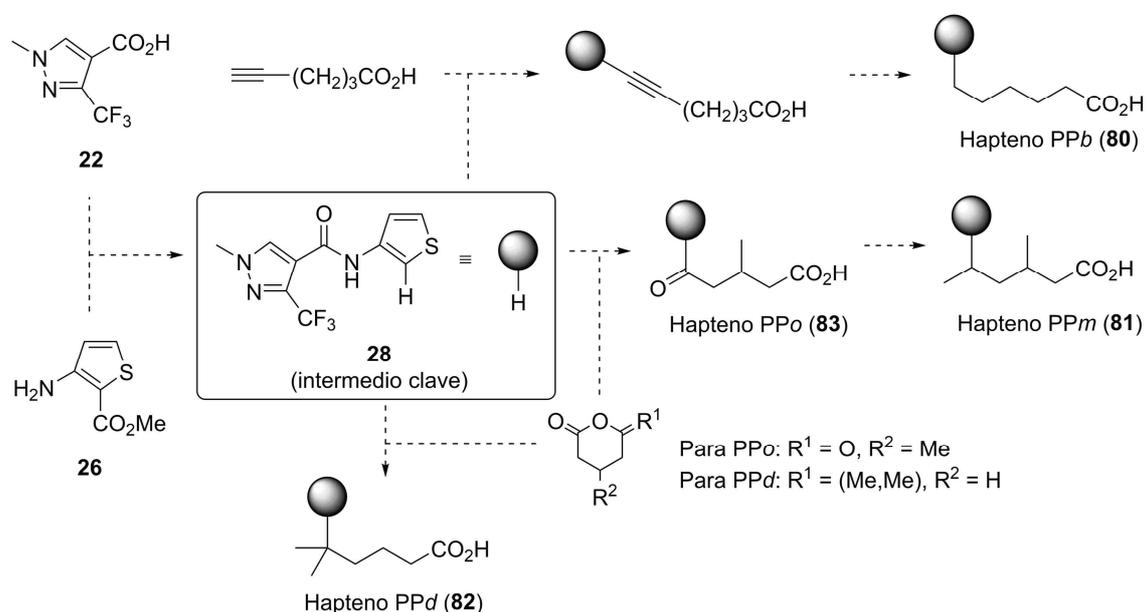


**Esquema 3.47.** Preparación del hapteno PPa (**79**) por hidrogenación catalítica de **93**.

### 3.2.3. Síntesis del hapteno PPb

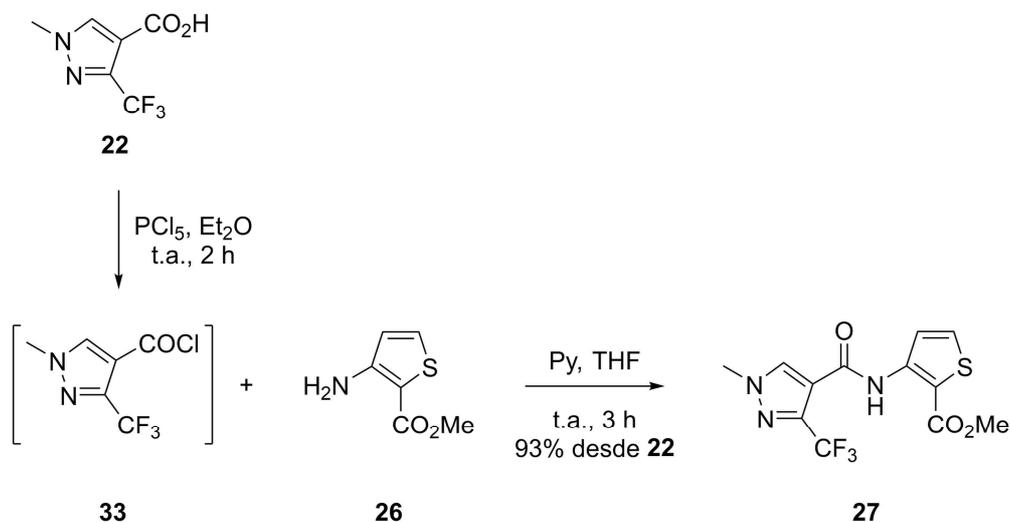
Teniendo en cuenta los antecedentes bibliográficos para la preparación de penthiopyrad,<sup>38</sup> las rutas sintéticas para la preparación de los restantes haptenos planeados para este fungicida se diseñaron de forma lineal. De este modo, en primer lugar se obtendría el esqueleto bianular del fungicida por formación de un enlace amida, empleando como precursores iniciales el ácido 1-metil-3-(trifluorometil)-1*H*-pirazol-4-carboxílico (**22**) para el anillo de pirazol y el 3-aminotiofeno-2-carboxilato de metilo (**26**) para el anillo de tiofeno, éste último ya utilizado para la preparación del hapteno PPa. Dicha unión, seguida de la posterior eliminación del grupo metoxicarbonilo del anillo de tiofeno, daría lugar al intermedio clave **28**, similar al compuesto **31**. A partir de este intermedio, cada uno de los haptenos se obtendría

mediante una secuencia divergente en la que se introduciría el brazo espaciador adecuado en cada caso. El plan general de obtención de esta familia de haptenos se resume en la Figura 3.10.



**Figura 3.10.** Propuesta sintética resumida para la obtención de los haptenos PPb (80), PPM (81), PPd (82) y PPO (83).

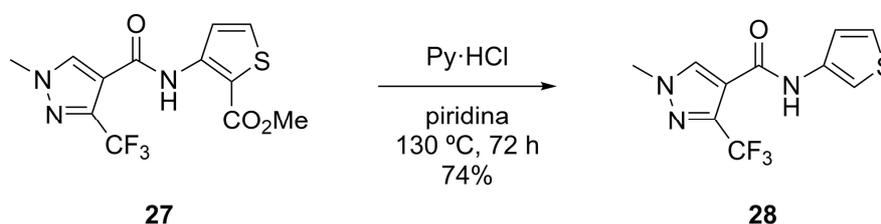
En el caso concreto del hapteno PPb (80), el brazo espaciador sería introducido mediante una reacción de Sonogashira con hex-5-inoato de *tert*-butilo (59), ya empleado en la síntesis de la mayoría de haptenos de fluopyram. Tras este paso, el hapteno se obtendría tras la reducción del enlace triple  $\text{C}\equiv\text{C}$  y la hidrólisis del éster *tert*-butílico del brazo espaciador.



**Esquema 3.48.** Formación de un enlace amida entre 33 y 26 para proporcionar 27.

De este modo, el primer paso fue la preparación del intermedio clave **28**, para lo que se formó un enlace amida entre los reactivos comerciales **22** y **26** siguiendo la misma estrategia que se empleó en la síntesis del hapteno PPa.<sup>38</sup> Así, la reacción entre la amina **26** y el cloruro de ácido **33**, recién preparado por tratamiento del ácido **22** con  $\text{PCl}_5$ ,<sup>213</sup> proporcionó la amida **27** con excelente rendimiento (Esquema 3.48).

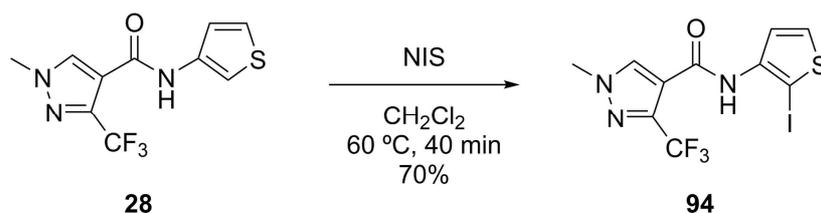
Al igual que en la preparación del hapteno PPa, la eliminación del grupo metoxicarbonilo de **27**, que en este caso dio lugar al intermedio clave **28**, se llevó a cabo en condiciones suaves y con buen rendimiento por tratamiento de **27** con cloruro de piridinio en reflujo de piridina durante 3 días (Esquema 3.49).<sup>38,210</sup>



**Esquema 3.49.** Obtención del intermedio clave **28** a partir del compuesto **27**.

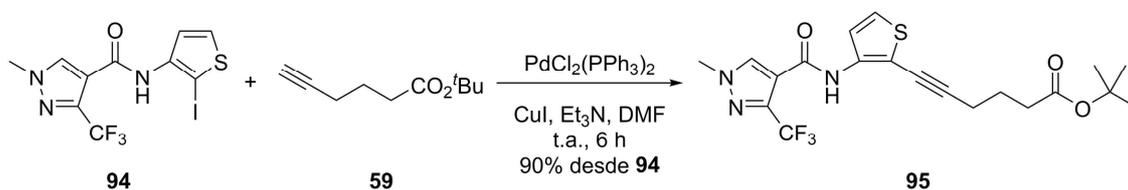
Una vez disponible el intermedio **28**, se inició la síntesis propiamente dicha del hapteno PPb. Teniendo en cuenta que el brazo espaciador se introduciría posteriormente mediante una reacción de Sonogashira, era necesario introducir un buen grupo saliente en la posición C-2 del anillo de tiofeno de forma regioselectiva. De este modo, y de acuerdo con la literatura, se llevó a cabo en primer lugar la bromación de dicha posición promovida por *N*-bromosuccinimida (NBS).<sup>209,215</sup> La formación del producto deseado se evidenció por la considerable disminución del desplazamiento químico de  $\text{RMN-}^{13}\text{C}$  del carbono en posición C-2 del anillo, que pasó de 111.4 ppm en **28** a 95.9 ppm en el producto de bromación.

Desafortunadamente, cuando se trató de llevar a cabo la reacción de Sonogashira entre el producto de bromación derivado de **28** y el alquino **59** no se observó avance del proceso, ni tan siquiera incrementando la temperatura o aumentando los tiempos de reacción. Ante la posibilidad de que el derivado bromado no fuera lo suficientemente reactivo en la adición oxidativa inicial, se decidió preparar en su lugar el derivado yodado equivalente. Para ello, siguiendo la misma estrategia, se trató el compuesto **28** con *N*-yodosuccinimida (NIS) en condiciones similares a las empleadas en la bromación con NBS, lo que dio lugar al producto de yodación **94** con buen rendimiento (Esquema 3.50).<sup>216</sup>



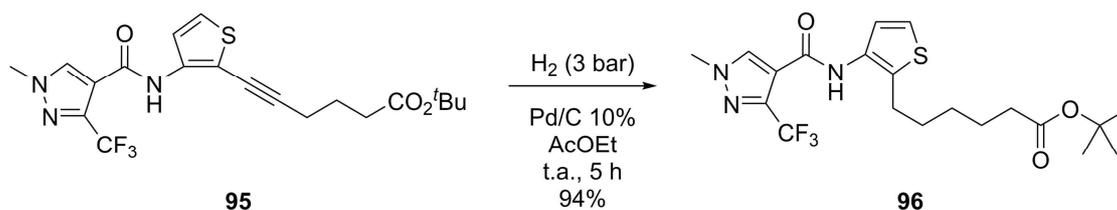
**Esquema 3.50.** Preparación del derivado **94** a partir del compuesto **28**.

Una vez preparado el derivado **94**, se procedió a su acoplamiento con el alquino **59**, tal y como se había intentado anteriormente con el derivado bromado. En este caso la reacción de Sonogashira deseada sí se produjo satisfactoriamente, conduciendo a la formación del alquino **95** con excelente rendimiento (Esquema 3.51).<sup>201</sup>



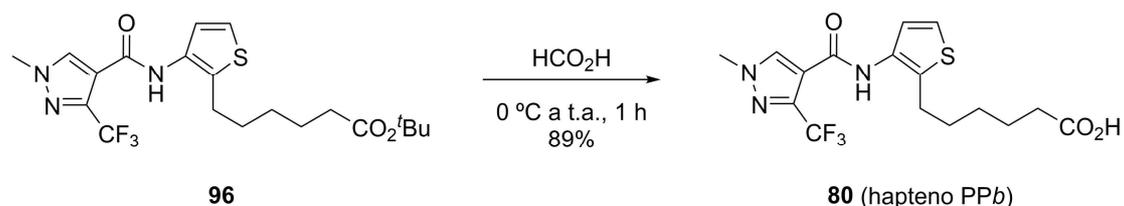
**Esquema 3.51.** Síntesis del compuesto **95** por acoplamiento de Sonogashira de **94** y **59**.

Para completar la síntesis del hapteno PPb (**80**), se procedió primero a la hidrogenación catalítica del triple enlace C≡C de **95**. La reacción se llevó a cabo bajo una presión de H<sub>2</sub> de 3 bar, y como en otras ocasiones con catálisis heterogénea de Pd/C, obteniéndose el producto de hidrogenación **96** con excelente rendimiento (Esquema 3.52).



**Esquema 3.52.** Hidrogenación catalítica del alquino **95** para dar lugar al compuesto **96**.

Por último, la desprotección del grupo carboxilo del brazo espaciador se efectuó mediante la hidrólisis del éster *tert*-butílico de **96** con ácido fórmico, reacción que proporcionó de forma prácticamente cuantitativa el hapteno PPb (**80**, Esquema 3.53).<sup>202</sup> Considerando el conjunto de la secuencia sintética, este hapteno se preparó con un 36% de rendimiento en 8 etapas.

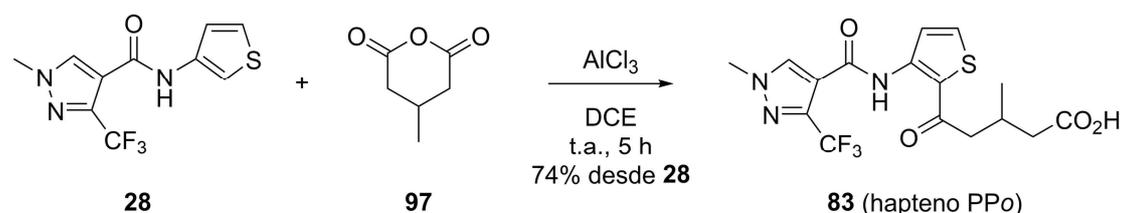


Esquema 3.53. Obtención del hapteno PPb (**80**) tras la hidrólisis del éster **96**.

### 3.2.4. Síntesis de los haptenos PPm y PPO

Según lo expuesto en la Figura 3.10 y partiendo del intermedio **28**, cuya síntesis se ha detallado en la sección anterior, se preparó el hapteno PPm (**81**) mediante una acilación de Friedel–Crafts regioselectiva con anhídrido 3-metilglutárico (**97**) seguida de la adición nucleofílica de metilo y la reducción del alcohol terciario resultante.

Así, el tratamiento del compuesto **28** con el anhídrido comercial **97** a temperatura ambiente en presencia del ácido de Lewis AlCl<sub>3</sub> condujo a la cetona **83** (Esquema 3.54).<sup>217</sup> Dada la similitud estructural de **83** con el hapteno PPm, se decidió utilizar este compuesto no solo como intermedio en la preparación de éste, sino también como hapteno heterólogo (hapteno PPO) para la preparación de conjugados de ensayo adicionales, potencialmente adecuados para la mejora de la sensibilidad de los inmunoensayos basados en los anticuerpos derivados tanto del hapteno PPm como del resto de haptenos inmunogénicos preparados.

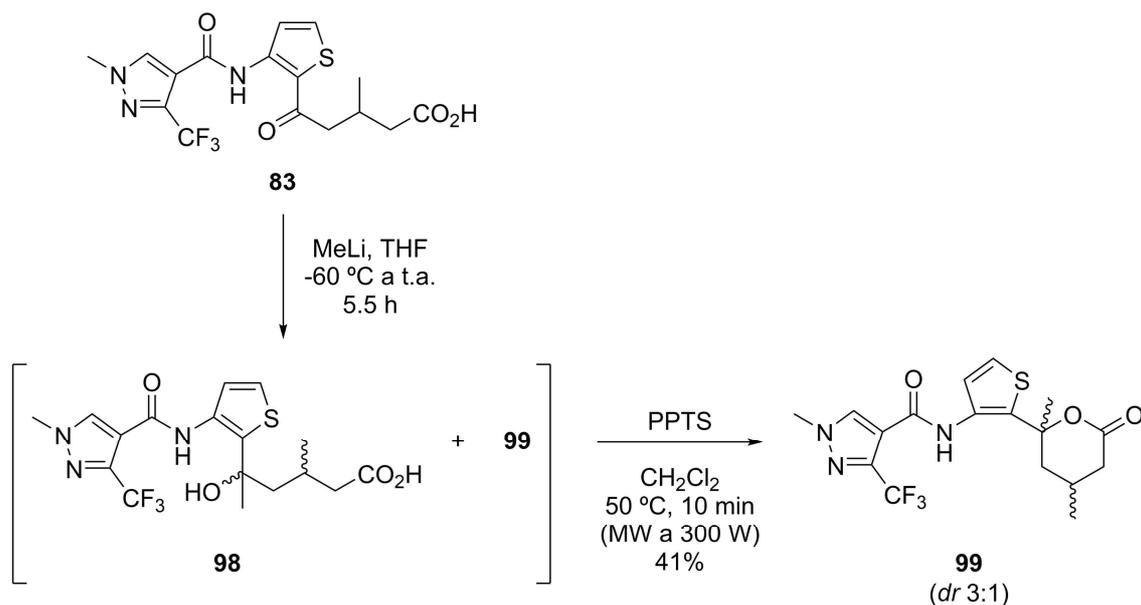


Esquema 3.54. Síntesis del hapteno PPO (**83**) a partir de los compuestos **28** y **97**.

Como es bien sabido, en estas condiciones el ácido de Lewis forma un complejo con uno de los grupos carbonilo del anhídrido **97**, lo que incrementa su electrofilia y permite el ataque nucleofílico del anillo de tiofeno de **28**, bien de forma directa o bien tras la apertura del anillo y formación de un catión acilio intermedio. Por otra parte, como ya sucedió en la reacción entre el compuesto **31** y la cetona **29** (Esquema 3.42), la S<sub>E</sub>Ar se produjo de forma regioselectiva en la posición C-2 del anillo de tiofeno debido a la combinación de los efectos electrónicos convergentes del propio anillo de tiofeno y del sustituyente carboxamido en la posición C-3.

Una vez obtenido el compuesto **83** (hapteno PPO), la síntesis del hapteno PPM requería la sustitución del grupo carbonilo del mismo por un grupo metilo. En un primer momento, se intentó introducir el nuevo átomo de carbono requerido mediante una reacción de Wittig de **83** con el iluro de fósforo derivado del bromuro de metiltrifenilfosfonio, formado *in situ* por desprotonación de éste con *tert*-butóxido de potasio,<sup>218</sup> de modo que el hapteno PPM se obtendría tras la reducción del enlace doble C=C formado. Desafortunadamente, en estas condiciones la reacción de Wittig buscada no tuvo lugar, ni siquiera tras la protección del grupo carboxilo en forma de éster metílico.

En vista de los resultados obtenidos, se planteó una estrategia alternativa basada en la reacción del compuesto **83** con metil litio (MeLi) o bromuro de metilmagnesio (equivalentes sintéticos del anión metilo), seguida de la reducción del enlace C=O del alcohol resultante. De este modo, siguiendo una adaptación de un procedimiento descrito para el proceso,<sup>219</sup> la cetona **83** se hizo reaccionar con 2 equivalentes de MeLi en tetrahidrofurano con el objetivo de formar el hidroxiácido **98** (Esquema 3.55).

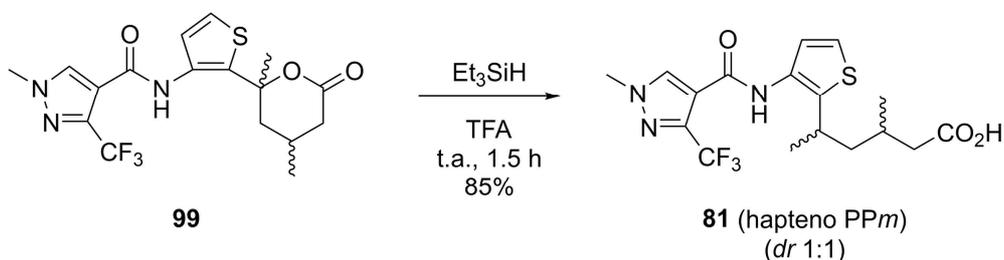


**Esquema 3.55.** Reacción de la cetona **83** con MeLi para dar el hidroxiácido **98**, seguida de su transformación en la lactona **99**.

La reacción proporcionó una mezcla del producto deseado, el hidroxiácido **98**, y de otro compuesto, cuya caracterización espectroscópica llevó a asignarle la estructura **99**. Este producto se formó por lactonización intramolecular del hidroxiácido **98**, probablemente catalizada por el medio ácido utilizado en el procesado acuoso del medio de reacción. Del mismo modo, tras la purificación cromatográfica de **98**, un

análisis rápido mediante cromatografía en capa fina mostró la reaparición de la lactona **99**, presumiblemente formada debido al carácter débilmente ácido del gel de sílice. Por ello, para facilitar el proceso de purificación, el crudo de la reacción de **83** con MeLi se calentó brevemente con irradiación con microondas en presencia de una cantidad catalítica de *para*-toluenosulfonato de piridinio (PPTS). Se produjo así la lactonización completa de **98** a **99**, que tras la correspondiente purificación cromatográfica se aisló como una mezcla 3:1 de diastereoisómeros *sin* y *anti*.

Por último, se procedió a la reducción de la posición pseudo-bencílica de la lactona **99**, para lo que se hizo reaccionar ésta en condiciones suaves con trietilsilano (Et<sub>3</sub>SiH) y ácido trifluoroacético (TFA). Mediante este tratamiento se produce la protonación del grupo carboxílico lactónico, lo que favorece la ruptura del enlace C–O y con ella la generación de un centro pseudo-bencílico catiónico. Dicho centro, cuya carga es estabilizada tanto por conjugación con el anillo de tiofeno como por efecto inductivo dador de los dos sustituyentes alquílicos, es reducido después por un agente reductor suave como es el trietilsilano.<sup>31,220</sup> De este modo, la conversión de la lactona **99** en el hapteno P*Pm* (**81**), obtenido como una mezcla equimolar de diastereoisómeros, transcurrió con excelente rendimiento (Esquema 3.56).



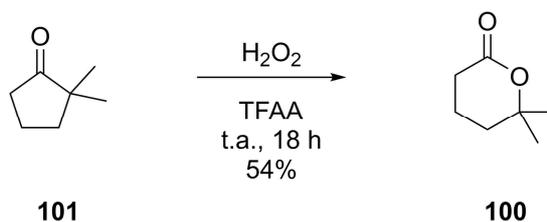
**Esquema 3.56.** Síntesis del hapteno P*Pm* (**81**) por reducción de la lactona **99**.

Por tanto, considerando la secuencia completa, el hapteno P*Pm* (**81**) se obtuvo en 6 etapas a partir de ácido 1-metil-3-(trifluorometil)-1*H*-pirazol-4-carboxílico (**22**) con un rendimiento global del 18%. Como intermedio de su síntesis se obtuvo también el compuesto **83** (hapteno P*Po*), preparado en las 4 primeras etapas a partir del mismo precursor con un 51% de rendimiento global.

### 3.2.5. Síntesis del hapteno P*Pd*: Obtención del hapteno P*Pd*'

Como se expuso previamente, y siguiendo el mismo razonamiento que en el caso de los haptenos P*Pb*, P*Pm* y P*Po*, la preparación del hapteno P*Pd* (**82**) se llevaría a cabo

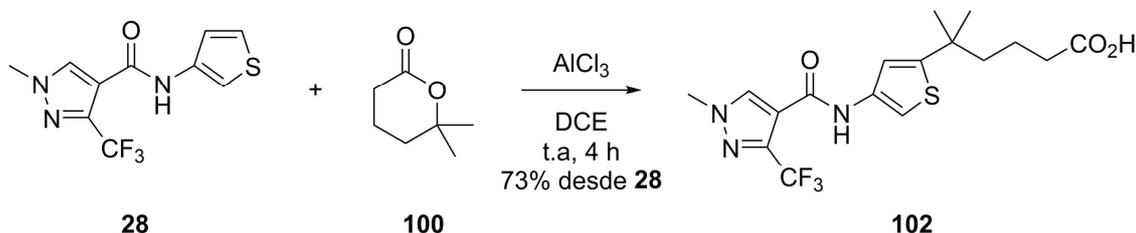
mediante una reacción de alquilación de Friedel–Crafts del compuesto **28** con la 5,5-dimetilvalerolactona (**100**, cuyo nombre sistemático es 6,6-dimetiltetrahidro-2H-piran-2-ona). Para ello, el primer paso fue la obtención de dicha lactona, cuya preparación está descrita en la literatura, entre otros métodos, mediante una oxidación de Baeyer–Villiger a partir de la 2,2-dimetilciclopentan-1-ona (**101**), disponible comercialmente. La reacción se llevó a cabo empleando como agente oxidante ácido trifluoroperacético, generado *in situ* a partir de peróxido de hidrógeno y anhídrido 2,2,2-trifluoroacético (TFAA).<sup>221</sup> La lactona deseada **100** se obtuvo sin complicaciones, aunque con rendimiento moderado (Esquema 3.57).



**Esquema 3.57.** Preparación de la lactona **100** por oxidación de Baeyer–Villiger de la cetona **101**.

Posteriormente, se llevó a cabo la alquilación de Friedel–Crafts del compuesto **28** con el precursor del brazo espaciador recién preparado (**100**), con el propósito de introducir la nueva agrupación de forma regioselectiva en la posición C-2 del anillo de tiofeno. Para ello, se emplearon las mismas condiciones de reacción que en la preparación del hapteno PPO, es decir, se efectuó el proceso a temperatura ambiente utilizando AlCl<sub>3</sub> para activar al electrófilo.<sup>217</sup> La reacción entre el tiofeno **28** y la lactona **100** se produjo sin dificultad para proporcionar, después de la purificación cromatográfica, el correspondiente producto de acilación de Friedel–Crafts. No obstante, y contrariamente a lo inicialmente esperado en base a las reacciones de S<sub>E</sub>Ar análogas efectuadas previamente para la preparación de los haptenos PPa (Esquema 3.42) y PPM (Esquema 3.54), los datos espectroscópicos del producto formado revelaron que la reacción de acilación no se produjo por la posición C-2 del anillo de tiofeno de **28**, sino por la posición C-5 del mismo, conduciendo por lo tanto al compuesto de estructura **102** (Esquema 3.58). El dato espectroscópico más relevante que permitió asignar de manera inequívoca la estructura **102** al compuesto obtenido fue la constante de acoplamiento entre los dos átomos de hidrógeno del anillo de tiofeno en RMN-<sup>1</sup>H, cuyo valor fue de 1.5 Hz. Este valor corresponde al acoplamiento escalar entre los átomos de hidrógeno H-2 y H-4, y es muy diferente a los valores

usuales en torno a 5.5 Hz, propios del acoplamiento entre H-4 y H-5, observados para dicha constante de acoplamiento en el resto de compuestos con anillos de tiofeno 2,3-disustituídos que se sintetizaron en este trabajo.

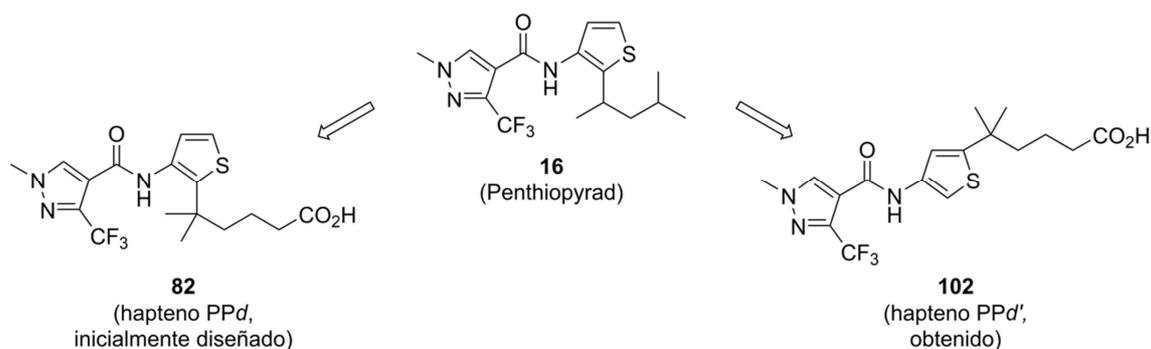


**Esquema 3.58.** Reacción de Friedel-Crafts entre **28** y **100** para proporcionar el compuesto **102**.

El cambio de regioselectividad de esta reacción de acilación del anillo de tiofeno con la lactona **100** respecto a la observada en las reacciones anteriores de  $S_EAr$  utilizando la cetona **29** o el anhídrido **97** como electrófilos, es decir, de C-2 a C-5, es atribuible a la propia naturaleza del electrófilo utilizado en este caso. Teniendo en cuenta que las condiciones empleadas en todos los casos son de control cinético, la explicación más plausible a esta diferencia de comportamiento es el mayor impedimento estérico en la reacción con la lactona **100** debido a la presencia de los dos grupos metilo, que ralentizarían la adición inicial del electrófilo a la posición C-2 respecto a la adición a la posición C-5.

A pesar de que la preparación del compuesto **102** no era la inicialmente planeada, una vez obtenido se decidió emplearlo como hapteno en lugar del compuesto **82** (hapteno *PPd*), renombrándolo consecuentemente como hapteno *PPd'* (Figura 3.11). Aunque lógicamente este hapteno no permitiría lograr el objetivo para el que inicialmente se había diseñado el hapteno *PPd*, la introducción fortuita del brazo espaciador en la posición C-5 del anillo de tiofeno brindaba la posibilidad de investigar la influencia de una mayor heterología del hapteno, tanto en lo que respectaba a la posición del brazo espaciador como al tamaño de su parte más proximal al esqueleto del analito.

En resumen, la preparación del derivado funcionalizado de penthiopyrad nombrado como *PPd'* (**102**) se llevó a cabo a partir de ácido 1-metil-3-(trifluorometil)-1*H*-pirazol-4-carboxílico (**22**) a través de una secuencia sintética de 4 etapas con un 50% de rendimiento global.



**Figura 3.11.** Comparación de las estructuras moleculares del fungicida penthiopyrad (**16**), el hapteno PPD originalmente diseñado (**82**) y el hapteno PPD' finalmente obtenido (**102**).

### 3.3. Preparación de conjugados proteína–hapteno

Una vez obtenidos los derivados funcionalizados de fluopyram y penthiopyrad, el siguiente paso en la preparación de inmunorreactivos fue la conjugación covalente de los haptenos sintetizados a diversas proteínas transportadoras para obtener una colección de conjugados proteína–hapteno, que servirían para la generación de anticuerpos y/o para efectuar los inmunoensayos. Entre las diferentes estrategias de conjugación descritas en la bibliografía,<sup>108</sup> y teniendo en cuenta tanto la funcionalización introducida en el extremo del brazo espaciador de todos los haptenos preparados como el requerimiento de medio acuoso para garantizar la estabilidad de las proteínas, se escogió el método del éster activo,<sup>121</sup> cuyo nombre se debe a la transformación de los haptenos en derivados de mayor reactividad previamente al acoplamiento deseado.

#### 3.3.1. Preparación de ésteres activos

Todos los haptenos fueron diseñados y sintetizados con un grupo carboxilato en el extremo del brazo espaciador, de modo que su conjugación a las proteínas se haría mediante la formación de enlaces amida con los grupos  $\epsilon$ -amino de los residuos de lisina de la proteína. Para poder llevar a cabo el acoplamiento fue necesaria la activación previa de dichos grupos carboxilato mediante derivatización, pero de tal modo que el producto resultante no afectase a la naturaleza de las proteínas durante la reacción de conjugación, como sí podría suceder si el proceso se efectuase a través de los correspondientes cloruros de ácido. La estrategia empleada, descrita

originalmente en 1982 y ampliamente utilizada en química de bioconjugados y de péptidos, se conoce como método del éster activo.<sup>121</sup>

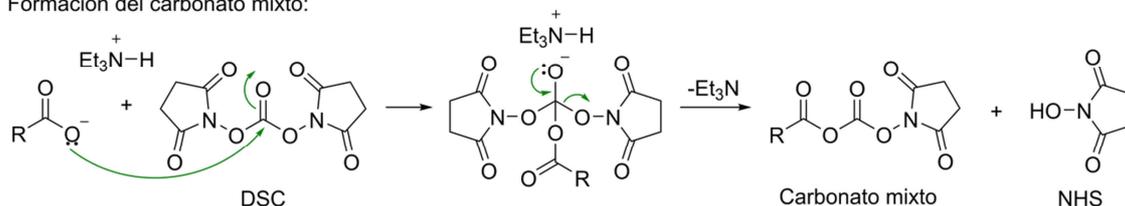
La forma más habitual de preparar un éster activo es el tratamiento del componente carboxílico (el hapteno) con una carbodiimida, como por ejemplo la *N,N'*-diciclohexilcarbodiimida (DCC) o el hidrocloreuro de 1-etil-3-(3,3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC·HCl), y un reactivo nucleofílico capaz de activar el grupo carboxilo frente a otros nucleófilos y que determina el tipo de éster activo, como son la *N*-hidroxisuccinimida (NHS) o el 1-hidroxibenzotriazol (HOBt). En estas condiciones, la adición nucleofílica del ácido a la carbodiimida da lugar a una *O*-acilisourea intermedia, que es atacada después por el reactivo nucleofílico, formándose el éster activo y liberándose una urea como subproducto. Una de las reacciones más frecuentes es la que utiliza la combinación de DCC y NHS, con la que se obtiene un éster activo de *N*-hidroxisuccinimidilo y *N,N'*-diciclohexilurea como subproducto. También es muy habitual la utilización de EDC·HCl en lugar de DCC por dar lugar a una urea soluble en agua.<sup>222</sup> Un ejemplo de reacción de este tipo se muestra más adelante en el Esquema 3.65 (sección 3.6.1).

Las reacciones de conjugación que hacen uso de esta estrategia se efectúan habitualmente sin purificar previamente el éster activo, e incluso en ocasiones tienen lugar mediante su generación *in situ* en presencia de la proteína. Ambas opciones permiten reducir el esfuerzo sintético, pero pueden implicar procesos secundarios no deseados, como son la conjugación de especies diferentes al hapteno, el entrecruzamiento de varias moléculas de proteína, o la competición entre los grupos amino de la proteína y los grupos carboxilato del hapteno por reaccionar con la carbodiimida. Además, este tipo de estrategia requiere preparar los conjugados de inmunización y de ensayo mediante métodos de conjugación diferentes. En cambio, la purificación previa de los ésteres activos permite, además de evitar todos los problemas anteriores, la reducción del gasto de hapteno, la mejora del rendimiento de conjugación, un mayor control de la densidad hapténica final del conjugado y la utilización de un solo procedimiento para la obtención de todos los conjugados, tanto de inmunización como de ensayo. Por ello, para este trabajo se decidió purificar todos los ésteres activos que se preparasen. En este sentido, la formación de *N,N'*-diciclohexilurea al emplear la combinación DCC/NHS constituye un problema, ya que su eliminación total suele ser complicada, mientras que la purificación del éster activo es más sencilla cuando se emplea EDC·HCl/NHS en medio orgánico, puesto que

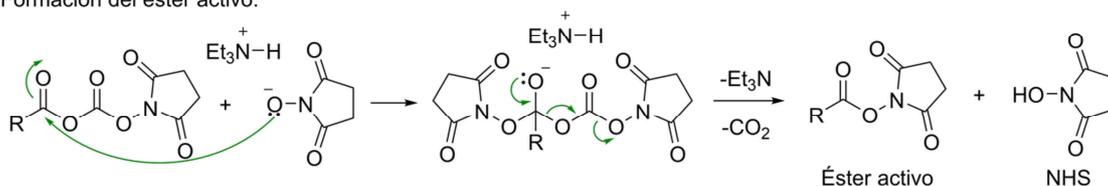
la correspondiente urea puede eliminarse con facilidad mediante lavado con disoluciones acuosas.

En 1979, Ogura y colaboradores describieron una metodología que emplea carbonato de *N,N'*-disuccinimidilo (DSC) y una base débil como trietilamina para preparar ésteres activos de *N*-hidroxisuccinimidilo.<sup>120</sup> La ventaja más relevante de esta estrategia estriba en que los subproductos de esta reacción son únicamente CO<sub>2</sub> y NHS, ésta última soluble en agua y por tanto fácilmente separable por extracción líquido-líquido en el procesado de la reacción, lo cual posibilita una purificación sencilla del éster activo. El mecanismo de reacción para este proceso se resume en el Esquema 3.59.

Formación del carbonato mixto:

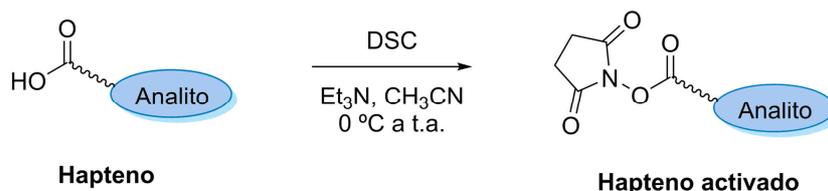


Formación del éster activo:



**Esquema 3.59.** Mecanismo de formación de ésteres activos de *N*-hidroxisuccinimidilo a partir de ácidos carboxílicos empleando DSC y trietilamina.

Con el objetivo de simplificar al máximo la purificación de los haptenos activados, su activación se llevó a cabo siguiendo esta última metodología. De este modo, las reacciones se efectuaron en acetonitrilo en condiciones suaves, lo que dio lugar en todos los casos a los correspondientes haptenos activados en tiempos de 1 a 4 h (Esquema 3.60). El método empleado permitió la fácil purificación cromatográfica de los ésteres activos, que se obtuvieron con elevada pureza y con rendimientos superiores al 80% en la mayoría de los casos, lo que facilitó el control preciso de las relaciones molares de hapteno enlazado a la proteína en los posteriores procesos de conjugación. Debido a su elevada pureza, todos los haptenos activados pudieron ser caracterizados mediante RMN-<sup>1</sup>H, observándose en sus respectivos espectros la aparición de un singlete característico en torno a  $\delta$  2.80 ppm asociado a los cuatro núcleos homotópicos procedentes de la NHS.



**Esquema 3.60.** Preparación de los ésteres de *N*-hidroxisuccinimidilo de los haptenos.

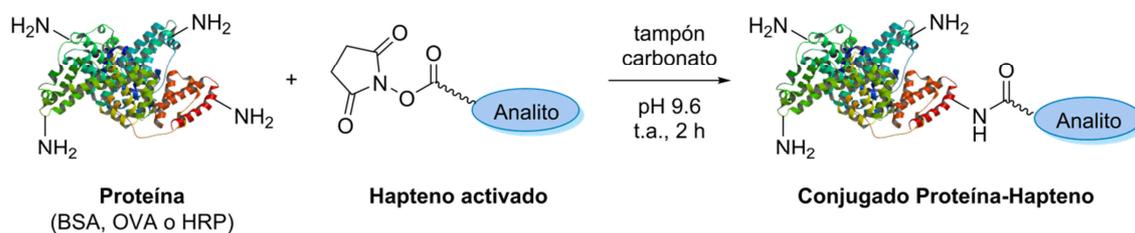
### 3.3.2. Conjugación de haptenos activados a proteínas

A partir de los haptenos activados se prepararon diversos conjugados con proteínas, con o sin actividad enzimática. Por una parte, se obtuvieron conjugados destinados a la generación de anticuerpos. Por otra parte, se prepararon conjugados que se emplearían posteriormente en los inmunoensayos, en concreto un tipo de conjugado para cada uno de los dos formatos de ELISA competitivo propuestos (anticuerpo inmovilizado con detección directa y conjugado inmovilizado con detección indirecta). La proteína empleada en cada caso se escogió en base a la finalidad del conjugado.

Un conjugado de inmunización ideal debe soportar una carga hapténica suficientemente elevada para asegurar la exposición del hapteno al sistema inmunitario del animal pero no tanto como para dar lugar a anticuerpos de baja afinidad, y simultáneamente debe presentar una buena solubilidad en medio acuoso. Por ello, para la preparación de conjugados de inmunización se escogió la seroalbúmina bovina (BSA), una proteína globular de aproximadamente 66 kDa de cadena simple procedente del suero bovino. La estructura primaria de esta proteína cuenta con un gran número de aminoácidos de cadena lateral ionizable, destacando la presencia de 40 residuos de aspartato, 59 residuos de glutamato y 59 residuos de lisina, de modo que su punto isoeléctrico es de 5.1 (carga global negativa a pH neutro). De los 59 grupos  $\epsilon$ -amino de los residuos de lisina, se estima que entre 30 y 35 son accesibles para su derivatización.<sup>223,224</sup>

De este modo, los ésteres activos de los haptenos **FPa (103)**, **FPb (104)**, **PPa (105)**, **PPb (106)** y **PPm (107)** se hicieron reaccionar con BSA para dar lugar a los correspondientes conjugados BSA–hapteno (Esquema 3.61). La reacción se efectuó a pH 9.6 para aumentar la proporción de grupos amino no protonados y elevar así la eficiencia de la conjugación. En todos los casos se empleó una relación molar

hapteno/proteína (RM) inicial de 24:1 para lograr una carga hapténica adecuada, teniendo en cuenta los requisitos anteriormente descritos.



**Esquema 3.61.** Preparación de conjugados proteína–hapteno a partir de haptenos activados como ésteres de *N*-hidroxisuccinimidilo.

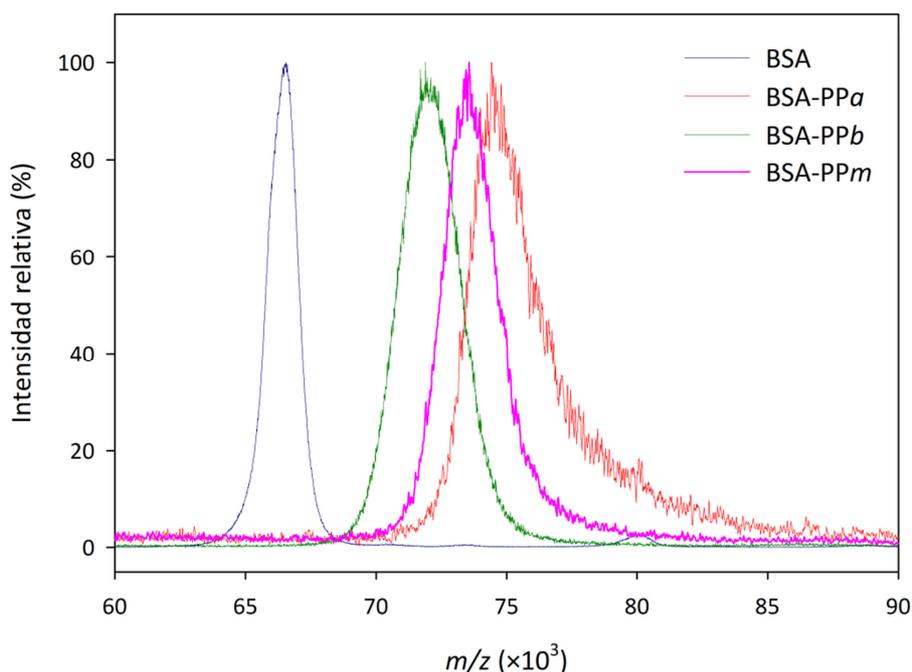
En cuanto a los conjugados de ensayo para el formato indirecto (conjugados de tapizado), es deseable que presenten características similares de solubilidad a las del conjugado de inmunización, pero con una carga hapténica más bien reducida para evitar una unión excesiva de los anticuerpos al conjugado, que se traduciría en una menor afinidad aparente de éstos por el analito, pero suficiente para obtener señales elevadas con concentraciones moderadas de anticuerpo. Además, es importante que la proteína sea distinta a la del conjugado de inmunización, de lo contrario los anticuerpos podrían reconocer a la proteína en lugar del hapteno. Todos estos requisitos llevaron a la selección de ovoalbúmina (OVA) como proteína para la obtención de conjugados de tapizado. La OVA es una albúmina de aproximadamente 44.3 kDa de cadena simple con alta presencia en la clara de huevo de gallina, que presenta un punto isoeléctrico de 4.63 (carga neta negativa a pH neutro) debido, como en el caso de la BSA, al gran número de residuos de glutamato y aspartato en su estructura primaria (33 y 14, respectivamente). Además, en lo que respecta a la conjugación, la cadena polipeptídica de OVA contiene 20 residuos de lisina.<sup>223,225</sup>

La preparación de conjugados de tapizado OVA–hapteno se efectuó siguiendo la misma metodología utilizada para los conjugados de inmunización, partiendo para ello de los mismos haptenos activados que en el caso anterior y también de los ésteres activos de los haptenos *FPha'* (**108**), *FPhb* (**109**), *PPd'* (**110**) y *PPo* (**111**). Sin embargo, en este caso la RM inicial fue de 8:1 con el fin de lograr una carga hapténica más reducida (Esquema 3.61).

Finalmente, se prepararon los conjugados que se emplearían en los ensayos en formato directo, con función de trazadores enzimáticos. Como sucede en el formato indirecto, es conveniente que el trazador posea una carga hapténica reducida para

lograr un reconocimiento suficiente pero no excesivo del conjugado por parte de los anticuerpos. Además, es esencial que la actividad enzimática no se vea disminuida tras la conjugación. La enzima escogida para la preparación de los trazadores enzimáticos fue la peroxidasa de rábano picante (HRP), una glicoproteína de aproximadamente 44 kDa procedente de *Armoracia rusticana* que contiene 6 residuos de lisina, de los cuales 4 son accesibles.<sup>226</sup> Esta enzima presenta una elevada actividad específica, es muy resistente y económica, y es utilizada habitualmente con la misma finalidad en otras técnicas que hacen uso de anticuerpos, como inmunohistoquímica y Western Blot, por su capacidad de catalizar la oxidación con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> de ciertos sustratos para generar color o luminiscencia.

De este modo, la preparación de trazadores enzimáticos HRP–hapteno se llevó a cabo con todos los haptenos sintetizados para fluopyram y penthiopyrad siguiendo la metodología descrita para los otros dos tipos de conjugados, pero utilizando en este caso una RM inicial de 10:1 (Esquema 3.61).



**Figura 3.12.** Espectros de masas superpuestos de la proteína BSA y de los conjugados BSA–PP $\alpha$ , BSA–PP $b$  y BSA–PP $m$  obtenidos mediante MALDI–TOF en un mismo experimento. La conjugación puede apreciarse por el incremento del promedio de la distribución de valores de  $m/z$  respecto a la de la BSA.

Una vez finalizados los acoplamientos, todos los conjugados preparados fueron purificados mediante cromatografía de exclusión molecular. Posteriormente, se cuantificó la densidad hapténica de los conjugados mediante espectrometría de masas de desorción-ionización láser asistida por matriz con detector de tiempo de vuelo, método más conocido como MALDI-TOF, por sus siglas en inglés. Los valores se calcularon a partir del peso molecular del hapteno y del incremento de peso del conjugado respecto a la correspondiente proteína sin derivatizar usada como control en la misma determinación. Dicho incremento es claramente visible al superponer los diferentes espectros, como se muestra a modo de ejemplo en la Figura 3.12 para algunos conjugados derivados de haptenos de penthiopyrad. El procedimiento de cálculo se detalla en la sección 5.5.3, los espectros se pueden consultar en el Anexo II, y los resultados obtenidos se recogen en la Tabla 3.1.

**Tabla 3.1.** Valores promedio de las relaciones molares hapteno/proteína de conjugados preparados con haptenos de fluopyram y penthiopyrad.<sup>a</sup>

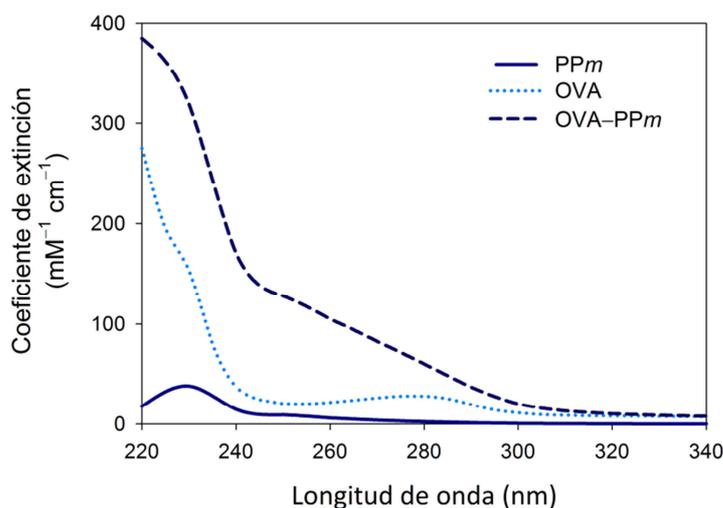
Hapteno	Proteína de conjugación <sup>b</sup>		
	BSA	HRP	OVA
FPa	16 (23)	1 (5)	3.5 (17)
FPb	16.5 (16)	1.5 (6)	1.5 (11)
FPha'	- <sup>b</sup>	1.5	4.5
FPhb	-	1.5	4.5
PPa	19.5 (19)	3 (4)	1 (9)
PPb	15 (19)	3 (5)	2 (20)
PPm	18 (18)	1 (3)	4 (15)
PPd'	-	2 (5)	8 (13)
PPo	-	2.5 (5)	8 (10)

<sup>a</sup> Los valores se determinaron mediante MALDI-TOF. Entre paréntesis se incluyen los valores determinados mediante espectroscopía UV/vis. <sup>b</sup> No se preparó conjugado para esta combinación de proteína y hapteno.

Todos los conjugados presentaron densidades hapténicas coherentes con la proporción de hapteno añadida inicialmente y con la cantidad de residuos de lisina accesibles en cada proteína. Los conjugados BSA-hapteno presentaron valores de RM en torno a 17, siendo por tanto valores adecuados para desempeñar la función de conjugados de inmunización. En cuanto a los conjugados HRP-hapteno, en ningún caso presentaron más de 3 moléculas de hapteno por molécula de enzima, y como se discutirá más adelante, todos ellos mantuvieron la actividad enzimática

correctamente. Por último, la mayoría de los conjugados OVA–hapteno presentaron valores de RM inferiores a 5, siendo por tanto adecuados para los ensayos competitivos. Según se desprende de los resultados de MALDI–TOF, los conjugados OVA–PPd' y OVA–PPo incorporaron la mayor parte del hapteno utilizado inicialmente, dando lugar así a una carga hapténica algo superior a lo deseable. En cualquier caso, todos los resultados indicaron que las conjugaciones se llevaron a cabo exitosamente con valores óptimos de RM.

Adicionalmente, la carga de hapteno de la mayor parte de los conjugados fue estimada mediante un método espectrofotométrico, haciendo uso de los espectros UV/vis de haptenos, proteínas y conjugados. En este método, se asume que la conjugación no modifica significativamente los coeficientes de extinción de hapteno y proteína, por lo que la absorbancia del conjugado proteína–hapteno a una longitud de onda dada puede considerarse como la suma de las absorbancias de ambas especies sin enlazar (ver Figura 3.13). Mediante esta aproximación, y conociendo previamente los coeficientes de extinción de los dos componentes, se puede plantear un sistema de ecuaciones para obtener las concentraciones de proteína y hapteno en el conjugado, y a partir de ellas el valor de RM. El procedimiento de cálculo se detalla en la sección 5.5.3, y los resultados obtenidos se incluyen en la Tabla 3.1.



**Figura 3.13.** Espectros de absorción UV/vis superpuestos del hapteno PPm (línea continua), la proteína OVA (línea punteada) y el conjugado OVA–PPm (línea discontinua), en los que puede apreciarse la modificación del espectro de la proteína tras la conjugación. Los espectros se han representado como variación del coeficiente de extinción molar con la longitud de onda para facilitar su comparación.

Los resultados obtenidos mediante el método espectrofotométrico para los conjugados BSA–hapteno y la mayoría de conjugados HRP–hapteno fueron bastante similares a los que proporcionó MALDI–TOF. Sin embargo, los valores hallados para el resto de los trazadores enzimáticos y para gran parte de los conjugados OVA–hapteno discreparon significativamente de los valores determinados mediante espectrometría de masas. Si se tiene en cuenta la proporción inicial de hapteno en las reacciones de conjugación (8 equivalentes), ninguno de los valores estimados para los conjugados basados en OVA tuvieron sentido físico. Resultados de este tipo son habituales cuando se emplea esta técnica, puesto que constituye un método aproximado y no se tiene la certeza de que los coeficientes de extinción no se vean afectados por la conjugación, además del hecho de que los haptenos presentaron muy baja o nula absorción a las longitudes de onda estudiadas (260 y 280 nm). En cualquier caso, el método espectrofotométrico constituye una forma rápida de comprobar cualitativamente si la conjugación ha tenido o no lugar.

### 3.4. Generación y evaluación de anticuerpos policlonales

Con los conjugados BSA–hapteno preparados se abordó la generación de anticuerpos policlonales (pAbs) específicos para los fungicidas fluopyram y penthiopyrad mediante inmunización de conejos de laboratorio. Esta tarea se consideró conveniente dado que, además de que su obtención es sencilla, constituyen un reflejo directo de la respuesta inmunitaria del animal a un determinado inmunógeno, lo que permite establecer una correlación entre la estructura del hapteno y las características de los anticuerpos generados. En particular, para esta Tesis Doctoral los pAbs se obtuvieron con el objetivo de estudiar la influencia de la posición del brazo espaciador de los haptenos de fluopyram y penthiopyrad en la obtención de anticuerpos de elevada afinidad y especificidad para dichas moléculas.

#### 3.4.1. **Generación de anticuerpos policlonales**

Dado que un pAb es un reactivo limitado y difícil de reproducir, es conveniente emplear un sistema animal que permita obtener una cantidad importante de suero, y por tanto que posea una volemia elevada. Por ello, se escogió al conejo como sistema animal, en particular los de raza New Zealand de pelo blanco, que se caracteriza por producir elevadas respuestas a inmunógenos y anticuerpos de elevada afinidad hacia

haptenos. Además, son animales dóciles y fáciles de manipular, y el coste de la estabulación es aceptable.

La inmunización de los conejos se llevó a cabo por inyección subcutánea de los conjugados BSA–hapteno a dosis fijas cada 3 semanas, administrando un total de 4 dosis a cada animal. Transcurridos diez días desde la última inmunización, los animales fueron exsanguinados, recogiendo cerca de 100 mL de sangre de cada animal, y tras separar el suero del coágulo por centrifugación y posteriormente purificar parcialmente las inmunoglobulinas presentes por fraccionamiento salino, se obtuvieron los pAbs deseados. Del mismo modo, diez días después de la tercera inmunización se extrajeron muestras de 5–10 mL de sangre de cada animal y se analizaron mediante ELISA competitivo para asegurar la correcta evolución de la respuesta inmunitaria (resultados no mostrados).

Para la generación de este tipo de anticuerpos se emplearon todos los conjugados BSA–hapteno preparados, dos de fluopyram y tres de penthiopyrad, de modo que cada uno fue inoculado en dos animales. Por tanto, se obtuvo un total de 4 pAbs para fluopyram y 6 para penthiopyrad, enumerados en la Tabla 3.2. Cada anticuerpo fue nombrado de acuerdo con el hapteno del conjugado empleado como inmunógeno, seguido de una cifra para diferenciarlos asignada arbitrariamente (#1 o #2).

**Tabla 3.2.** Anticuerpos policlonales para fluopyram y penthiopyrad obtenidos tras la inmunización de conejos con conjugados BSA–hapteno.

Inmunógeno	Anticuerpos obtenidos
BSA–FPa	FPa#1, FPa#2
BSA–FPb	FPb#1, FPb#2
BSA–PPa	PPa#1, PPa#2
BSA–PPb	PPb#1, PPb#2
BSA–PPm	PPm#1, PPm#2

### 3.4.2. Evaluación de la afinidad de los anticuerpos policlonales

La estimación de la afinidad de los pAbs generados hacia sus respectivos analitos, es decir, la tendencia a la formación de complejos anticuerpo/analito, se evaluó mediante ensayos de tipo ELISA competitivo en dos formatos distintos. Por una parte, se efectuaron ensayos en formato de anticuerpo inmovilizado con detección directa, en los que el reconocimiento del analito se produjo sobre la superficie del soporte

sólido recubierta por el anticuerpo, y el conjugado de competición del ensayo incorporó la marca enzimática. Por otra parte, se efectuaron ensayos en formato de conjugado inmovilizado con detección indirecta, en los que la interacción anticuerpo/analito tuvo lugar en disolución y la marca enzimática se introdujo por adición de un anticuerpo secundario, capaz de reconocer el anticuerpo específico retenido en la superficie del pocillo tras la etapa de competición. La afinidad de los anticuerpos por el analito en ambos casos se estimó como el valor de  $IC_{50}$ , que corresponde a la concentración de analito que reduce a la mitad la señal máxima del ensayo ( $A_{m\acute{a}x}$ ) mediante la inhibición de la formación del complejo anticuerpo/conjugado.

Dado que las reacciones en equilibrio de reconocimiento molecular con anticuerpos se caracterizan generalmente por constantes de asociación muy elevadas, la determinación de la afinidad debe llevarse a cabo con concentraciones pequeñas de anticuerpo, conjugado y analito. En un principio no se conocen los valores idóneos, por lo que es habitual llevar a cabo una optimización inicial de las concentraciones de anticuerpo y analito mediante ensayos de titulación sin analito y después evaluar la afinidad frente al analito en las condiciones optimizadas. Para aunar ambos pasos en un solo ensayo, se llevaron a cabo ELISA competitivos bidimensionales, en los que se varió simultáneamente la concentración de anticuerpo y de conjugado, y para cada combinación de inmunorreactivos se determinó la  $IC_{50}$  empleando una curva estándar completa de analito. Además, los ensayos se llevaron a cabo empleando conjugados tanto homólogos (derivados del mismo hapteno que se había empleado en la inmunización) como heterólogos (derivados de un hapteno diferente), lo que permitió en el primer caso establecer correlaciones entre la respuesta inmunitaria y las estructuras de los haptenos, y en el segundo caso estudiar los grupos funcionales inmunodeterminantes en la interacción anticuerpo/conjugado y sobretodo propiciar el aumento de la sensibilidad de los inmunoensayos.

### *3.4.2.1. Formato de anticuerpo inmovilizado con detección directa*

Los ensayos se llevaron a cabo en microplacas de poliestireno de 96 pocillos (8×12), empleando diluciones  $1/3 \cdot 10^3$ ,  $1/10^4$  y  $1/3 \cdot 10^4$  de pAb para el recubrimiento inicial de las superficies de los pocillos y concentraciones de trazador enzimático de 10, 30, 100 y 300 ng/mL para la competición con el analito. Las 12 combinaciones resultantes se situaron en cada una de las 12 columnas de la placa, y en todas ellas se ensayó una

curva estándar de analito compuesta por 7 patrones (preparados por dilución en serie del primer patrón a 10  $\mu\text{M}$  con un factor de dilución de 10) y un blanco. Entre las 12 curvas obtenidas para cada par anticuerpo/conjugado, se escogió aquella con el menor valor de  $\text{IC}_{50}$  y cuyo valor de  $A_{\text{máx}}$  fuese superior a 0.8 y lo más cercano posible a la unidad.

De este modo, en primer lugar se llevó a cabo la caracterización de los pAbs generados para fluopyram frente a los trazadores enzimáticos basados en los cuatro haptenos preparados (HRP-FP*a*, HRP-FP*b*, HRP-FP*ha'* y HRP-FP*hb*). Las condiciones óptimas de inmunorreactivos y los valores de  $\text{IC}_{50}$  obtenidos para cada par anticuerpo/trazador se muestran en la Tabla 3.3.

**Tabla 3.3.** Caracterización de los anticuerpos policlonales obtenidos para fluopyram mediante ELISA competitivo bidimensional en formato directo con conjugados homólogos y heterólogos.<sup>a</sup>

pAb	Trazador enzimático											
	HRP-FP <i>a</i>			HRP-FP <i>b</i>			HRP-FP <i>ha'</i>			HRP-FP <i>hb</i>		
	[pAb] <sup>b</sup>	[HRP] <sup>c</sup>	$\text{IC}_{50}$ <sup>d</sup>	[pAb]	[HRP]	$\text{IC}_{50}$	[pAb]	[HRP]	$\text{IC}_{50}$	[pAb]	[HRP]	$\text{IC}_{50}$
FP <i>a</i> #1	<b>10</b>	<b>100</b>	<b>6.53</b>	3	300	- <sup>e</sup>	3	300	-	3	300	-
FP <i>a</i> #2	<b>10</b>	<b>30</b>	<b>3.62</b>	3	300	-	3	300	1.77	3	300	-
FP <i>b</i> #1	3	300	-	<b>10</b>	<b>30</b>	<b>5.67</b>	3	300	-	10	100	1.69
FP <i>b</i> #2	3	300	-	<b>10</b>	<b>10</b>	<b>6.10</b>	3	300	-	10	30	1.59

<sup>a</sup> Los valores de  $\text{IC}_{50}$  son la media de tres determinaciones independientes. Los valores de  $A_{\text{máx}}$  estuvieron entre 0.8 y 1.5. Las combinaciones homólogas se han resaltado en negrita. <sup>b</sup> Factor de dilución del anticuerpo  $\times 10^{-3}$ . <sup>c</sup> Concentración de conjugado de HRP expresada en ng/mL. <sup>d</sup> Valores expresados en nM. <sup>e</sup> No se obtuvo señal.

El primer resultado destacable es que todos los anticuerpos generados fueron capaces de reconocer al menos su conjugado homólogo, y por tanto que los dos inmunógenos utilizados fueron capaces de inducir respuesta inmunitaria. Para los cuatro pAbs, los títulos obtenidos (dilución óptima de los anticuerpos) fueron iguales en este caso. Además, los valores de  $\text{IC}_{50}$  de los anticuerpos preparados con el mismo inmunógeno fueron similares, lo que indica que la respuesta inmunitaria fue reproducible. Todos los valores de  $\text{IC}_{50}$  observados se situaron en el rango nanomolar de unidades, lo que refleja una elevada afinidad hacia fluopyram. Por otra parte, al comparar la  $\text{IC}_{50}$  de los anticuerpos obtenidos con inmunógenos distintos no se observó una diferencia significativa en la afinidad, a pesar de que en teoría cada uno

de ellos expuso la estructura del fungicida desde una orientación opuesta a la del otro (Figura 3.2, sección 3.1.1). Estos resultados sugieren que ambos inmunógenos serían en principio igualmente idóneos para inducir una buena respuesta inmunitaria y obtener anticuerpos de elevada afinidad hacia fluopyram. Las posiciones del brazo espaciador escogidas en el diseño de los haptenos (en posición *para* respecto al mayor sustituyente de cada anillo) parecen ser equivalentes para una molécula como fluopyram, cuyos determinantes antigénicos más importantes (dos agrupaciones aromáticas: un grupo carbamoilfenilo y un anillo de cloropiridina) están situados en los extremos de un puente de etileno.

En cuanto al uso de conjugados heterólogos, éstos no fueron generalmente reconocidos por los pAbs generados, como es habitual en este formato de ensayo. Los anticuerpos derivados del hapteno FP*a* no reconocieron los haptenos con el brazo espaciador en posición opuesta (FP*b* y FP*hb*), y tan solo uno de ellos (combinación FP*a*#2/HRP-FP*ha'*) reconoció el hapteno heterólogo con posición homóloga del espaciador. Sin embargo, fue necesario utilizar elevadas concentraciones de inmunorreactivos (dilución  $1/3 \cdot 10^3$  de anticuerpo y 300 ng/mL de trazador), lo que refleja un reconocimiento limitado del conjugado. Teniendo en cuenta la estructura del hapteno FP*ha'* (**72**, Esquema 3.29), con el grupo trifluorometilo del anillo homoaromático (anillo b) en una posición distinta a la de fluopyram (**1**), estos resultados indican que la posición de dicho grupo es esencial para el reconocimiento del fungicida, en coherencia con el principio de Landsteiner. Además, la eliminación de los átomos de flúor en la posición de anclaje del brazo espaciador altera la densidad electrónica del anillo de piridina (anillo a), lo que también podría contribuir a la falta de reconocimiento.

Como era de esperar, los anticuerpos derivados del hapteno FP*b* tampoco reconocieron los trazadores con posición heteróloga del brazo espaciador del hapteno (FP*a* y FP*ha'*). En cambio, ambos anticuerpos sí fueron capaces de reconocer eficazmente el conjugado heterólogo con posición homóloga del brazo espaciador (HRP-FP*hb*), siendo posible mantener la dilución de anticuerpo a cambio de incrementar ligeramente las concentraciones de trazador respecto a los ensayos homólogos. Es decir, la eliminación del grupo trifluorometilo del anillo b (Figura 3.2, sección 3.1.1) redujo ligeramente la afinidad de estos anticuerpos hacia el trazador, probablemente a causa de la modificación en la densidad electrónica de dicho anillo

que supone la eliminación del grupo trifluorometilo. Este resultado evidencia de nuevo la importancia de este grupo funcional en el reconocimiento molecular.

En todos los casos en los que hubo reconocimiento de trazadores heterólogos fue posible lograr una mejora de la sensibilidad de los ensayos homólogos. Así, la sensibilidad observada con el pAb FP $\alpha$ #2 se duplicó cuando se utilizó el conjugado heterólogo HRP-FP $\alpha$ '', mientras que el aumento de sensibilidad fue de 3 a 4 veces en el caso de los pAbs FP $b$ #1 y FP $b$ #2 frente al trazador HRP-FP $b$ . De este modo, el ensayo más sensible para fluopyram resultó de combinar el pAb FP $b$ #2 diluido 10<sup>4</sup> veces y el trazador HRP-FP $b$  a 30 ng/mL, y se caracterizó por un valor de IC<sub>50</sub> de 1.59 nM.

**Tabla 3.4.** Caracterización de los anticuerpos policlonales obtenidos para penthiopyrad mediante ELISA competitivo bidimensional en formato directo con conjugados homólogos y heterólogos.<sup>a</sup>

pAb <sup>b</sup>	Trazador enzimático									
	HRP-PP $\alpha$		HRP-PP $b$		HRP-PP $m$		HRP-PP $d'$		HRP-PP $o$	
	[HRP] <sup>c</sup>	IC <sub>50</sub> <sup>d</sup>	[HRP]	IC <sub>50</sub>	[HRP]	IC <sub>50</sub>	[HRP]	IC <sub>50</sub>	[HRP]	IC <sub>50</sub>
PP $\alpha$ #1	<b>10</b>	<b>4.39</b>	300	- <sup>e</sup>	100 <sup>f</sup>	1.44	300	-	300	-
PP $\alpha$ #2	<b>10</b>	<b>4.73</b>	300 <sup>f</sup>	1.22	100 <sup>f</sup>	1.01	300	-	300	-
PP $b$ #1	100 <sup>f</sup>	13.79	<b>100<sup>f</sup></b>	<b>5.00</b>	300	-	300	-	300	-
PP $b$ #2	100 <sup>f</sup>	6.74	<b>30<sup>f</sup></b>	<b>2.55</b>	300	-	300	-	300 <sup>f</sup>	8.34
PP $m$ #1	10	2.39	100	0.83	<b>30</b>	<b>1.37</b>	300	-	300	-
PP $m$ #2	10	1.97	30	0.44	<b>30</b>	<b>1.33</b>	300	-	100	1.06

<sup>a</sup> Los valores de IC<sub>50</sub> son la media de tres determinaciones independientes. Los valores de A<sub>máx</sub> estuvieron entre 0.8 y 1.5. Las combinaciones homólogas se han resaltado en negrita. <sup>b</sup> Salvo que se indique otro valor, en el tapizado se empleó un factor de dilución de anticuerpo de 10<sup>4</sup>. <sup>c</sup> Concentración de conjugado de HRP expresada en ng/mL. <sup>d</sup> Valores expresados en nM. <sup>e</sup> No se obtuvo señal. <sup>f</sup> Se empleó un factor de dilución de anticuerpo de 3·10<sup>3</sup>.

De igual modo, se caracterizaron los pAbs generados para penthiopyrad mediante ELISA competitivo bidimensional frente a los cinco trazadores preparados (HRP-PP $\alpha$ , HRP-PP $b$ , HRP-PP $m$ , HRP-PP $d'$  y HRP-PP $o$ ). Los resultados, que se muestran en la Tabla 3.4, indican que los inmunógenos basados en los haptenos PP $\alpha$ , PP $b$  y PP $m$  cumplieron el propósito de generar anticuerpos de elevada afinidad para penthiopyrad, observándose un buen reconocimiento del conjugado homólogo en todos ellos (títulos de 10<sup>4</sup> para los anticuerpos de tipos PP $\alpha$  y PP $m$  y de 3·10<sup>3</sup> para los

de tipo *PPb*) y excelentes valores de  $IC_{50}$  para la interacción con el fungicida, inferiores a 5 nM. De nuevo, la variabilidad entre animales inmunizados con el mismo inmunógeno fue mínima, observándose únicamente una cierta disparidad entre los dos conejos inmunizados con el conjugado *BSA-PPb*. En cuanto a la relación de la respuesta inmunitaria con la estructura del hapteno inmunizante, se observó una afinidad mayor en los anticuerpos derivados del hapteno *PPm*. Esta observación puede explicarse teniendo en cuenta la mayor similitud estructural de este hapteno con penthiopyrad (Figura 3.8, sección 3.2.1), ya que el fragmento 4-metilpentan-2-ilo del fungicida hace las veces de brazo espaciador en el hapteno, lo que indica que la parte del brazo espaciador más cercana al anillo de tiofeno es importante en la interacción con estos anticuerpos.

En cuanto al uso de conjugados heterólogos, todos los anticuerpos fueron capaces de reconocer al menos un conjugado heterólogo. Ningún anticuerpo respondió al trazador *HRP-PPd'*, que presentaba heterología de posición del brazo espaciador y heterología de posición de los sustituyentes metilo de la cadena alifática característica de penthiopyrad (Figura 3.11, sección 3.2.5). Probablemente esta ausencia de reconocimiento se debe a que la conformación del hapteno *PPd'* debe de ser distinta a la de los haptenos inmunizantes debido a la posición del brazo espaciador sobre el anillo de tiofeno. Por su parte, el trazador *HRP-PPo* únicamente fue reconocido por los pAbs *PPb#2* y *PPm#2*, siendo necesario aumentar la concentración de uno de los inmunorreactivos. En este caso el hapteno presenta una densidad electrónica en el anillo de tiofeno claramente diferente a la de los tres haptenos inmunizantes. Por otro lado, todos los pAbs reconocieron el conjugado *HRP-PPa*, incluso los anticuerpos de tipos *PPb* y *PPm*, cuyos haptenos homólogos presentan el brazo espaciador en posición opuesta, y casi todos reconocieron el trazador *HRP-PPb*. Del mismo modo, el trazador *HRP-PPm* fue reconocido por los pAbs de tipo *PPa*, si bien a costa de incrementar diez veces la concentración de trazador y tres veces la concentración de anticuerpo respecto a los ensayos homólogos. Estos resultados parecen indicar que la localización del brazo espaciador en una posición opuesta con respecto a la homóloga es un impedimento menor para el reconocimiento que si la posición es homóloga o heteróloga proximal pero con alteraciones adicionales causadas por el espaciador, como cambios en la conformación o en la densidad electrónica.

Por otro lado, los anticuerpos derivados del hapteno *PPm* aparentemente reconocen al menos la parte del brazo espaciador más cercana al anillo de tiofeno, de

modo que la eliminación de la ramificación de la cadena en el hapteno *PPb* propiciaría un reconocimiento posible pero menos intenso del conjugado HRP-*PPb*. Siguiendo este mismo razonamiento, la ausencia de reconocimiento del trazador HRP-*PPm* por parte de los anticuerpos derivados del hapteno *PPb* se explicaría por la existencia de ramificación en el brazo espaciador del hapteno *PPm*, de manera que la cavidad de los anticuerpos no estaría preparada para albergar los grupos metilo adicionales, inexistentes durante la inmunización con el hapteno *PPb*.

Con los anticuerpos derivados del hapteno *PPa* se observó una mejora de la sensibilidad del ensayo de entre 3 y 5 veces utilizando el trazador HRP-*PPm*. Sin embargo, el uso de conjugados heterólogos no permitió mejorar la sensibilidad de los inmunoensayos con anticuerpos obtenidos por inmunización con el conjugado BSA-*PPb*. Finalmente, los ensayos más sensibles, con valores de  $IC_{50}$  excelentes de orden subnanomolar, se obtuvieron con los anticuerpos de tipo *PPm* en combinación con el trazador HRP-*PPb*, indicando la importancia de la cadena alifática para el reconocimiento de penthiopyrad. En definitiva, el ensayo más sensible para penthiopyrad resultó de combinar el pAb *PPm*#2 diluido  $3 \cdot 10^3$  veces y el trazador HRP-*PPb* a 30 ng/mL, con el que se obtuvo un excelente valor de  $IC_{50}$  de 0.44 nM.

En la Tabla 3.5 se muestran los diferentes parámetros de los mejores ensayos obtenidos para todos los pAbs generados para los dos fungicidas de estudio. Las concentraciones de inmunorreactivos se fijaron para obtener valores de  $A_{m\acute{a}x}$  en torno a la unidad. Con la excepción del anticuerpo *FPa*#1, todos los inmunoensayos seleccionados mostraron excelentes valores de  $IC_{50}$  inferiores a 5 nM, y en algunos casos incluso por debajo de 1 nM. En la Tabla 3.5 se indican también los valores de la pendiente de la curva en el punto de inflexión (ver Figura 1.17, sección 1.4.1.1). Considerando la finalidad de la curva estándar en los inmunoensayos, en la práctica se suele considerar óptimo un valor de pendiente próximo a la unidad, de modo que sea lo suficientemente elevada como para facilitar determinaciones precisas pero no tanto como para dar lugar a un rango de trabajo demasiado estrecho. En los inmunoensayos seleccionados, la mayoría de las pendientes se situaron entre -0.6 y -0.8, valores típicos para pAbs que reflejaron su respuesta promediada frente al analito. No obstante, la pendiente fue algo superior en los ensayos con anticuerpos derivados de los haptenos *PPa* y *PPm*, y en especial en el inmunoensayo más sensible para penthiopyrad, con un valor de -1.31.

**Tabla 3.5.** Concentraciones óptimas de inmunorreactivos y parámetros de las curvas de los mejores ensayos en formato directo obtenidas con cada anticuerpo policlonal de fluopyram y penthiopyrad.<sup>a</sup>

pAb	[pAb] <sup>c</sup>	Trazador enzimático	[HRP] <sup>d</sup>	Parámetros de la curva <sup>b</sup>		
				A <sub>máx</sub>	Pendiente <sup>e</sup>	IC <sub>50</sub> (nM)
FPa#1	10	HRP-FPa	100	0.99 ± 0.11	-0.62 ± 0.06	6.53 ± 1.80
FPa#2	10	HRP-FPa	30	0.87 ± 0.13	-0.78 ± 0.04	3.62 ± 0.31
FPb#1	10	HRP-FPhb	100	0.82 ± 0.08	-0.79 ± 0.05	1.69 ± 0.30
<b>FPb#2</b>	<b>10</b>	<b>HRP-FPhb</b>	<b>30</b>	<b>1.01 ± 0.11</b>	<b>-0.68 ± 0.02</b>	<b>1.59 ± 0.02</b>
PPa#1	3	HRP-PPm	100	0.89 ± 0.23	-1.06 ± 0.21	1.44 ± 0.26
PPa#2	3	HRP-PPm	100	1.03 ± 0.17	-1.07 ± 0.30	1.01 ± 0.32
PPb#1	3	HRP-PPb	100	1.02 ± 0.35	-0.72 ± 0.06	5.00 ± 1.13
PPb#2	3	HRP-PPb	30	1.02 ± 0.34	-0.76 ± 0.03	2.55 ± 0.09
PPm#1	10	HRP-PPb	100	0.89 ± 0.04	-0.92 ± 0.11	0.83 ± 0.09
<b>PPm#2</b>	<b>10</b>	<b>HRP-PPb</b>	<b>30</b>	<b>0.92 ± 0.18</b>	<b>-1.31 ± 0.46</b>	<b>0.44 ± 0.17</b>

<sup>a</sup> En negrita se ha resaltado el ensayo más sensible para cada fungicida. <sup>b</sup> Los valores se expresan como media y desviación estándar de tres determinaciones independientes. Los valores de absorbancia mínima (A<sub>min</sub>) fueron siempre inferiores a 0.05. <sup>c</sup> Factor de dilución del anticuerpo ×10<sup>-3</sup>. <sup>d</sup> Concentración de conjugado de HRP expresada en ng/mL. <sup>e</sup> Pendiente de la curva en el punto de inflexión.

#### 3.4.2.2. Formato de conjugado inmovilizado con detección indirecta

En este formato de ensayo, efectuado igualmente en microplacas de poliestireno de 96 pocillos, se ensayaron concentraciones de conjugado OVA-hapteno de 100 y 1000 ng/mL para el recubrimiento de los pocillos y diluciones 1/10<sup>3</sup>, 1/3·10<sup>3</sup>, 1/10<sup>4</sup>, 1/3·10<sup>4</sup>, 1/10<sup>5</sup> y 1/3·10<sup>5</sup> de pAb para la competición con el analito. Esto dio lugar igualmente a 12 combinaciones de concentraciones de inmunorreactivos para evaluar la afinidad de los anticuerpos frente a sus respectivos analitos, lo cual se llevó a cabo del mismo modo que en el formato directo. En primer lugar, se evaluó la afinidad de los pAbs para fluopyram frente a los cuatro conjugados de tapizado preparados (OVA-FPa, OVA-FPb, OVA-FPha' y OVA-FPhb), obteniéndose los resultados recogidos en la Tabla 3.6.

Al igual que sucedió en el formato directo, todos los anticuerpos generados fueron capaces de reconocer el conjugado homólogo con elevados títulos y de dar lugar a ensayos con valores de IC<sub>50</sub> en el rango nanomolar, indicando de nuevo la idoneidad de los haptenos utilizados. Sin embargo, en este formato se apreció una mayor sensibilidad en los ensayos homólogos con anticuerpos derivados del hapteno FPb,

reflejada en valores de  $IC_{50}$  de 2 a 6 veces menores respecto a los ensayos homólogos con anticuerpos generados a partir del conjugado BSA-FP $\alpha$ . Además, estos últimos anticuerpos mostraron una cierta disparidad en el reconocimiento del fungicida, como ya se observó en el formato directo, cosa que no sucedió con los anticuerpos derivados del hapteno FP $b$ .

**Tabla 3.6.** Caracterización de los anticuerpos policlonales obtenidos para fluopyram mediante ELISA competitivo bidimensional en formato indirecto con conjugados homólogos y heterólogos.<sup>a</sup>

pAb	Conjugado de tapizado											
	OVA-FP $\alpha$			OVA-FP $b$			OVA-FP $\alpha'$			OVA-FP $hb$		
	[pAb] <sup>b</sup>	[OVA] <sup>c</sup>	$IC_{50}$ <sup>d</sup>	[pAb]	[OVA]	$IC_{50}$	[pAb]	[OVA]	$IC_{50}$	[pAb]	[OVA]	$IC_{50}$
FP $\alpha$ #1	<b>30</b>	<b>100</b>	<b>26.03</b>	3	1000	42.85	3	100	4.30	1	1000	- <sup>e</sup>
FP $\alpha$ #2	<b>30</b>	<b>100</b>	<b>11.96</b>	1	100	4.59	3	100	5.63	1	1000	-
FP $b$ #1	1	100	10.28	<b>30</b>	<b>100</b>	<b>4.55</b>	3	100	1.72	10	100	1.04
FP $b$ #2	3	100	11.61	<b>10</b>	<b>100</b>	<b>4.06</b>	3	1000	n.i. <sup>f</sup>	30	100	4.23

<sup>a</sup> Los valores de  $IC_{50}$  son la media de tres determinaciones independientes. Los valores de  $A_{m\acute{a}x}$  estuvieron entre 0.8 y 1.5. Las combinaciones homólogas se han resaltado en negrita. <sup>b</sup> Factor de dilución del anticuerpo  $\times 10^{-3}$ . <sup>c</sup> Concentración de conjugado de OVA expresada en ng/mL. <sup>d</sup> Valores expresados en nM. <sup>e</sup> No se obtuvo señal. <sup>f</sup> No se observó reducción de la señal en presencia de analito.

Una diferencia significativa respecto a los resultados obtenidos en el formato directo fue el reconocimiento de conjugados heterólogos en casi todas las combinaciones, como es usual en este formato de ensayo. Así, los anticuerpos derivados del hapteno FP $\alpha$  reconocieron al conjugado OVA-FP $b$ , con el brazo espaciador en posición opuesta al del homólogo, mientras que no reconocieron el conjugado OVA-FP $hb$ , que además carecía del grupo trifluorometilo del anillo homoaromático. Por otra parte, y en contraste con lo sucedido en el formato directo, estos mismos anticuerpos sí reconocieron al conjugado OVA-FP $\alpha'$ , con el brazo espaciador en posición homóloga pero sin grupo difluoruro geminal y con el grupo trifluorometilo en posición diferente a la de fluopyram, aunque a cambio de emplear diluciones menores de los anticuerpos. Estos resultados refuerzan la idea de que tanto la posición de dicho grupo funcional como la variación en la densidad electrónica del anillo de piridina son claves en el reconocimiento de haptenos de fluopyram por parte de estos anticuerpos.

En cuanto a los pAbs derivados del hapteno *FPb*, ambos fueron capaces de reconocer todos los conjugados de tapizado disponibles, incluido el del hapteno con heterología múltiple (*OVA-FPha'*). En la gran mayoría de casos fue necesario incrementar la concentración de pAb para lograr una señal máxima similar, especialmente para el reconocimiento de los conjugados con el brazo espaciador en posición opuesta a la homóloga (*OVA-FPa* y *OVA-FPha*) por parte del pAb *FPb#1*. No obstante, para la interacción del pAb *FPb#2* con el conjugado *OVA-FPhb*, con el espaciador en posición homóloga, fue posible emplear una menor concentración de anticuerpo, lo que sugiere una mayor afinidad de éste hacia el conjugado heterólogo.

La combinación de los pAbs de tipo *FPa* con el conjugado heterólogo *OVA-FPha'* permitió mejorar considerablemente la sensibilidad de los ensayos homólogos, alcanzándose en ambos casos valores de  $IC_{50}$  en torno a 5 nM. En cambio, cuando se utilizó el conjugado heterólogo *OVA-FPb*, la sensibilidad se duplicó para el pAb *FPa#2*, mientras que esta situación no se produjo en el caso del pAb *FPa#1*. Esta diferencia incrementó la disparidad entre ambos pAbs citada anteriormente para los respectivos ensayos con conjugado homólogo. Por su parte, con el pAb *FPb#1* se observó un aumento de sensibilidad cuando se emplearon los conjugados heterólogos *OVA-FPha'* y *OVA-FPhb*, en cualquier caso menos acusado que el observado en el formato directo al reemplazar el trazador homólogo por el trazador heterólogo *HRP-FPhb*. Todos estos resultados indican una cierta ventaja del hapteno *FPb* para desarrollar ensayos de elevada sensibilidad hacia fluopyram. El ensayo más sensible para fluopyram obtenido en formato directo fue el conformado por el conjugado *OVA-FPhb* a 100 ng/mL y el anticuerpo *FPb#1* diluido  $10^4$  veces, con un valor de  $IC_{50}$  de 1.04 nM.

Una vez evaluada la afinidad de los pAbs para fluopyram, se repitió el proceso con los pAbs para penthiopyrad. Los ensayos se llevaron a cabo frente a los conjugados de tapizado preparados a partir de los cinco haptenos sintetizados (*OVA-PPa*, *OVA-PPb*, *OVA-PPm*, *OVA-PPd'* y *OVA-PPo*), y los resultados obtenidos se recogen en la Tabla 3.7.

Tal y como sucedió en el formato directo, todos los anticuerpos dieron lugar a ensayos con buen reconocimiento del conjugado homólogo y muy buena sensibilidad, con valores de  $IC_{50}$  de orden nanomolar, indicando por tanto una elevada afinidad de los anticuerpos hacia penthiopyrad. En cuanto a la variabilidad según el animal inmunizado, sólo se observó una cierta diferencia entre las respuestas de los anticuerpos *PPm#1* y *PPm#2*, no observada en el formato directo. En este formato de

ensayo se observó una mayor sensibilidad en los ensayos homólogos con los anticuerpos generados a partir de los haptenos *PPa* y *PPm*. Los ensayos homólogos con anticuerpos derivados del hapteno *PPb* fueron mucho menos sensibles. Este resultado posiblemente refleja la menor similitud del hapteno *PPb* con respecto a penthiopyrad, ya que el brazo espaciador del primero es lineal, mientras que el fragmento alifático del fungicida contiene ramificaciones (Figura 3.11, sección 3.2.5).

**Tabla 3.7.** Caracterización de los anticuerpos policlonales obtenidos para penthiopyrad mediante ELISA competitivo bidimensional en formato indirecto con conjugados homólogos y heterólogos.<sup>a</sup>

pAb	Conjugado de tapizado <sup>b</sup>									
	OVA- <i>PPa</i>		OVA- <i>PPb</i>		OVA- <i>PPm</i>		OVA- <i>PPd'</i>		OVA- <i>PPo</i>	
	[pAb] <sup>c</sup>	IC <sub>50</sub> <sup>d</sup>	[pAb]	IC <sub>50</sub>	[pAb]	IC <sub>50</sub>	[pAb]	IC <sub>50</sub>	[pAb]	IC <sub>50</sub>
PPa#1	<b>100</b>	<b>3.25</b>	30	3.29	30	8.73	3 <sup>e</sup>	5.92	30 <sup>e</sup>	1.20
PPa#2	<b>100</b>	<b>2.23</b>	30	1.83	30	5.92	10 <sup>e</sup>	1.31	10 <sup>e</sup>	1.14
PPb#1	3	6.05	<b>30</b>	<b>22.37</b>	10	17.89	30 <sup>e</sup>	6.28	10	13.65
PPb#2	10	9.27	<b>100</b>	<b>24.48</b>	30	11.99	10	3.17	30	9.31
PPm#1	30	1.85	100	1.81	<b>100</b>	<b>6.68</b>	10 <sup>e</sup>	1.47	10	2.23
PPm#2	100	0.53	100	0.64	<b>100</b>	<b>1.69</b>	30 <sup>e</sup>	0.62	30	0.49

<sup>a</sup> Los valores de IC<sub>50</sub> son la media de tres determinaciones independientes. Los valores de A<sub>máx</sub> estuvieron entre 0.8 y 1.5. Las combinaciones homólogas se han resaltado en negra. <sup>b</sup> Salvo que se indique otro valor, en el tapizado se empleó una concentración de conjugado de OVA de 100 ng/mL. <sup>c</sup> Factor de dilución del anticuerpo ×10<sup>-3</sup>. <sup>d</sup> Valores expresados en nM. <sup>e</sup> Se empleó una concentración de conjugado de OVA de 1000 ng/mL.

En contraste con lo sucedido en el formato directo, y en sintonía con lo observado para el fungicida fluopyram, todos los pAbs fueron capaces de reconocer a los cinco conjugados de tapizado empleados, lo que puso de manifiesto la menor restricción del formato indirecto de cara al reconocimiento de conjugados heterólogos. En este sentido, el resultado más destacable fue el reconocimiento del conjugado OVA-*PPo* y sobretodo el del conjugado OVA-*PPd'*, aunque fue necesario en todos los casos emplear una menor dilución de anticuerpo o bien una mayor concentración de conjugado de tapizado.

En gran parte de los casos fue posible mejorar la sensibilidad de los ensayos homólogos mediante heterología. Así, en el caso de los pAbs generados a partir del hapteno *PPa*, fue posible alcanzar valores de IC<sub>50</sub> próximos a 1 nM cuando se utilizó el

conjugado heterólogo OVA–PPo. Por su parte, la sensibilidad de los ensayos con anticuerpos derivados del hapteno PPb en combinación con cualquiera de los conjugados heterólogos indujo un aumento de sensibilidad, destacando la mejora de entre 3 y 8 veces observada con el conjugado heterólogo OVA–PPd'. No obstante, el uso de conjugados heterólogos fue de especial interés en los ensayos con anticuerpos derivados del hapteno Ppm, ya que todos ellos indujeron un aumento de sensibilidad respecto a los ensayos con el conjugado homólogo. El caso más remarcable es el del anticuerpo Ppm#2, que ya había mostrado un buen comportamiento en los ensayos en formato directo. En el formato indirecto, el excelente valor de IC<sub>50</sub> de 1.69 nM obtenido en el ensayo homólogo fue mejorado con todos los conjugados heterólogos para dar ensayos con sensibilidades de orden subnanomolar. Estos resultados reflejaron de nuevo la idoneidad del hapteno Ppm para la generación de anticuerpos de elevada afinidad hacia penthiopyrad. De este modo, el ensayo más sensible para este fungicida en formato indirecto se obtuvo con el conjugado heterólogo OVA–PPo a 100 ng/mL y el pAb Ppm#2 diluido 3·10<sup>4</sup> veces, lo que proporcionó un valor de IC<sub>50</sub> de 0.49 nM.

**Tabla 3.8.** Concentraciones óptimas de inmunorreactivos y parámetros de las curvas de los mejores ensayos en formato indirecto obtenidas con cada anticuerpo policlonal de fluopyram y penthiopyrad.<sup>a</sup>

pAb	[pAb] <sup>c</sup>	Conjugado de tapizado	[OVA] <sup>d</sup>	Parámetros de la curva <sup>b</sup>		
				A <sub>máx</sub>	Pendiente <sup>e</sup>	IC <sub>50</sub> (nM)
FPa#1	3	OVA–FPha'	100	0.93 ± 0.26	–0.76 ± 0.05	4.30 ± 0.81
FPa#2	1	OVA–FPb	100	0.99 ± 0.28	–0.91 ± 0.07	4.59 ± 0.83
<b>FPb#1</b>	<b>10</b>	<b>OVA–FPhb</b>	<b>100</b>	<b>0.83 ± 0.23</b>	<b>–0.88 ± 0.11</b>	<b>1.04 ± 0.19</b>
FPb#2	10	OVA–FPb	100	0.91 ± 0.25	–0.68 ± 0.04	4.06 ± 0.52
PPa#1	30	OVA–PPo	1000	0.97 ± 0.24	–1.06 ± 0.08	1.20 ± 0.25
PPa#2	10	OVA–PPo	1000	1.40 ± 0.44	–1.22 ± 0.20	1.14 ± 0.12
PPb#1	3	OVA–PPa	100	1.30 ± 0.03	–0.83 ± 0.04	6.05 ± 1.06
PPb#2	10	OVA–PPd'	100	0.93 ± 0.11	–0.70 ± 0.07	3.17 ± 1.11
PPm#1	10	OVA–PPd'	1000	0.88 ± 0.13	–0.94 ± 0.18	1.47 ± 0.39
<b>PPm#2</b>	<b>30</b>	<b>OVA–PPo</b>	<b>100</b>	<b>0.88 ± 0.24</b>	<b>–1.24 ± 0.12</b>	<b>0.49 ± 0.08</b>

<sup>a</sup> En negrita se ha resaltado el ensayo más sensible para cada fungicida. <sup>b</sup> Los valores se expresan como media y desviación estándar de tres determinaciones independientes. Los valores de A<sub>mín</sub> fueron siempre inferiores a 0.05. <sup>c</sup> Factor de dilución del anticuerpo ×10<sup>–3</sup>. <sup>d</sup> Concentración de conjugado de OVA expresada en ng/mL. <sup>e</sup> Pendiente de la curva en el punto de inflexión.

En la Tabla 3.8 se recopilan las características más importantes de los mejores inmunoensayos en formato indirecto obtenidos con cada uno de los pAbs generados para fluopyram y penthiopyrad, incluyendo los valores promedio de las curvas estándar obtenidas en cada caso. Todos los inmunoensayos seleccionados mostraron sensibilidades excelentes hacia sus correspondientes analitos, reflejadas en los valores de  $IC_{50}$  de escala nanomolar o incluso subnanomolar obtenidos. La mayoría de las pendientes obtenidas se situaron en el intervalo habitual, observándose valores algo superiores a lo normal en los ensayos seleccionados para los anticuerpos *PPa#2* y *PPm#2*. El valor de pendiente más alto, 1.24, fue nuevamente el del ensayo más sensible para penthiopyrad, situación que también se observó en el formato directo. Por último, destaca que los conjugados *OVA-FPa'*, *OVA-PPd'* y *OVA-PPo* dieron lugar a algunos de los ensayos más sensibles del formato indirecto, en contraste con la ausencia de reconocimiento de los correspondientes trazadores enzimáticos en el formato directo.

La comparación global de resultados en ambos formatos y para ambos fungicidas permite concluir que fue posible generar una colección de pAbs de elevada afinidad hacia los fungicidas fluopyram y penthiopyrad, siendo posible desarrollar inmunoensayos con excelentes sensibilidades, de orden nanomolar o incluso subnanomolar. Por otra parte, el formato directo resultó ser más restrictivo en cuanto al reconocimiento de conjugados heterólogos que el formato indirecto, pero a cambio dio lugar a inmunoensayos de mayor sensibilidad. Probablemente, uno de los factores que puede influir en estas diferencias de comportamiento es la diferente forma de interaccionar el anticuerpo y el analito en cada formato, puesto que en formato directo el reconocimiento tiene lugar en fase heterogénea y en formato indirecto dicha interacción tiene lugar en disolución. Finalmente, los dos haptenos de fluopyram usados para la obtención de anticuerpos (*FPa* y *FPb*) proporcionaron resultados semejantes, mientras que de los tres de penthiopyrad empleados con este fin (*PPa*, *PPb* y *PPm*), *PPb* dio lugar claramente a anticuerpos de menor afinidad.

### **3.4.3. Estudio de la especificidad de los anticuerpos policlonales**

A la hora de llevar a cabo un inmunoensayo, y desde un punto de vista analítico, el reconocimiento no deseado de compuestos diferentes al analito por parte de los anticuerpos constituye una interferencia potencial en el ensayo y por tanto una fuente de errores en la cuantificación del analito. Por ello, es necesario asegurar que el

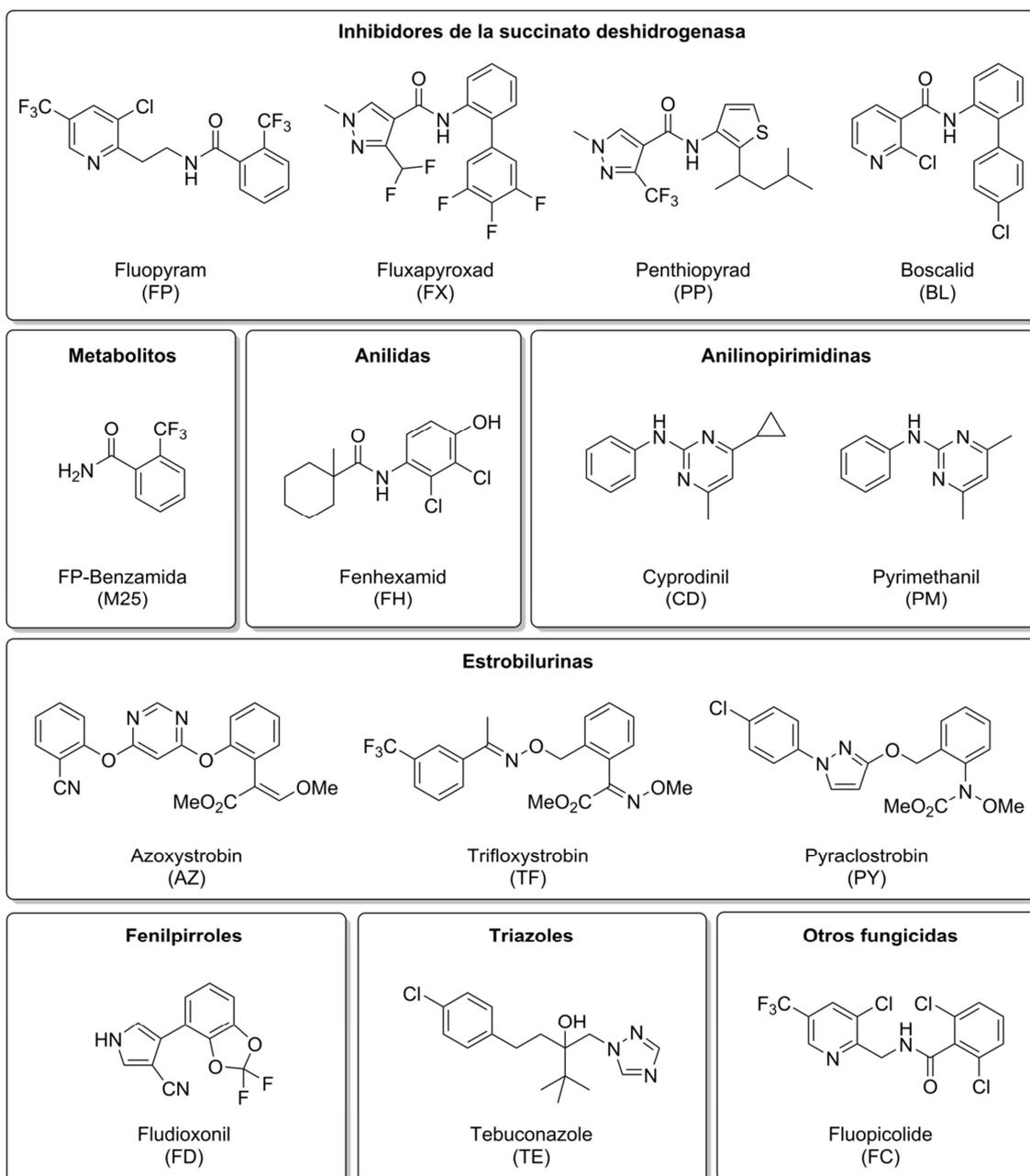
anticuerpo reconoce exclusivamente la molécula de interés, incluso en presencia de compuestos estructuralmente semejantes. De este modo, una vez evaluada la afinidad de los pAbs generados frente a los fungicidas de estudio, se procedió a determinar la capacidad de dichos anticuerpos de reconocer exclusivamente a sus respectivos analitos, es decir, su especificidad.

Una forma de estimar cuantitativamente el grado de reconocimiento de un anticuerpo hacia un compuesto distinto al analito específico consiste en llevar a cabo un inmunoensayo competitivo frente al analito y otro frente al compuesto de estudio en las mismas condiciones para obtener los correspondientes valores de  $IC_{50}$ , y después calcular el cociente entre el valor del analito y el valor del compuesto a evaluar. Este cociente, usualmente expresado como porcentaje, se denomina reactividad cruzada relativa al analito (RC), y su valor es tanto más alto cuanto mayor es el reconocimiento del compuesto estudiado por parte del anticuerpo, siendo un 0% el valor mínimo correspondiente a un reconocimiento nulo de dicho compuesto.

El primer paso para la evaluación de la especificidad fue la selección de un conjunto de compuestos potencialmente reconocibles por los anticuerpos. Por una parte, se consideró la naturaleza y origen de las futuras muestras a las que se podrían aplicar los inmunoensayos. Teniendo en cuenta el más que probable origen agrícola de las muestras, sería razonable hallar en ellas residuos de plaguicidas pertenecientes a otras familias, ya que es frecuente someter los cultivos a tratamientos combinados, ya sea aplicando fumigaciones sucesivas con diferentes principios activos o empleando formulados con más de un principio activo. Por otra parte, los fungicidas pueden ser degradados en el medio ambiente o metabolizados por el organismo receptor para dar lugar a compuestos de estructura similar, que pueden estar igualmente presentes en las muestras analizadas. Por todo ello, se consideró conveniente evaluar la especificidad de los anticuerpos frente a un total de 12 fungicidas, pertenecientes tanto a la misma familia como a otros grupos de principios activos, y se hizo especial hincapié en incluir compuestos con motivos estructurales similares a los existentes en fluopyram y penthiopyrad. Del mismo modo, se estudió el grado de reconocimiento de los anticuerpos de fluopyram frente al metabolito fluopyram-benzamida o M25 (**2**, Esquema 1.1, sección 1.1.1.2).<sup>21,24</sup> Las estructuras de todos los compuestos ensayados se recogen en la Figura 3.14.

Una vez escogidos los compuestos a estudiar, se evaluó el grado de reconocimiento de los anticuerpos mediante ELISA competitivo indirecto con el

conjugado OVA–hapteno homólogo, empleando para ello las condiciones de ensayo optimizadas en cada caso (concentración de conjugado y dilución de anticuerpo). Se ensayaron en la misma placa una curva estándar de analito (fluopyram o penthiopyrad, según el anticuerpo empleado) y una curva estándar del compuesto a evaluar, con el fin de hallar en el mismo experimento los valores de IC<sub>50</sub> para cada uno de los dos compuestos. Con ellos, se obtuvieron los respectivos valores de RC según se ha descrito anteriormente, los cuales se recopilan en la Tabla 3.9.



**Figura 3.14.** Estructuras químicas de los diferentes fungicidas y metabolitos empleados en los ensayos de especificidad, agrupados según familias estructurales de principios activos.

Los pAbs de fluopyram resultaron ser altamente específicos hacia el fungicida frente a la batería de compuestos estudiados. Únicamente los anticuerpos derivados del hapteno FP*a* mostraron un ligero reconocimiento del fungicida fluopicolide (FC), claramente atribuible a la presencia del anillo de piridina con idéntica sustitución en ambos fungicidas. Curiosamente, los anticuerpos de tipo FP*b* (hapteno con el brazo espaciador en posición distal respecto al anillo de piridina) no mostraron reconocimiento alguno de fluopicolide. No obstante, los valores de RC de los anticuerpos de tipo FP*a* no alcanzaron el 0.05%, por lo que el grado de reconocimiento fue prácticamente despreciable. El metabolito M25 tampoco fue reconocido por ninguno de los anticuerpos de fluopyram, a pesar de compartir ambos compuestos la estructura del anillo homoaromático.

**Tabla 3.9.** Reactividad cruzada de los anticuerpos policlonales de fluopyram (FP) y penthiopyrad (PP).

pAb	Reactividad cruzada (%) <sup>a</sup>													
	FP	PP	FX	M25	FC	BL	FH	CD	PM	FD	AZ	TF	PY	TE
FP <i>a</i> #1	100	0 <sup>b</sup>	0	0	0.04	0	0	0	- <sup>c</sup>	0	0	0	-	0
FP <i>a</i> #2	100	0	0	0	0.03	0	0	0	-	0	0	0	-	0
FP <i>b</i> #1	100	0	0	0	0	0	0	0	-	0	0	0	-	0
FP <i>b</i> #2	100	0	0	0	0	0	0	0	-	0	0	0	-	0
PP <i>a</i> #1	0	100	0	-	0	0	0	0	0	0	0	-	0	0
PP <i>a</i> #2	0	100	0	-	0	0	0	0	0	0	0	-	0	0
PP <i>b</i> #1	0	100	0.23	-	0	0	0	0	0	0	0	-	0	0
PP <i>b</i> #2	0	100	0.26	-	0	0	0	0	0	0	0	-	0	0
PP <i>m</i> #1	0	100	0	-	0	0	0	0	0	0	0	-	0	0
PP <i>m</i> #2	0	100	0	-	0	0	0	0	0	0	0	-	0	0

<sup>a</sup> Los valores corresponden a la media de tres determinaciones independientes. Las abreviaturas de los compuestos ensayados son las que aparecen en la Figura 3.14. <sup>b</sup> No se observó reducción de la señal a una concentración de 10<sup>5</sup> nM o bien la reactividad cruzada fue inferior a 0.01%. <sup>c</sup> Ensayo no realizado.

Por su parte, los anticuerpos generados para penthiopyrad mostraron igualmente una elevada especificidad hacia su analito, ya que ninguno de ellos reconoció significativamente ninguno de los compuestos estudiados. Sin embargo, con los anticuerpos de tipo PP*b* se observó un cierto reconocimiento del fungicida fluxapyroxad (FX), también perteneciente al grupo de los inhibidores de la succinato deshidrogenasa. Este resultado no fue de extrañar, ya que ambos contienen un anillo de pirazol con un sustituyente fluorado muy similar y un esqueleto formado por dos anillos aromáticos unidos a través de un enlace amida. Afortunadamente, el grado de

reconocimiento fue relativamente bajo, con valores de RC inferiores al 0.3%. En un principio resulta sorprendente que los anticuerpos obtenidos con el conjugado BSA-PPb reconozcan ligeramente fluxapyroxad y que no lo hagan los de tipo PPM. No obstante, esto se debe al menor valor de IC<sub>50</sub> hacia penthiopyrad de estos últimos anticuerpos.

### 3.5. Generación y evaluación de anticuerpos monoclonales

#### 3.5.1. **Generación, cuantificación e isotipación de anticuerpos**

La obtención de anticuerpos monoclonales (mAbs) pasa por la generación de hibridomas a partir de los linfocitos B del bazo de un animal inmunizado. Desde un punto de vista práctico, para esta finalidad es conveniente emplear sistemas animales de pequeño tamaño, ya que por lo general permiten la generación de una cantidad suficiente pero no excesiva de hibridomas de interés, que posteriormente pueden cultivarse tanto como se considere necesario. Por ello, se decidió obtener mAbs a partir de ratones blancos BALB/c.

La generación de mAbs es un proceso que requiere una mayor inversión de tiempo y dinero que la obtención de pAbs, ya que se hacen necesarias una serie de etapas de cultivo y selección de líneas celulares posteriores a la inmunización. Por ello, es importante una selección previa de los inmunógenos con mayor probabilidad de generar una buena respuesta inmunitaria, para lo que pueden servir los resultados obtenidos en la caracterización de policlonales generados a partir de los mismos inmunógenos. De este modo, de cara a la obtención de mAbs para penthiopyrad sólo se emplearon los conjugados BSA-PPa y BSA-PPm, descartando para este fin BSA-PPb, ya que los pAbs generados a partir de los dos primeros dieron lugar a los ensayos más sensibles en los dos formatos de ELISA competitivo estudiados. En cuanto a fluopyram, las inmunizaciones se llevaron a cabo con los dos conjugados BSA-hapteno preparados. Cada inmunógeno fue inoculado en cuatro ratones, es decir, se inmunizó un total de 16 animales.

Los ratones fueron inmunizados recibiendo dosis fijas de los conjugados BSA-hapteno mediante inyección intraperitoneal cada 3 semanas hasta alcanzar un total de 4 inoculaciones. Diez días después de la tercera inmunización se extrajeron muestras de sangre y se analizaron mediante ELISA competitivo para verificar que la

inmunización se estaba produciendo adecuadamente (resultados no incluidos). Pocos días después de la última inmunización, los animales fueron sacrificados y se extrajeron los linfocitos B de sus bazos, que fueron fusionados con células de mieloma mezclándolos en proporción linfocito/mieloma 4:1 en presencia de polietilenglicol (PEG1500) como agente fusionante. Ello dio lugar a un conjunto de clones de hibridomas, con capacidad simultánea de producir anticuerpos y de replicarse indefinidamente. Los hibridomas generados fueron sometidos varios días después de la fusión celular a un proceso de cribado, basado en el análisis de los sobrenadantes de cultivo mediante ELISA competitivo en formato indirecto con conjugado homólogo, para seleccionar aquellos que producían anticuerpos de elevada afinidad hacia los fungicidas de interés.

La selección de hibridomas se llevó a cabo en dos etapas de cribado. En la primera, se determinó simultáneamente qué pocillos contenían anticuerpos capaces de reconocer al conjugado de tapizado, siendo por tanto positivos, y de entre los positivos cuáles mostraban además interacción con el analito, es decir, cuáles eran también competitivos (ELISA diferencial).<sup>126</sup> Una vez identificados los sobrenadantes positivos y competitivos, éstos se reevaluaron en una segunda etapa mediante ELISA competitivo bidimensional indirecto a dos concentraciones del conjugado de tapizado (10 y 100 ng/mL), ensayando en cada una 4 diluciones de sobrenadante frente a un blanco y dos patrones de analito (10 y 100 nM). Esta segunda etapa permitió obtener más información sobre la afinidad de los anticuerpos preseleccionados hacia sus respectivos analitos, y permitió llevar a cabo la selección definitiva de los hibridomas productores de los mejores anticuerpos. Los resultados obtenidos en las diversas fusiones realizadas se recogen en la Tabla 3.10.

Todas las fusiones celulares dieron lugar con éxito a la generación de hibridomas, siendo el proceso especialmente eficiente cuando se utilizaron los bazos de los ratones inmunizados con el inmunógeno BSA-PP $\alpha$ . En cuanto a la inducción de respuesta inmunitaria, con los cuatro conjugados fue posible generar hibridomas con resultado positivo, y por tanto generadores de anticuerpos con capacidad de reconocer al conjugado de tapizado homólogo. En algunos de ellos se observó además un comportamiento competitivo reflejado en la reducción de señal en presencia de analito, de modo que la proporción de pocillos con resultado competitivo respecto al total de pocillos cultivados estuvo siempre en el intervalo 0.1–2%. Tras la reevaluación de los pocillos con resultado positivo y competitivo, se seleccionó un total de 24

hibridomas generadores de anticuerpos de elevada afinidad hacia los fungicidas de estudio. De ellos, 5 procedieron de ratones inmunizados con el conjugado BSA–FPa y otros 5 se obtuvieron a partir del conjugado BSA–FPb, todos ellos secretores de anticuerpos con gran capacidad de reconocer fluopyram. Por otra parte, la inmunización con los conjugados BSA–PPa y BSA–PPm dio lugar a la selección de 8 y 6 hibridomas, respectivamente, productores de anticuerpos altamente afines a penthiopyrad.

**Tabla 3.10.** Fusiones celulares realizadas a partir de ratones inmunizados con conjugados BSA–hapteno y resumen de los resultados obtenidos.

Inmunógeno	Fusión nº	Eficiencia fusión (%) <sup>a</sup>	Resultados (número de pocillos)			Hibridomas aislados <sup>d</sup>
			Cultivados	Positivos <sup>b</sup>	Competitivos <sup>c</sup>	
BSA–FPa	1	64	1056	28	7	2
	2	50	1056	7	6	1
	3 <sup>e</sup>	65	1824	58	15	2
BSA–FPb	1	68	1056	20	5	1
	2	83	1440	152	26	2
	3 <sup>e</sup>	36	1824	10	6	2
BSA–PPa	1	98	1152	14	2	1
	2	94	1632	52	21	5
	3 <sup>e</sup>	90	2016	178	23	2
BSA–PPm	1	69	1440	4	4	2
	2	76	1248	187	13	0
	3	77	960	3	1	0
	4	68	1440	75	11	4

<sup>a</sup> Porcentaje de pocillos que presentaron al menos un clon claramente visible al microscopio 10–12 días después de la fusión celular. <sup>b</sup> Número de pocillos que proporcionaron una señal superior a 0.5 en ausencia de analito obtenida mediante ELISA competitivo. <sup>c</sup> Número de pocillos en los que la presencia de analito indujo una reducción de la señal igual o superior al 80% respecto al correspondiente pocillo sin analito obtenida mediante ELISA competitivo. <sup>d</sup> Número de hibridomas productores de anticuerpos de elevada afinidad hacia su analito seleccionados entre todos los presentes en los pocillos con resultado competitivo. <sup>e</sup> La fusión se llevó a cabo mezclando los linfocitos de los bazo de dos ratones inmunizados de igual forma.

La presencia de anticuerpos de interés en el sobrenadante de un pocillo de cultivo no implica que éste contenga un solo tipo de hibridomas. De hecho, suele haber una mezcla de dos o más líneas celulares de hibridomas productores o no de anticuerpos de interés. Por ello, cada hibridoma seleccionado fue clonado mediante el método de la dilución límite (ver sección 1.3.3.3) hasta aislar una sola línea celular. Para asegurar

la monoclonalidad del hibridoma, el proceso de clonaje se llevó a cabo dos veces. A continuación, los hibridomas clonados se estabilizaron y se expandieron, y los mAbs se purificaron a partir de los sobrenadantes de cultivo mediante precipitación salina y cromatografía de afinidad. Una vez purificados, la concentración de inmunoglobulina se cuantificó de forma espectrofotométrica y se determinó su isotipo mediante ELISA haciendo uso de anticuerpos específicos. Los resultados se recogen en la Tabla 3.11.

**Tabla 3.11.** Anticuerpos monoclonales para fluopyram y penthiopyrad obtenidos a partir de los hibridomas aislados y tipos de cadenas pesadas (H) y ligeras (L) que los componen.

Inmunógeno	Anticuerpo	[mAb] <sup>a</sup>	Cantidad (mg)	Cadena H	Cadena L	Isotipo
BSA-FPa	FPa#11	104	10.4	Y <sub>2b</sub>	κ	IgG <sub>2b</sub> (κ)
	FPa#12	41	4.1	Y <sub>1</sub>	λ	IgG <sub>1</sub> (λ)
	FPa#21	66	6.6	Y <sub>1</sub>	κ	IgG <sub>1</sub> (κ)
	FPa#31	71	7.1	Y <sub>2a</sub>	κ	IgG <sub>2a</sub> (κ)
	FPa#37	48	4.8	Y <sub>1</sub>	κ	IgG <sub>1</sub> (κ)
BSA-FPb	FPb#12	38	5.8	Y <sub>2b</sub>	κ	IgG <sub>2b</sub> (κ)
	FPb#220	65	9.7	Y <sub>1</sub>	κ	IgG <sub>1</sub> (κ)
	FPb#223	72	10.7	Y <sub>1</sub>	λ	IgG <sub>1</sub> (λ)
	FPb#32	45	5.9	Y <sub>2a</sub>	κ	IgG <sub>2a</sub> (κ)
	FPb#36	38	5.0	Y <sub>1</sub>	κ	IgG <sub>1</sub> (κ)
BSA-PPa	PPa#12	32	3.2	Y <sub>1</sub>	κ	IgG <sub>1</sub> (κ)
	PPa#21	64	6.4	Y <sub>1</sub>	κ	IgG <sub>1</sub> (κ)
	PPa#27	60	6.0	Y <sub>2b</sub>	κ	IgG <sub>2b</sub> (κ)
	PPa#28	54	5.4	Y <sub>1</sub>	κ	IgG <sub>1</sub> (κ)
	PPa#210	50	5.0	Y <sub>1</sub>	κ	IgG <sub>1</sub> (κ)
	PPa#216	39	3.9	Y <sub>1</sub>	κ	IgG <sub>1</sub> (κ)
	PPa#311	30	3.0	Y <sub>2a</sub>	κ	IgG <sub>2a</sub> (κ)
	PPa#323	65	6.5	Y <sub>2a</sub>	λ	IgG <sub>2a</sub> (λ)
BSA-PPm	PPm#11	38	5.6	Y <sub>1</sub>	κ	IgG <sub>1</sub> (κ)
	PPm#13	55	8.3	Y <sub>1</sub>	κ	IgG <sub>1</sub> (κ)
	PPm#43	28	2.8	Y <sub>2a</sub>	κ	IgG <sub>2a</sub> (κ)
	PPm#47	26	2.6	Y <sub>2a</sub>	κ	IgG <sub>2a</sub> (κ)
	PPm#410	51	5.1	Y <sub>2b</sub>	κ	IgG <sub>2b</sub> (κ)
	PPm#412	68	6.8	Y <sub>1</sub>	κ	IgG <sub>1</sub> (κ)

<sup>a</sup> Concentración de anticuerpo monoclonal en el sobrenadante de cultivo expresada en µg/mL, calculada a partir de la concentración y el volumen de la disolución de anticuerpo purificado y del volumen de sobrenadante.

La mayoría de los hibridomas tuvieron una productividad estándar, reflejada en valores de concentración de anticuerpo en el sobrenadante de cultivo entre 35 y 65  $\mu\text{g/mL}$ , o lo que es lo mismo, hibridomas capaces de producir de 3.5 a 6.5 mg de inmunoglobulina por cada 100 mL de cultivo. El hibridoma secretor del mAb FP $\alpha$ #11 destacó por presentar aproximadamente el doble de productividad de lo habitual, mientras que este parámetro fue ligeramente inferior a lo normal para los hibridomas que dieron lugar a los anticuerpos PP $m$ #43 y PP $m$ #47. No obstante, con los cultivos celulares realizados fue posible obtener al menos 2 mg de todos los anticuerpos monoclonales deseados, cantidad más que suficiente para poder llevar a cabo su posterior caracterización.

En cuanto al isotipo de los anticuerpos generados, todos ellos fueron inmunoglobulinas de tipo G, en más de la mitad de los casos del subtipo  $\gamma_1$  y el resto repartido entre los subtipos  $\gamma_{2a}$  y  $\gamma_{2b}$ . Por su parte, casi la totalidad de las cadenas ligeras fueron de tipo  $\kappa$ , observándose el tipo  $\lambda$  sólo en los anticuerpos FP $\alpha$ #12, FP $b$ #223 y PP $\alpha$ #323. De este modo, el isotipo mayoritario fue IgG $_1$  con cadena ligera  $\kappa$ , si bien hubo un número importante de inmunoglobulinas de los isotipos IgG $_{2a}$  e IgG $_{2b}$  con cadena ligera  $\kappa$ , con 5 y 4 casos respectivamente.

### 3.5.2. Evaluación de la afinidad de los anticuerpos monoclonales

Al igual que se hizo con los policlonales, la afinidad de los mAbs hacia sus respectivos analitos se evaluó mediante ELISA competitivo bidimensional en dos formatos (anticuerpo inmovilizado con detección directa y conjugado inmovilizado con detección indirecta) frente a conjugados de ensayo homólogos y heterólogos, empleando microplacas de poliestireno de 96 pocillos. La afinidad se evaluó de nuevo en base a los valores de IC $_{50}$  y para cada pareja anticuerpo/conjugado se determinaron las condiciones óptimas siguiendo el mismo criterio que en la evaluación de anticuerpos policlonales. Sin embargo, y aunque se buscaron correlaciones entre los resultados y la estructura de los haptenos de inmunización, el propósito de este estudio con mAbs se enfocó principalmente a la búsqueda de condiciones para el desarrollo de inmunoensayos de elevada sensibilidad y no tanto a la evaluación de la respuesta inmunitaria, como sí se hizo con policlonales. El motivo de este distinto enfoque se debe a que la selección de hibridomas en el proceso de generación de los mAbs implica un sesgo de la respuesta promedio del sistema inmunitario del animal,

llegando al final del proceso sólo aquellos con mayor afinidad por el analito y siendo descartados otros con menor afinidad.

### 3.5.2.1. Formato de anticuerpo inmovilizado con detección directa

En este formato de ensayo, se emplearon concentraciones de mAb de 300 y 1000 ng/mL para el recubrimiento inicial de las superficies, mientras que la competición se efectuó con concentraciones de trazador enzimático de 1, 3, 10, 30, 100 y 300 ng/mL. Cada una de las 12 combinaciones resultantes se enfrentó a una curva estándar de analito de 7 patrones (preparados por dilución en serie del primer patrón a 10  $\mu$ M con un factor de dilución de 10) y un blanco, y la información obtenida de todas ellas permitió establecer las condiciones de ensayo para lograr la mayor sensibilidad, relacionada con la afinidad del anticuerpo hacia el analito. De este modo, en primer lugar se evaluaron los mAbs generados para fluopyram, obteniéndose los resultados recogidos en la Tabla 3.12.

**Tabla 3.12.** Caracterización de los anticuerpos monoclonales obtenidos para fluopyram mediante ELISA competitivo bidimensional en formato directo con conjugados homólogos y heterólogos.<sup>a</sup>

mAb	Trazador enzimático											
	HRP-FP $\alpha$			HRP-FP $\beta$			HRP-FP $\alpha'$			HRP-FP $\beta$		
	[mAb] <sup>b</sup>	[HRP] <sup>c</sup>	IC <sub>50</sub> <sup>d</sup>	[mAb]	[HRP]	IC <sub>50</sub>	[mAb]	[HRP]	IC <sub>50</sub>	[mAb]	[HRP]	IC <sub>50</sub>
FP $\alpha$ #11	<b>1000</b>	<b>300</b>	- <sup>e</sup>	1000	300	-	1000	300	-	1000	300	-
FP $\alpha$ #12	<b>1000</b>	<b>300</b>	<b>2.86</b>	1000	300	-	1000	30	3.84	1000	300	-
FP $\alpha$ #21	<b>1000</b>	<b>300</b>	-	1000	300	-	1000	300	-	1000	300	-
FP $\alpha$ #31	<b>1000</b>	<b>300</b>	-	1000	300	-	1000	300	-	1000	300	-
FP $\alpha$ #37	<b>1000</b>	<b>300</b>	-	1000	300	-	1000	300	-	1000	300	-
FP $\beta$ #12	1000	300	-	<b>1000</b>	<b>30</b>	<b>0.75</b>	1000	300	-	1000	300	-
FP $\beta$ #220	1000	300	-	<b>300</b>	<b>10</b>	<b>2.42</b>	1000	300	-	1000	30	2.83
FP $\beta$ #223	1000	300	-	<b>300</b>	<b>30</b>	<b>5.90</b>	1000	300	-	300	100	1.54
FP $\beta$ #32	1000	300	-	<b>1000</b>	<b>30</b>	<b>9.67</b>	1000	300	-	1000	300	4.68
FP $\beta$ #36	1000	300	-	<b>1000</b>	<b>30</b>	<b>3.17</b>	1000	300	-	1000	300	-

<sup>a</sup> Los valores de IC<sub>50</sub> son la media de tres determinaciones independientes. Los valores de A<sub>máx</sub> estuvieron entre 0.8 y 1.5. Las combinaciones homólogas se han resaltado en negrita. <sup>b</sup> Concentración de anticuerpo expresada en ng/mL. <sup>c</sup> Concentración de conjugado de HRP expresada en ng/mL. <sup>d</sup> Valores expresados en nM. <sup>e</sup> No se obtuvo señal.

En este formato de ensayo, la mayoría de anticuerpos derivados del hapteno FP $\alpha$  fueron incapaces de reconocer ningún trazador, ni tan siquiera el homólogo. Este

resultado sugiere que dichos anticuerpos son altamente susceptibles a desnaturalizarse tras la adsorción pasiva a la superficie de los pocillos. En cambio, el anticuerpo *FPa#12* reconoció débilmente al conjugado homólogo y en mayor medida al conjugado heterólogo *HRP-FPh $\alpha$ '* (con homología en la posición del brazo espaciador), dando lugar a ensayos de una sensibilidad igualmente elevada. En lo que respecta a los anticuerpos derivados del hapteno *FPb*, todos ellos reconocieron al trazador homólogo de forma eficaz, a la vista de los reducidos valores de las concentraciones óptimas de inmunorreactivos, y dieron lugar a ensayos de muy buena sensibilidad, reflejada en los valores de  $IC_{50}$  de orden nanomolar o incluso inferior. Este fue el caso del mAb *FPb#12* a 1000 ng/mL ensayado frente al trazador homólogo a 30 ng/mL, con un excelente valor de  $IC_{50}$  de 0.75 nM e indicativo de una elevada afinidad del anticuerpo hacia fluopyram. Este fue claramente el inmunoensayo más sensible desarrollado en este formato con anticuerpos monoclonales para fluopyram. Además, los anticuerpos *FPb#220*, *FPb#223* y *FPb#32* también reconocieron al conjugado heterólogo *HRP-FPhb* (con homología en la posición del brazo espaciador), y en el caso de los dos últimos fue posible mejorar la sensibilidad respecto a los ensayos homólogos a cambio de emplear una mayor concentración de trazador enzimático. Estas tendencias en el reconocimiento de conjugados homólogos y heterólogos son similares a las observadas con pAbs (sección 3.4.2.1), y ponen de manifiesto nuevamente la importancia de la posición del brazo espaciador en el proceso de reconocimiento molecular. Del mismo modo, la mayor limitación en la respuesta a conjugados heterólogos con mAbs respecto a lo observado con policlonales podría estar relacionada con el hecho de que los primeros sólo reconocen un epítipo, mientras que los segundos pueden reconocer varios debido a que están formados por una mezcla de inmunoglobulinas con diferentes afinidades y especificidades.

La evaluación de la afinidad de los mAbs generados para penthiopyrad arrojó los resultados que se muestran en la Tabla 3.13. La gran mayoría de anticuerpos de esta familia reconocieron a sus respectivos trazadores homólogos con mayor o menor afinidad, siendo ésta especialmente elevada en el caso del anticuerpo *PPa#311*, con el que se obtuvo señal incluso empleando 10 ng/mL de trazador en pocillos tapizados a 300 ng/mL de mAb. Las únicas excepciones a este comportamiento fueron los anticuerpos *PPa#21* y *PPm#412*, ya que ninguno de ellos reconoció el conjugado homólogo. De hecho, este último anticuerpo no reconoció ninguno de los trazadores ensayados, mientras que el anticuerpo *PPa#21* sólo reconoció débilmente al trazador

heterólogo HRP-PPb, dando lugar a un ensayo de sensibilidad moderada hacia penthiopyrad. Esto indica de nuevo una cierta tendencia de ambos mAbs a desnaturalizarse en el proceso de adsorción pasiva previo a la realización del inmunoensayo. Por otra parte, la concentración de trazador homólogo necesaria para lograr una señal máxima adecuada fue generalmente inferior para anticuerpos de la familia PPa, indicando que éstos reconocieron en mayor medida al trazador homólogo que los anticuerpos derivados del hapteno PPM.

**Tabla 3.13.** Caracterización de los anticuerpos monoclonales obtenidos para penthiopyrad mediante ELISA competitivo bidimensional en formato directo con conjugados homólogos y heterólogos.<sup>a</sup>

mAb <sup>b</sup>	Trazador enzimático									
	HRP-PPa		HRP-PPb		HRP-PPm		HRP-PPd'		HRP-PPo	
	[HRP] <sup>c</sup>	IC <sub>50</sub> <sup>d</sup>	[HRP]	IC <sub>50</sub>	[HRP]	IC <sub>50</sub>	[HRP]	IC <sub>50</sub>	[HRP]	IC <sub>50</sub>
PPa#12	<b>10</b>	<b>4.07</b>	300	- <sup>e</sup>	300	-	300	-	300	-
PPa#21	<b>300</b>	-	100	15.76	300	-	300	-	300	-
PPa#27	<b>10</b>	<b>58.76</b>	300	-	300	-	300	-	300	-
PPa#28	<b>30</b>	<b>2.62</b>	100	2.56	300	-	300	-	300	-
PPa#210	<b>100</b>	<b>5.38</b>	300	-	300	-	300	-	300	-
PPa#216	<b>100</b>	<b>3.24</b>	300	-	300	-	300	-	300	-
PPa#311	<b>10</b>	<b>5.61</b> <sup>f</sup>	300	-	300	-	300	-	300	-
PPa#323	<b>10</b>	<b>1.16</b>	300	-	300	-	300	-	300	-
PPm#11	300	-	30	0.78	<b>300</b>	<b>0.64</b>	300	-	300	-
PPm#13	300	-	300	2.27	<b>100</b>	<b>2.29</b>	300	-	300	-
PPm#43	300	-	100	0.61 <sup>f</sup>	<b>300</b>	<b>0.57</b> <sup>f</sup>	300	1.32	10	1.77
PPm#47	300	-	30	0.74	<b>30</b>	<b>1.17</b>	300	-	300	0.78
PPm#410	300	-	100	0.46	<b>100</b>	<b>0.32</b>	300	-	300	-
PPm#412	300	-	300	-	<b>300</b>	-	300	-	300	-

<sup>a</sup> Los valores de IC<sub>50</sub> son la media de tres determinaciones independientes. Los valores de A<sub>máx</sub> estuvieron entre 0.8 y 1.5. Las combinaciones homólogas se han resaltado en negrita. <sup>b</sup> Salvo que se indique otro valor, en el tapizado se empleó una concentración de anticuerpo de 1000 ng/mL. <sup>c</sup> Concentración de conjugado de HRP expresada en ng/mL. <sup>d</sup> Valores expresados en nM. <sup>e</sup> No se obtuvo señal. <sup>f</sup> En el tapizado se empleó una concentración de anticuerpo de 300 ng/mL.

En cuanto al reconocimiento de penthiopyrad en ensayos con conjugado homólogo, el mAb PPa#27 mostró una afinidad moderada hacia el fungicida, mientras que ésta fue elevada o muy elevada en el resto de los casos, característica reflejada en valores de IC<sub>50</sub> inferiores a 10 nM o incluso a 1 nM. Así, sin necesidad de emplear conjugados heterólogos, los ensayos con los anticuerpos PPm#11, PPm#43 y PPm#410

frente al trazador HRP-PP $m$  presentaron una extraordinaria sensibilidad hacia penthiopyrad. Esta tendencia, ya intuida en la caracterización de anticuerpos policlonales (sección 3.4.2.1), pone de manifiesto la mayor idoneidad del hapteno PP $m$  para la obtención de anticuerpos de muy elevada afinidad hacia penthiopyrad, probablemente debido a la gran similitud estructural que guarda con el fungicida.

Respecto al reconocimiento de conjugados heterólogos, ninguno de los mAbs derivados del hapteno PP $a$  reconoció al trazador HRP-PP $m$ , al igual que sucedió con los mAbs de tipo PP $m$  hacia el trazador HRP-PP $a$ . Por su parte, el conjugado HRP-PP $b$  (con brazo espaciador lineal) proporcionó señal con todos los mAbs de la familia PP $m$  (con espaciador ramificado en posición homóloga) excepto con PP $m$ #412, e incluso con alguno de los anticuerpos derivados de PP $a$  (con espaciador en el anillo opuesto al homólogo). Mientras que en el caso del mAb PP $m$ #13 fue necesario incrementar la concentración de trazador, ésta pudo mantenerse igual a la del ensayo homólogo con los mAbs PP $m$ #47 y PP $m$ #410. En cambio, con los anticuerpos PP $m$ #11 y PP $m$ #43 se observó un resultado atípico, ya que se obtuvo una señal máxima similar empleando una menor concentración de trazador. Esto sugiere que dichos mAbs reconocen ligeramente mejor el conjugado heterólogo HRP-PP $b$  que el homólogo.

En sintonía con los resultados observados con pAbs (sección 3.4.2.1), el trazador HRP-PP $d'$  prácticamente no fue reconocido, probablemente debido a los cambios conformacionales que induce el cambio de posición del brazo espaciador y su diferente ramificación. Por último, el conjugado HRP-PP $o$  únicamente mostró interacción con los anticuerpos PP $m$ #43 y PP $m$ #47, siendo la unión relativamente intensa con el primero, ya que se obtuvo señal empleando 10 ng/mL de conjugado, mientras que con el segundo fue necesario incrementar la concentración de trazador respecto al ensayo homólogo para lograr una señal máxima similar.

El uso de conjugados heterólogos permitió en algunos casos una mejora adicional de la sensibilidad respecto a los ensayos homólogos. Así, el anticuerpo PP $m$ #47 dio lugar a ensayos con valores de IC<sub>50</sub> inferiores a 1 nM al enfrentarse a los conjugados heterólogos HRP-PP $b$  y HRP-PP $o$ . Sin embargo, ninguna combinación dio lugar a un ensayo más sensible hacia penthiopyrad que el resultante de utilizar el mAb PP $m$ #410 a 1000 ng/mL junto con el trazador homólogo a 100 ng/mL, con un valor de IC<sub>50</sub> de 0.32 nM.

Una vez caracterizados todos los mAbs generados hacia los dos fungicidas de estudio, se puso el foco en las combinaciones de anticuerpos y conjugados que dieron lugar a los ensayos más sensibles empleando el formato directo. En este sentido, en la Tabla 3.14 se recogen los parámetros de las curvas estándar y las concentraciones de inmunorreactivos para las combinaciones más destacables.

**Tabla 3.14.** Concentraciones óptimas de inmunorreactivos y parámetros de las curvas estándar de los mejores ensayos en formato directo obtenidas con los anticuerpos monoclonales seleccionados para fluopyram y penthiopyrad.<sup>a</sup>

mAb	[mAb] <sup>c</sup>	Trazador enzimático	[HRP] <sup>d</sup>	Parámetros de la curva <sup>b</sup>		
				A <sub>máx</sub>	Pendiente <sup>e</sup>	IC <sub>50</sub> (nM)
<b>FPb#12</b>	<b>1000</b>	<b>HRP-FPb</b>	<b>30</b>	<b>1.38 ± 0.31</b>	<b>-1.38 ± 0.20</b>	<b>0.75 ± 0.10</b>
FPb#220	300	HRP-FPb	10	0.86 ± 0.01	-0.75 ± 0.08	2.42 ± 0.71
	1000	HRP-FPhb	30	1.49 ± 0.04	-1.33 ± 0.06	2.83 ± 0.29
FPb#223	300	HRP-FPhb	100	0.91 ± 0.11	-0.81 ± 0.05	1.54 ± 0.62
PPm#11	1000	HRP-PPb	30	0.88 ± 0.27	-1.35 ± 0.18	0.78 ± 0.04
	1000	HRP-PPm	300	1.44 ± 0.20	-0.97 ± 0.05	0.64 ± 0.13
PPm#43	300	HRP-PPb	100	1.02 ± 0.13	-0.93 ± 0.03	0.61 ± 0.09
	300	HRP-PPm	300	0.87 ± 0.13	-1.13 ± 0.14	0.57 ± 0.05
PPm#47	1000	HRP-PPb	30	0.81 ± 0.11	-1.19 ± 0.15	0.74 ± 0.09
	1000	HRP-PPo	300	1.06 ± 0.06	-1.18 ± 0.28	0.78 ± 0.02
PPm#410	1000	HRP-PPb	100	0.92 ± 0.23	-1.84 ± 0.43	0.46 ± 0.05
	<b>1000</b>	<b>HRP-PPm</b>	<b>100</b>	<b>0.95 ± 0.24</b>	<b>-1.67 ± 0.08</b>	<b>0.32 ± 0.06</b>

<sup>a</sup> En negrita se ha resaltado el ensayo más sensible para cada fungicida. <sup>b</sup> Los valores se expresan como media y desviación estándar de tres determinaciones independientes. Los valores de A<sub>mín</sub> fueron siempre inferiores a 0.05. <sup>c</sup> Concentración de anticuerpo monoclonal expresada en ng/mL. <sup>d</sup> Concentración de conjugado de HRP expresada en ng/mL. <sup>e</sup> Pendiente de la curva en el punto de inflexión.

Se escogieron concentraciones de inmunorreactivos que proporcionaban señales máximas en torno a la unidad. Los valores de IC<sub>50</sub> de los ensayos seleccionados muestran que es posible desarrollar inmunoensayos de elevada sensibilidad para los dos fungicidas estudiados. Los valores de la pendiente de las curvas estándar para mAbs resultaron ser ligeramente superiores a los observados con policlonales, como es habitual, con valores típicos entre -0.9 y -1.2 en la mayoría de los casos. Sin embargo, los anticuerpos FPb#12 y PPm#410, que aportaron los valores de IC<sub>50</sub> más bajos, presentaron curvas con pendientes relativamente elevadas. A pesar del inconveniente

que podría suponer una pendiente tan elevada en la amplitud del rango de trabajo, los ensayos de los anticuerpos FPb#12 y PPM#410 frente a sus conjugados homólogos resultaron ser altamente prometedores para el desarrollo de inmunoensayos de elevada sensibilidad para los fungicidas de estudio.

### 3.5.2.2. Formato de conjugado inmovilizado con detección indirecta

Para la caracterización de mAbs mediante ELISA competitivo en formato indirecto, las superficies de los pocillos de las microplacas se recubrieron inicialmente con conjugado OVA–hapteno a partir de disoluciones a dos concentraciones (100 y 1000 ng/mL), y la competición se llevó a cabo evaluando la curva estándar de analito frente a seis concentraciones de anticuerpo (1, 3, 10, 30, 100 y 300 ng/mL). Los resultados obtenidos a partir del estudio de los mAbs generados para el fungicida fluopyram frente a los cuatro conjugados de tapizado preparados se resumen en la Tabla 3.15.

**Tabla 3.15.** Caracterización de los anticuerpos monoclonales obtenidos para fluopyram mediante ELISA competitivo bidimensional en formato indirecto con conjugados homólogos y heterólogos.<sup>a</sup>

mAb	Conjugado de tapizado											
	OVA-FPa			OVA-FPb			OVA-FPha'			OVA-FPhb		
	[mAb] <sup>b</sup>	[OVA] <sup>c</sup>	IC <sub>50</sub> <sup>d</sup>	[mAb]	[OVA]	IC <sub>50</sub>	[mAb]	[OVA]	IC <sub>50</sub>	[mAb]	[OVA]	IC <sub>50</sub>
FPa#11	<b>30</b>	<b>1000</b>	<b>19.31</b>	300	1000	- <sup>e</sup>	300	1000	3.79	300	1000	-
FPa#12	<b>300</b>	<b>100</b>	<b>5.40</b>	300	1000	-	300	100	6.81	300	1000	-
FPa#21	<b>100</b>	<b>1000</b>	<b>31.00</b>	300	1000	-	300	1000	-	300	1000	-
FPa#31	<b>300</b>	<b>100</b>	<b>28.26</b>	300	1000	-	300	1000	-	300	1000	-
FPa#37	<b>100</b>	<b>1000</b>	<b>4.63</b>	300	1000	-	300	1000	-	300	1000	-
FPb#12	300	1000	-	<b>30</b>	<b>1000</b>	<b>1.48</b>	300	1000	-	30	1000	0.53
FPb#220	300	1000	-	<b>30</b>	<b>100</b>	<b>3.62</b>	300	1000	-	100	100	2.07
FPb#223	300	1000	-	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>4.77</b>	300	1000	-	30	100	2.21
FPb#32	300	1000	-	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>12.81</b>	300	100	3.14	100	100	5.29
FPb#36	300	1000	-	<b>300</b>	<b>100</b>	<b>7.33</b>	300	1000	-	300	1000	-

<sup>a</sup> Los valores de IC<sub>50</sub> son la media de tres determinaciones independientes. Los valores de A<sub>máx</sub> estuvieron entre 0.8 y 1.5. Las combinaciones homólogas se han resaltado en negra. <sup>b</sup> Concentración del anticuerpo expresada en ng/mL. <sup>c</sup> Concentración de conjugado de OVA expresada en ng/mL. <sup>d</sup> Valores expresados en nM. <sup>e</sup> No se obtuvo señal.

Todos los anticuerpos generados respondieron en mayor o menor medida a la presencia del conjugado homólogo para lograr una señal máxima adecuada en los ensayos. La ausencia de reconocimiento del conjugado homólogo no fue de esperar,

teniendo en cuenta que la selección de sus respectivos hibridomas productores se había realizado previamente mediante la evaluación de los sobrenadantes de cultivo con este mismo formato. La afinidad de los mAbs hacia fluopyram fue elevada, ya que los valores de  $IC_{50}$  obtenidos con el conjugado homólogo fueron en todos los casos de orden nanomolar. Por otra parte, la afinidad de los anticuerpos de la familia FP*b* fue generalmente superior, una tendencia que ya se había observado en la evaluación de los pAbs en este formato (3.4.2.2), lo que indicaría que el hapteno FP*b* es ligeramente más idóneo para la generación de anticuerpos adecuados para el desarrollo de inmunoensayos de elevada sensibilidad hacia fluopyram. De nuevo, el comportamiento del anticuerpo FP*b*#12 destacó sobre el resto, ya que dio lugar al ensayo más sensible con conjugado homólogo.

El reconocimiento de conjugados heterólogos fue relativamente limitado, lo que es habitual con mAbs. En general, los anticuerpos de tipo FP*a* no reconocieron los conjugados heterólogos OVA–FP*b* ni OVA–FP*hb* (con el brazo espaciador en el anillo opuesto respecto al homólogo), y sólo algunos de ellos mostraron reconocimiento del conjugado heterólogo OVA–FP*ha'* (con el brazo espaciador en posición homóloga). Del mismo modo, los anticuerpos derivados del hapteno FP*b* no reconocieron los conjugados OVA–FP*a* ni OVA–FP*ha'*, pero la mayoría respondieron a la presencia del conjugado heterólogo OVA–FP*hb*. Entre ellos llamó la atención el anticuerpo FP*b*#223, que pareció reconocer este conjugado heterólogo con mayor afinidad que el homólogo, teniendo en cuenta que fue necesaria una menor concentración de mAb para lograr una señal máxima adecuada. Otro caso a destacar fue el del anticuerpo FP*b*#32, que fue inesperadamente capaz de reconocer el conjugado heterólogo OVA–FP*ha'*, a pesar de tener el brazo espaciador en posición opuesta.

A diferencia de lo observado en el formato directo, prácticamente todos los ensayos en los que el conjugado heterólogo fue reconocido dieron lugar a una mejora apreciable de la sensibilidad hacia el analito respecto al ensayo con el conjugado homólogo. Dos ejemplos muy evidentes de esta situación se observaron cuando se utilizó el conjugado OVA–FP*ha'* con los anticuerpos FP*a*#11 y FP*b*#32, lo que dio lugar a una sensibilidad respectivamente 5 y 4 veces mayor que la observada frente al conjugado homólogo a cambio de aumentar la concentración de anticuerpo. En algunos casos, el aumento de sensibilidad tuvo lugar sin necesidad de utilizar una mayor concentración de anticuerpo o conjugado en el ensayo, como sucedió con el anticuerpo FP*b*#32 frente al conjugado heterólogo OVA–FP*hb*, con el que el valor de

IC<sub>50</sub> se redujo aproximadamente 2.5 veces respecto al ensayo homólogo. Esta misma heterología con el mAb FPb#12 dio lugar al ensayo más sensible en este formato, con un excelente valor de IC<sub>50</sub> de 0.53 nM. Dicho anticuerpo también había dado lugar al ensayo más sensible en el formato directo, por lo que quedó patente su extraordinaria afinidad hacia fluopyram.

Siguiendo la misma estrategia, se evaluó la afinidad de los mAbs para penthiopyrad en este formato de ensayo, empleando para ello los cinco conjugados de tapizado disponibles para este analito. Los resultados se recogen en la Tabla 3.16.

**Tabla 3.16.** Caracterización de los anticuerpos monoclonales obtenidos para penthiopyrad mediante ELISA competitivo bidimensional en formato indirecto con conjugados homólogos y heterólogos.<sup>a</sup>

mAb	Conjugado de tapizado <sup>b</sup>									
	OVA-PPa		OVA-PPb		OVA-PPm		OVA-PPd'		OVA-PPo	
	[mAb] <sup>c</sup>	IC <sub>50</sub> <sup>d</sup>	[mAb]	IC <sub>50</sub>						
PPa#12	<b>100</b>	<b>1.94</b>	300 <sup>e</sup>	- <sup>f</sup>	100 <sup>e</sup>	5.37	300 <sup>e</sup>	-	300 <sup>e</sup>	-
PPa#21	<b>100</b>	<b>20.41</b>	30	18.51	30	16.42	100 <sup>e</sup>	11.52	30 <sup>e</sup>	18.13
PPa#27	<b>100</b>	<b>31.16</b>	300 <sup>e</sup>	-						
PPa#28	<b>30</b>	<b>2.28</b>	30	3.05	30	2.36	300 <sup>e</sup>	-	30 <sup>e</sup>	2.29
PPa#210	<b>100</b>	<b>15.53</b>	100	15.02	100	17.27	300 <sup>e</sup>	-	300	7.90
PPa#216	<b>100<sup>e</sup></b>	<b>6.37</b>	300 <sup>e</sup>	-						
PPa#311	<b>10</b>	<b>2.94</b>	30 <sup>e</sup>	0.59	30	1.37	300 <sup>e</sup>	-	300 <sup>e</sup>	-
PPa#323	<b>100</b>	<b>2.05</b>	30 <sup>e</sup>	1.10	100	1.22	300 <sup>e</sup>	-	300 <sup>e</sup>	-
PPm#11	300 <sup>e</sup>	-	30	2.24	<b>30</b>	<b>2.59</b>	30 <sup>e</sup>	1.20	10 <sup>e</sup>	1.91
PPm#13	300 <sup>e</sup>	-	30	5.53	<b>30</b>	<b>7.07</b>	100	1.71	30 <sup>e</sup>	4.16
PPm#43	300 <sup>e</sup>	-	10	2.33	<b>30</b>	<b>3.01</b>	30 <sup>e</sup>	0.68	30	4.21
PPm#47	300 <sup>e</sup>	-	30	1.17	<b>30</b>	<b>2.45</b>	30 <sup>e</sup>	0.49	100	1.34
PPm#410	300 <sup>e</sup>	-	30	0.57	<b>100</b>	<b>1.24</b>	100	0.30	100	0.63
PPm#412	300 <sup>e</sup>	-	300	3.47	<b>300</b>	<b>5.01</b>	300 <sup>e</sup>	-	300	7.13

<sup>a</sup> Los valores de IC<sub>50</sub> son la media de tres determinaciones independientes. Los valores de A<sub>máx</sub> estuvieron entre 0.8 y 1.5. Las combinaciones homólogas se han resaltado en negrita. <sup>b</sup> Salvo que se indique otro valor, en el tapizado se empleó una concentración de conjugado de OVA de 100 ng/mL. <sup>c</sup> Factor de dilución del anticuerpo ×10<sup>3</sup>. <sup>d</sup> Valores expresados en nM. <sup>e</sup> Se empleó una concentración de conjugado de OVA de 1000 ng/mL. <sup>f</sup> No se observó reducción de la señal en presencia de analito.

Como era de esperar, todos los anticuerpos reconocieron su conjugado homólogo, siendo ligeramente más intensa la interacción con mAbs de la familia PPm, ya que generalmente con ellos fue necesaria una menor concentración de anticuerpo para lograr una señal máxima similar. Además, concentraciones de penthiopyrad de orden

nanomolar fueron suficientes para inhibir la interacción con los conjugados homólogos en todos los casos, demostrando de nuevo la elevada afinidad de los anticuerpos hacia el fungicida. Dichos valores parecieron indicar igualmente un reconocimiento ligeramente más intenso de penthiopyrad por parte de los anticuerpos de la familia P*Pm*. Sin embargo, si no se consideran los resultados obtenidos en los ensayos homólogos con los anticuerpos P*Pa*#21, P*Pa*#27 y P*Pa*#28, todos procedentes del mismo ratón, la respuesta hacia el fungicida fue muy similar con ambas familias de anticuerpos. Esta última conclusión constituiría un resultado más similar a lo observado en la evaluación de pAbs para penthiopyrad en este formato de ensayo (sección 3.4.2.2). En cualquier caso, el mAb P*Pm*#410 dio lugar al ensayo más sensible con conjugado homólogo, al igual que en el formato directo.

Los mAbs generados para penthiopyrad, como los de fluopyram, también fueron capaces de reconocer conjugados heterólogos en mayor medida que en el formato directo. Así, gran parte de los anticuerpos de tipo P*Pa* reconocieron los conjugados heterólogos de posición OVA-P*Pb* y OVA-P*Pm*, y algunos de ellos también respondieron a la presencia de OVA-P*Pd'* y OVA-P*Po*. Por su parte, los mAbs derivados del hapteno P*Pm* reconocieron todos los conjugados heterólogos salvo OVA-P*Pa*, si bien la mayoría de anticuerpos de tipo P*Pa* sí que se unieron al conjugado OVA-P*Pm*. A diferencia de lo que sucedió con pAbs, y aunque en casi todos los casos fue necesario incrementar las concentraciones de inmunorreactivos, los mAbs derivados de este hapteno sí reconocieron el conjugado OVA-P*Pd'*, a pesar de la importante modificación estructural del hapteno respecto a penthiopyrad (Figura 3.11, sección 3.2.5).

La heterología permitió un cierto aumento de sensibilidad en la mayoría de los casos, siendo éste considerable en algunos de ellos. Así, destaca el uso del conjugado heterólogo OVA-P*Pb* frente a los mAbs P*Pa*#311 y P*Pm*#410, que originó ensayos con excelentes valores subnanomolares de IC<sub>50</sub>. Lo mismo sucedió cuando se utilizó el conjugado heterólogo OVA-P*Pd'* con los mAbs P*Pm*#43, P*Pm*#47 y P*Pm*#410. De hecho, para este último anticuerpo fue posible mejorar considerablemente la sensibilidad del ensayo homólogo empleando cualquiera de los conjugados heterólogos, siendo el ensayo frente al conjugado OVA-P*Pd'* el de mayor sensibilidad hacia el analito, con un excelente valor de IC<sub>50</sub> de 0.30 nM. La afinidad aparente del mAb P*Pm*#410 también aumentó cuando éste se enfrentó al conjugado OVA-P*Po*,

constituyendo éste el único ejemplo relevante de mejora de sensibilidad con este conjugado heterólogo.

Completada la caracterización de los mAbs mediante ELISA competitivo en formato indirecto, y con vistas al desarrollo de inmunoensayos, se localizaron las parejas anticuerpo/conjugado que dieron lugar a los ensayos de mayor sensibilidad hacia el fungicida correspondiente. En la Tabla 3.17 se han incluido los parámetros de los ensayos de mayor interés obtenidos en este formato.

**Tabla 3.17.** Concentraciones óptimas de inmunorreactivos y parámetros de las curvas estándar de los mejores ensayos en formato indirecto obtenidas con los anticuerpos monoclonales seleccionados para fluopyram y penthiopyrad.<sup>a</sup>

mAb	[mAb] <sup>c</sup>	Conjugado de tapizado	[OVA] <sup>d</sup>	Parámetros de la curva <sup>b</sup>		
				A <sub>máx</sub>	Pendiente <sup>e</sup>	IC <sub>50</sub> (nM)
<b>FPb#12</b>	30	OVA-FPb	1000	1.00 ± 0.17	-0.89 ± 0.06	1.48 ± 0.21
	<b>30</b>	<b>OVA-FPhb</b>	<b>1000</b>	<b>0.82 ± 0.10</b>	<b>-1.27 ± 0.11</b>	<b>0.53 ± 0.11</b>
FPb#220	30	OVA-FPb	100	1.13 ± 0.16	-0.83 ± 0.06	3.62 ± 0.46
	100	OVA-FPhb	100	1.46 ± 0.05	-1.03 ± 0.04	2.07 ± 0.51
FPb#223	100	OVA-FPb	100	1.26 ± 0.03	-1.09 ± 0.09	4.77 ± 0.16
	30	OVA-FPhb	100	0.86 ± 0.07	-1.03 ± 0.06	2.21 ± 0.39
PPa#311	30	OVA-PPb	1000	1.47 ± 0.10	-1.17 ± 0.26	0.59 ± 0.20
PPm#43	30	OVA-PPd'	1000	1.38 ± 0.13	-0.94 ± 0.09	0.68 ± 0.13
PPm#47	30	OVA-PPd'	1000	1.18 ± 0.31	-1.03 ± 0.08	0.49 ± 0.04
<b>PPm#410</b>	30	OVA-PPb	100	0.82 ± 0.23	-1.79 ± 0.35	0.57 ± 0.03
	<b>100</b>	<b>OVA-PPd'</b>	<b>100</b>	<b>0.97 ± 0.34</b>	<b>-1.50 ± 0.21</b>	<b>0.30 ± 0.02</b>
	100	OVA-PPo	100	1.40 ± 0.46	-1.23 ± 0.19	0.63 ± 0.13

<sup>a</sup> En negrita se ha resaltado el ensayo más sensible para cada fungicida. <sup>b</sup> Los valores se expresan como media y desviación estándar de tres determinaciones independientes. Los valores de A<sub>mín</sub> fueron siempre inferiores a 0.05. <sup>c</sup> Concentración de anticuerpo monoclonal expresada en ng/mL. <sup>d</sup> Concentración de conjugado de OVA expresada en ng/mL. <sup>e</sup> Pendiente de la curva en el punto de inflexión.

Al igual que se observó en el formato directo, algunos mAbs dieron lugar a inmunoensayos competitivos en formato indirecto altamente sensibles a la presencia de los fungicidas fluopyram y penthiopyrad, siendo posible alcanzar valores de IC<sub>50</sub> inferiores a 1 nM para ambos analitos. Estos resultados mejoraron por tanto los obtenidos con policlonales, en especial en lo que respecta a fluopyram.

Otro resultado a destacar fue que, mientras que en el formato directo se obtuvieron ensayos de mayor sensibilidad empleando conjugados homólogos, en el formato indirecto los mejores inmunoensayos se observaron cuando se combinaron los anticuerpos de mayor afinidad con conjugados heterólogos. Esta observación está relacionada con las ya comentadas limitaciones que suelen observarse en el formato directo en lo que respecta al reconocimiento de conjugados heterólogos, mucho más acusadas con mAbs debido probablemente al hecho de que reconocen un solo epítipo.

Por último, las pendientes de las curvas estándar siguieron una tendencia equivalente a la descrita en el formato directo. De este modo, la mayoría de sus valores se situaron como es habitual entre  $-0.9$  y  $-1.2$ , mientras que para algunos de los inmunoensayos más sensibles la pendiente fue más elevada de lo esperado. Un caso a destacar fue la combinación del anticuerpo PPM#410 y el conjugado OVA-PPd', que originó una curva con una pendiente de  $-1.79$ , bastante alejada del valor deseable de compromiso 1. Por su parte, las combinaciones FPb#12/OVA-FPhb y PPM#410/OVA-PPd' dieron lugar a curvas de pendientes  $-1.27$  y  $-1.50$ , respectivamente. Aunque en estos ensayos la pendiente fue algo superior a lo deseable, la sensibilidad hacia los analitos fue la máxima encontrada, por lo que fueron muy buenos candidatos para constituir los inmunoensayos definitivamente desarrollados.

### **3.5.3. Especificidad de los anticuerpos monoclonales**

Mediante la misma estrategia que se empleó con los pAbs, se evaluó la especificidad de los mAbs generados determinando su reactividad cruzada hacia compuestos relacionados. Los compuestos estudiados fueron los mismos que se emplearon en el estudio con policlonales, es decir, los metabolitos y fungicidas de la misma familia y de familias diferentes cuyas estructuras se recogen en la Figura 3.14 (sección 3.4.3, página 143). La especificidad se determinó mediante ELISA competitivo indirecto con conjugado homólogo en las condiciones óptimas determinadas para cada pareja mAb/conjugado, evaluando en una misma microplaca las curvas estándar del analito y de los compuestos para los que se deseaba determinar la reactividad cruzada. Los resultados obtenidos se recogen en la Tabla 3.18.

**Tabla 3.18.** Reactividad cruzada de los anticuerpos monoclonales de fluopyram (FP) y penthiopyrad (PP).

mAb	Reactividad cruzada (%) <sup>a</sup>													
	FP	PP	FX	M25	FC	BL	FH	CD	PM	FD	AZ	TF	PY	TE
FPa#11	100	0 <sup>b</sup>	0	0	2.60	0	0	0	- <sup>c</sup>	0	0	0	-	0
FPa#12	100	2.35	0	0	1.47	0	0	0	-	0	0	0	-	0
FPa#21	100	0	0	0	13.97	0	0	0	-	0	0	0	-	0
FPa#31	100	0	0	0	8.01	0	0	0	-	0	0	0	-	0
FPa#37	100	0	0	0	3.91	0	0	0	-	0	0	0	-	0
FPb#12	100	0	0	0	0.03	0	0.01	0	-	0	0	0	-	0
FPb#220	100	0.13	0.90	0	0.35	0	0	0	-	0	0	0	-	0
FPb#223	100	0.05	0	0	0	0	0	0	-	0	0	0	-	0
FPb#32	100	0	0	0	0	0	0	0	-	0	0	0	-	0
FPb#36	100	0	0	0	0	0	0	0	-	0	0	0	-	0
PPa#12	0	100	0	-	0	0	0	0	0	0	0	-	0	0
PPa#21	0	100	2.19	-	0	0	0	0	0	0	0	-	0	0
PPa#27	0	100	0	-	0	0	0	0	0	0	0	-	0	0
PPa#28	0	100	0.06	-	0	0	0	0	0	0	0	-	0	0
PPa#210	0	100	0.13	-	0	0	0	0	0	0	0	-	0	0
PPa#216	0	100	0	-	0	0	0	0	0	0	0	-	0	0
PPa#311	0	100	0	-	0	0	0	0	0	0	0	-	0	0
PPa#323	0	100	0.01	-	0	0	0	0	0	0	0	-	0	0
PPm#11	0.02	100	0.64	-	0	0.01	0	0	0	0	0	-	0	0
PPm#13	0	100	0.20	-	0	0	0	0	0	0	0	-	0	0
PPm#43	0	100	8.54	-	0	0.06	0	0	0	0	0	-	0	0
PPm#47	0	100	1.92	-	0	0	0	0	0	0	0	-	0	0
PPm#410	0	100	0.75	-	0	0	0	0	0	0	0	-	0	0
PPm#412	0	100	0.05	-	0	0	0	0	0	0	0	-	0	0

<sup>a</sup> Los valores corresponden a la media de tres determinaciones independientes. Las abreviaturas de los fungicidas son las mismas que las que se emplean en la Figura 3.14. <sup>b</sup> No se observó reducción de la señal a una concentración de 10<sup>5</sup> nM o bien la reactividad cruzada fue inferior al 0.01%. <sup>c</sup> Ensayo no realizado.

A nivel cualitativo, los resultados observados fueron similares a los encontrados con pAbs (sección 3.4.3). En general, gran parte de los compuestos estudiados no fueron reconocidos por ninguno de los anticuerpos, mientras que para algunos de ellos se observó un cierto reconocimiento sistemático por parte de los anticuerpos derivados del mismo hapteno. A nivel cuantitativo, sin embargo, los valores de reactividad cruzada fueron superiores con algunos monoclonales.

El fungicida fluopicolide (FC) fue considerablemente reconocido por todos los anticuerpos de tipo FP $\alpha$ , con un destacable 14% de reactividad cruzada para el mAb FP $\alpha$ #21, mientras que este comportamiento sólo fue observado con dos de los anticuerpos derivados del hapteno FP $b$  y en mucha menor medida. Considerando las estructuras de fluopyram y fluopicolide, la existencia de elementos estructurales comunes a ambos fungicidas podría explicar el reconocimiento de fluopicolide por parte de los anticuerpos (Figura 3.14). No obstante, los mayores valores de reactividad cruzada de los anticuerpos derivados del hapteno FP $\alpha$  sugieren que, aparentemente, la parte reconocida de la estructura del hapteno es el entorno del anillo de piridina. Esta hipótesis parece contradecir el principio de Landsteiner, ya que según este principio se esperaría que el anillo homoaromático fuese la parte más reconocida por los anticuerpos de tipo FP $\alpha$  y no por los de tipo FP $b$ . Este resultado coincide con la reactividad cruzada observada con los pAbs de fluopyram. No obstante, la flexibilidad del puente alifático que une los dos anillos aromáticos puede favorecer el plegamiento del hapteno, de forma análoga a como se observa en el propio fluopyram (ver Figura 3.1, sección 3.1.1), posibilitando la exposición de los mismos elementos inmunogénicos con independencia de la posición de anclaje a la proteína en el inmunógeno. En cualquier caso, este resultado y la mayor afinidad de los anticuerpos de tipo FP $b$  remarcan la superioridad de este hapteno para generar anticuerpos con los que desarrollar inmunoensayos de elevada sensibilidad y selectividad hacia fluopyram.

Los fungicidas penthiopyrad y fluxapyroxad (FX), de la misma familia que fluopyram, fueron reconocidos en algunos casos, sin observarse tendencias respecto al hapteno empleado en la inmunización. Concretamente, el mAb FP $b$ #220 reconoció ligeramente ambos compuestos, mientras que FP $\alpha$ #12 mostró una reactividad cruzada del 2.4% hacia penthiopyrad. Estos resultados se explicarían por la cierta similitud existente entre los anillos de pirazol de penthiopyrad y fluxapyroxad y el grupo 2-(trifluorometil)benzoilo de fluopyram. No obstante, y al igual que sucedió con los pAbs, el metabolito M25 no fue reconocido por ninguno de los mAbs, a pesar de presentar exactamente la misma agrupación 2-(trifluorometil)benzoilo de fluopyram.

Así como el fungicida fluopicolide fue el compuesto más frecuentemente reconocido por los anticuerpos para fluopyram, el fungicida fluxapyroxad ocupó este puesto en el caso de los anticuerpos generados para penthiopyrad. Este compuesto fue ligeramente reconocido por algunos de los mAbs generados a partir del inmunógeno BSA-PP $\alpha$  y por todos los anticuerpos de la familia PP $m$ . Además, los

valores de reactividad cruzada, aun siendo bajos, fueron en general mayores para estos últimos, siendo la mayor reactividad cruzada del 8.5% para el mAb PPM#43. Estos resultados sí estarían de acuerdo con el principio de Landsteiner, ya que las estructuras de ambos fungicidas contienen un anillo de pirazol muy similar, y en el caso del hapteno PPM dicho anillo se sitúa en posición distal respecto al brazo espaciador. Por otra parte, el fungicida boscalid (BL) fue reconocido por los mAbs PPM#43 y PPM#11, y éste último respondió además a fluopyram. No obstante, la reactividad cruzada fue muy baja en ambos casos, siendo el mayor valor un 0.06% para la interacción PPM#43/boscalid.

Teniendo en cuenta la extraordinaria sensibilidad lograda con los inmunoensayos competitivos basados en los anticuerpos FPb#12 y PPM#410 descritos anteriormente, se tuvo en especial consideración la especificidad de dichos anticuerpos hacia sus respectivos analitos. De este modo, el mAb FPb#12 únicamente reconoció los fungicidas fluopicolide (FC) y fenhexamid (FH), pero afortunadamente lo hizo con reactividades cruzadas inferiores al 0.05% y por tanto prácticamente despreciables. Por su parte, el mAb PPM#410 respondió únicamente a la presencia de fluxapyroxad (FX), con una reactividad cruzada inferior al 1%. Por tanto, puede afirmarse que ambos anticuerpos fueron altamente específicos, lo que incrementó sus opciones a convertirse en los anticuerpos finalmente escogidos para el desarrollo de los inmunoensayos deseados.

#### **3.5.4. Determinación de constantes cinéticas y termodinámicas**

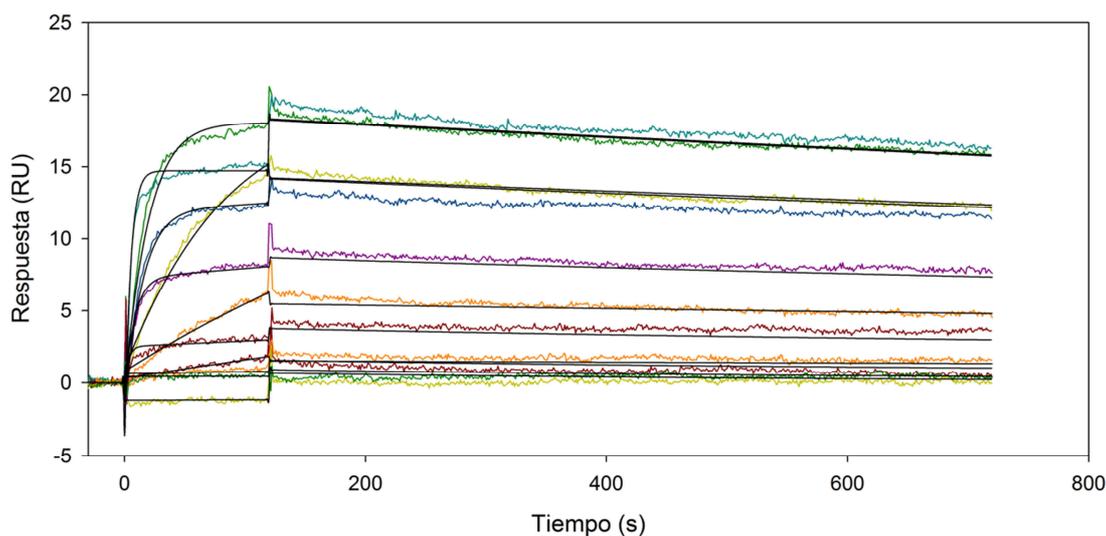
Desde el punto de vista más básico, cualquier proceso fisicoquímico puede describirse en términos cinéticos y termodinámicos, es decir, pueden estudiarse tanto la velocidad a la que tienen lugar como su tendencia a producirse. En este sentido, el estudio del reconocimiento de un antígeno por parte de un anticuerpo puede ser de interés para obtener mayor información sobre la interacción. Por ello, se exploraron diferentes posibilidades para llevar a cabo la caracterización cinética y termodinámica de los mAbs generados, por ser estos reactivos bien definidos y cuantificados. Como grupo de prueba, se escogieron los seis mAbs generados a partir del hapteno PPM.

#### 3.5.4.1. Estudio mediante resonancia de plasmones superficiales

En primer lugar, se exploró la determinación de las constantes de velocidad y de equilibrio deseadas mediante resonancia de plasmones superficiales (SPR), empleando para ello un equipo Biacore T100. El diseño experimental se hizo inicialmente de la forma más básica, es decir, inmovilizando los anticuerpos de interés sobre la superficie del chip y haciendo pasar un flujo de analito sobre ésta. A causa del bajo peso molecular del analito (penthiopyrad), fue necesario emplear chips especiales con una mayor capacidad de inmovilización para obtener una respuesta adecuada. Sin embargo, la falta de condiciones idóneas para regenerar la superficie, es decir, disociar rápidamente todo el analito sin causar pérdida de actividad en el anticuerpo inmovilizado, sumado al elevado coste de los chips y su escasa reusabilidad, llevaron a abandonar la estrategia inicial.

Para aumentar la versatilidad del chip, se optó por utilizar una estrategia de captura, para lo que se inmovilizó sobre su superficie un anticuerpo de cabra específico de inmunoglobulinas de ratón. El análisis se llevaría a cabo inyectando en una primera etapa el mAb a estudiar, y tras su captura se inyectaría el analito y se monitorizaría la interacción. Esta aproximación presentaba como ventajas principales tanto la potencial aplicabilidad a cualquier anticuerpo de ratón como la reducción de problemas a la hora de regenerar la superficie, que de hecho pudo llevarse a cabo correctamente mediante cambios bruscos del pH de corta duración. Sin embargo, la cantidad de mAb capturado no fue suficiente para obtener una respuesta detectable al hacer pasar disoluciones de analito, mientras que sí se obtuvo respuesta cuando se hicieron pasar disoluciones de los conjugados OVA-PPm y HRP-PPm.

Teniendo en cuenta los resultados anteriores, finalmente se decidió llevar a cabo ensayos competitivos en los que, tras la captura del mAb, se harían circular disoluciones de analito y conjugado HRP-PPm a diferentes proporciones. Se escogió este conjugado competidor por tener, según lo determinado mediante MALDI-TOF, una relación molar hapteno/proteína de 1 (Tabla 3.1, sección 3.3.2), lo que facilitaría el posterior ajuste al modelo de competición. De este modo, los sensogramas obtenidos (representación gráfica de la variación de la respuesta de SPR a lo largo del tiempo) serían los correspondientes a la interacción competitiva del anticuerpo con ambas especies. Como ejemplo, en la Figura 3.15 se incluyen los sensogramas obtenidos para el anticuerpo PPm#410 frente a concentraciones variables de penthiopyrad y de conjugado HRP-PPm.



**Figura 3.15.** Sensogramas obtenidos por captura del anticuerpo PPM#410 seguida de la inyección de mezclas de penthiopyrad y conjugado HRP-PPm en concentraciones variables entre 0 y 500 nM. Las líneas uniformes corresponden a las curvas obtenidas mediante ajuste matemático de los valores experimentales al modelo *Heterogeneous Analyte*.

Los sensogramas obtenidos en cada caso se ajustaron posteriormente al modelo de ensayo competitivo, denominado *Heterogeneous Analyte* en el ámbito de los equipos Biacore. Este modelo considera la competición de dos especies en disolución por unirse reversiblemente al ligando enlazado a la superficie, formando complejos de estequiometría 1:1. El ajuste a dicho modelo permitió obtener las constantes de velocidad para las dos interacciones, y a partir de ellas, las constantes de equilibrio de disociación (Ecuación 1.2, sección 1.4.1.2). Los resultados obtenidos se recogen en la Tabla 3.19.

La mayoría de constantes de velocidad de asociación resultaron ser del orden de  $10^5$  o incluso  $10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ , e indicaron que el reconocimiento molecular se produce con gran rapidez. En general, las constantes de asociación para la interacción con penthiopyrad fueron de un orden de magnitud superior a las observadas para el reconocimiento del conjugado, lo que se debe probablemente a la mayor difusividad del fungicida por su reducido peso molecular. La asociación más rápida observada fue la del anticuerpo PPM#410 con penthiopyrad, mientras que el mAb PPM#412 se unió tanto al fungicida como al conjugado con menor rapidez. Del mismo modo, las constantes de velocidad de disociación fueron mayoritariamente del orden de  $10^{-2}$  a  $10^{-4} \text{ s}^{-1}$ , características de procesos relativamente lentos. En este caso también se

observó que las constantes fueron generalmente un orden de magnitud superiores para la disociación del analito, corroborando la tendencia observada en sentido opuesto. El complejo PPM#11/penthiopyrad fue el más rápido en disociarse, mientras que los complejos PPM#47/penthiopyrad y PPM#412/HRP-PPM fueron los más estables desde el punto de vista cinético.

**Tabla 3.19.** Constantes de velocidad y de equilibrio obtenidas mediante resonancia de plasmones superficiales para el reconocimiento de penthiopyrad y del conjugado HRP-PPM por parte de los anticuerpos monoclonales derivados del hapteno PPM.<sup>a</sup>

mAb	Penthiopyrad			HRP-PPM		
	$k_a$ ( $M^{-1}s^{-1}$ ) <sup>b</sup>	$k_d$ ( $s^{-1}$ ) <sup>c</sup>	$K_D$ (nM) <sup>d</sup>	$k_a$ ( $M^{-1}s^{-1}$ )	$k_d$ ( $s^{-1}$ )	$K_D$ (nM)
PPM#11	461.40	221.90	5.889	9.75	0.81	0.851
PPM#13	528.80	60.56	1.602	55.31	5.81	1.051
PPM#43	225.49	0.85	0.054	30.55	1.96	0.762
PPM#47	525.05	0.21	0.003	27.67	1.26	0.479
PPM#410	855.67	23.52	0.327	54.27	3.19	0.723
PPM#412	20.23	6.37	3.086	3.55	0.22	0.592

<sup>a</sup> Todos los valores son la media de dos determinaciones independientes. <sup>b</sup> Constante de velocidad de asociación del complejo anticuerpo/antígeno  $\times 10^{-4}$ . <sup>c</sup> Constante de velocidad de disociación del complejo anticuerpo/antígeno  $\times 10^4$ . <sup>d</sup> Constante de equilibrio de disociación del complejo anticuerpo/antígeno. En cada réplica se calculó como el cociente  $k_d/k_a$ .

Tal y como se describió en la sección 1.4.1.2, los procesos de asociación y disociación se consideran etapas elementales, por lo que las correspondientes constantes de equilibrio se pueden obtener a partir del cociente de las constantes de velocidad. Los valores así hallados en sentido de disociación se incluyen en la Tabla 3.19. La mayoría de constantes de equilibrio halladas fueron de orden nanomolar o subnanomolar, valores esperados a la vista de las elevadas afinidades hacia penthiopyrad y hacia el conjugado HRP-PPM anteriormente observadas mediante ELISA competitivo para los anticuerpos de tipo PPM. Casi todos los valores estuvieron por debajo de 1 nM para las interacciones con el conjugado, y para algunos anticuerpos además fueron inferiores a la constante de equilibrio del fungicida. Este resultado era esperable, ya que el conjugado competidor empleado fue el homólogo. Para los anticuerpos PPM#43, PPM#47 y PPM#410, la constante de equilibrio con el fungicida fue inferior a la observada con el conjugado, de modo que en estos casos el anticuerpo parece mostrar una mayor afinidad hacia el fungicida. Esta situación se observó especialmente con los dos primeros anticuerpos, con los que se obtuvieron constantes de equilibrio del analito inusualmente reducidas, con valores del orden de

0.05 nM o inferiores. Estos valores tan bajos sugieren en principio una afinidad extraordinariamente elevada de dichos anticuerpos hacia penthiopyrad, pero hay que tener presente que se obtuvieron como cocientes de constantes de velocidad y en condiciones no necesariamente de equilibrio, por lo que podrían no ser del todo exactos.

Los resultados anteriores confirmaron las tendencias observadas en ELISA competitivo en cuanto a afinidad, y además permitieron obtener información adicional de tipo cinético. Sin embargo, hay que resaltar que todas las medidas se hicieron tras la captura previa de los anticuerpos sobre la superficie, de modo que las constantes obtenidas no tienen por qué ser exactamente las mismas que se obtendrían si la interacción se produjese en disolución. No obstante, algunos estudios han mostrado que los valores obtenidos de una forma y otra no difieren significativamente.<sup>227</sup>

#### 3.5.4.2. Estudio mediante ELISA competitivo

En un ELISA competitivo indirecto como los llevados a cabo en este trabajo, la señal generada es proporcional a la cantidad de anticuerpo específico que en el equilibrio de la etapa de competición queda ligado a la superficie de los pocillos por interacción con el conjugado OVA–hapteno que la recubre. Sin considerar uniones inespecíficas, la señal es cero cuando no hay unión, mientras que el valor máximo se alcanza cuando el conjugado está saturado por el anticuerpo. De manera simultánea, el anticuerpo puede unirse reversiblemente en disolución al analito, lo que disminuye la cantidad disponible de anticuerpo para la interacción con el conjugado. Por lo tanto, la cantidad de anticuerpo retenido por el conjugado depende de su concentración inicial y también de la del analito.

La interacción anticuerpo/conjugado en fase heterogénea puede describirse de forma simplificada mediante el modelo de Langmuir, que considera el recubrimiento de conjugado sobre la pared del pocillo como un conjunto homogéneo de sitios de unión equivalentes, de forma que sólo puede unirse una molécula sobre cada uno y no se producen interacciones entre las moléculas ligadas.<sup>228,229</sup> Estas premisas son de hecho las mismas que se asumen en SPR con las moléculas inmovilizadas sobre la superficie del chip. En el caso particular de un ELISA competitivo indirecto, los sitios de unión corresponderían a las moléculas de hapteno unidas covalentemente a la ovoalbúmina. El cociente entre el número de sitios ocupados y el número total de sitios se denomina fracción de recubrimiento, y considerando el origen de la señal del

ensayo, se corresponde con la fracción de señal respecto a la obtenida en condiciones de saturación. Por otra parte, el número de moléculas de anticuerpo unidas puede considerarse despreciable frente al de moléculas que quedan en disolución. Todo ello permite deducir la Ecuación 3.1, según la cual la señal del ensayo (A) es una función de la concentración de anticuerpo libre (B) cuyos parámetros son la señal máxima obtenida en condiciones de saturación ( $A_{\text{sat}}$ ) y la constante de equilibrio de disociación del complejo superficial anticuerpo/conjugado ( $K_{D,C}$ ).

$$A = \frac{A_{\text{sat}} [B]}{K_{D,C} + [B]} \quad \text{Ecuación 3.1}$$

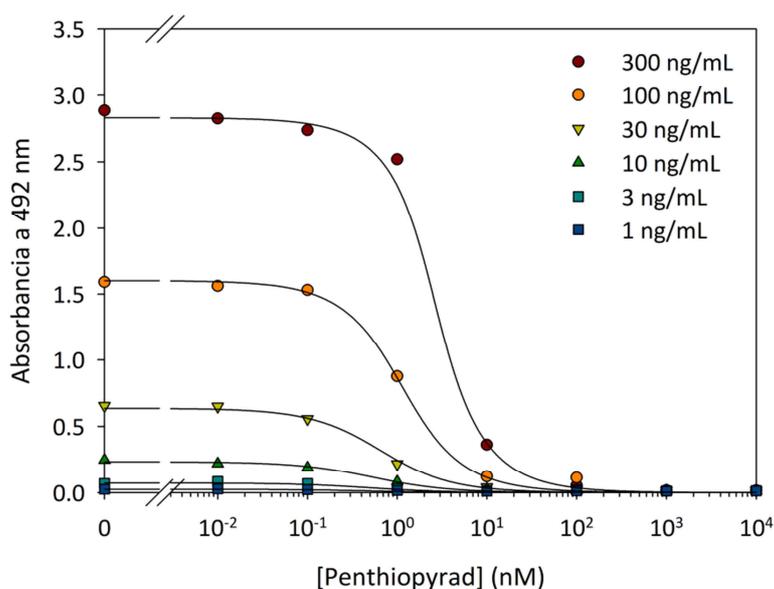
La Ecuación 3.1 recuerda enormemente a la clásica ecuación de Michaelis–Menten para cinética enzimática, con la diferencia de que, en nuestro caso, la concentración libre de “sustrato” (el anticuerpo) dependería de la extensión de un equilibrio adicional (la formación del complejo anticuerpo/analito). Dicha concentración puede hallarse a partir de la constante de dicho equilibrio en sentido de disociación ( $K_{D,A}$ ) y de las concentraciones totales de anticuerpo ( $[B]_0$ ) y analito ( $[A]_0$ ) mediante la Ecuación 3.2.

$$[B] = \frac{[B]_0 - [A]_0 - K_{D,A}}{2} + \sqrt{\frac{1}{4}([A]_0 + [B]_0 + K_{D,A})^2 - [A]_0[B]_0} \quad \text{Ecuación 3.2}$$

De este modo, un ajuste matemático de la combinación de las dos ecuaciones anteriores a un conjunto de valores experimentales obtenidos a diferentes concentraciones totales de anticuerpo y analito debería permitir la estimación de los tres parámetros citados ( $A_{\text{sat}}$ ,  $K_{D,C}$  y  $K_{D,A}$ ), como se observa a modo de ejemplo en la Figura 3.16.

Un razonamiento similar puede aplicarse al formato directo de ELISA competitivo para encontrar la Ecuación 3.3, que también recuerda a la ecuación de Michaelis–Menten en su versión modificada para considerar el efecto de un inhibidor competitivo. En este caso el reactivo inmovilizado es el anticuerpo, por lo que las moléculas de analito compiten con las de conjugado HRP–hapteno por unirse a la superficie recubierta y la señal pasa a depender de la concentración total de conjugado ( $[C]_0$ ).

$$A = \frac{A_{\text{sat}} [C]_0}{K_{D,C} \left( 1 + \frac{[A]_0}{K_{D,A}} \right) + [C]_0} \quad \text{Ecuación 3.3}$$



**Figura 3.16.** Señal obtenida mediante ELISA competitivo indirecto homólogo con el anticuerpo monoclonal PPM#410 a concentraciones entre 3 y 300 ng/mL como función de la concentración de analito (penthiopyrad) desde 0 hasta 10<sup>4</sup> nM. Los puntos son valores experimentales, mientras que las curvas corresponden al ajuste matemático de éstos a la Ecuación 3.1, deducida por aplicación del modelo de Langmuir a este formato de ELISA competitivo.

Aunque en el formato directo no se producen interacciones en disolución, el diseño es muy similar al que se empleó para los experimentos de SPR. La similitud es todavía mayor si los pocillos se recubren inicialmente con un anticuerpo de captura y previamente a la etapa de competición se intercala una etapa para la captura del anticuerpo monoclonal a estudiar (ensayos de captura). Por ello, se consideró interesante la realización adicional de este formato de inmunoensayos con los mismos anticuerpos estudiados mediante SPR, con el fin de comparar las constantes de equilibrio obtenidas mediante dicha técnica con las estimadas a partir de los diferentes formatos de ELISA competitivo citados. Los valores hallados mediante todos los métodos indicados se recopilan en la Tabla 3.20.

Las constantes de equilibrio para penthiopyrad ( $K_{D,A}$ ) determinadas mediante ELISA competitivo indirecto fueron en la mayoría de casos de orden similar a las constantes obtenidas a partir de SPR, siendo especialmente parecidas en el caso de los mAbs PPM#410 y PPM#412. El anticuerpo PPM#410 mostró el valor más bajo con diferencia de dicha constante, lo que constituye otra evidencia más de su elevada afinidad hacia penthiopyrad. Para la mayoría de los anticuerpos, las constantes de equilibrio en este

formato fueron más bajas para el conjugado ( $K_{D,C}$ ) que para el analito, excepto para los anticuerpos PPM#410 y PPM#412. En general, las constantes de equilibrio del analito más bajas se corresponden con valores de  $IC_{50}$  más bajos.

**Tabla 3.20.** Comparación de las constantes de equilibrio de disociación en disolución y en fase sólida para anticuerpos monoclonales derivados del hapteno PPM halladas mediante ELISA competitivo bidimensional en tres formatos y mediante SPR.

mAb	ELISA competitivo <sup>a</sup>									SPR <sup>b</sup>	
	Formato indirecto			Formato directo			Formato de captura				
	$K_{D,A}$ <sup>c</sup>	$K_{D,C}$ <sup>d</sup>	$IC_{50}$ <sup>e</sup>	$K_{D,A}$	$K_{D,C}$	$IC_{50}$	$K_{D,A}$	$K_{D,C}$	$IC_{50}$	$K_{D,A}$	$K_{D,C}$
PPM#11	1.967	0.364	2.589	0.413	9.702	0.644	0.731	2.573	1.749	5.889	0.851
PPM#13	4.353	0.540	7.065	0.925	2.055	2.294	1.044	1.337	3.353	1.602	1.051
PPM#43	2.240	0.508	3.014	0.124	1.741	0.567	0.477	1.221	1.139	0.054	0.762
PPM#47	1.123	0.381	2.447	0.519	2.488	1.165	0.447	0.809	1.403	0.003	0.479
PPM#410	0.366	0.857	1.239	0.145	1.489	0.321	0.492	1.185	0.713	0.327	0.723
PPM#412	2.039	2.379	5.007	- <sup>f</sup>	-	-	1.649	10.392	2.225	3.086	0.592

<sup>a</sup> Los valores de son la media de tres réplicas independientes. <sup>b</sup> Los valores son la media de dos determinaciones independientes. <sup>c</sup> Constante de equilibrio de disociación del complejo anticuerpo/analito (penthiopyrad) expresada en nM. <sup>d</sup> Constante de equilibrio de disociación del complejo anticuerpo/conjugado (OVA-PPM para ELISA competitivo indirecto y HRP-PPM para las restantes metodologías) expresada en nM. <sup>e</sup> Valores expresados en nM y obtenidos para los ensayos más sensibles con el conjugado homólogo. <sup>f</sup> No se obtuvo señal en el ensayo.

Por su parte, las correspondientes constantes deducidas a partir de los ensayos directos indican una mayor afinidad hacia el analito que hacia el conjugado en todos los casos. Para este formato, las constantes de equilibrio del analito más bajas fueron las de los anticuerpos PPM#410 y PPM#43, siendo muy similares entre ellas. Este resultado se correlaciona bien con el hecho de que los valores de  $IC_{50}$  para estos anticuerpos son los más bajos.

Como era de esperar, las constantes de equilibrio halladas mediante ELISA competitivo de captura fueron las más similares a las determinadas mediante SPR. De hecho, la inclusión de la etapa de captura tuvo gran influencia en algunos resultados. Así, aunque la modificación no afectó significativamente a las constantes de disociación del analito, sí causó una disminución en todas las constantes de disociación del conjugado, hasta el punto de que el mAb PPM#412 sólo reconoció el conjugado HRP-PPM con captura previa. Todos los anticuerpos presentaron constantes de equilibrio del analito inferiores a las correspondientes constantes del conjugado, como también se observó en el formato directo sin captura. Las constantes de equilibrio determinadas a partir de los datos obtenidos en el formato de captura fueron muy

semejantes para los anticuerpos PPM#43, PPM#47 y PPM#410, que son también los de menor IC<sub>50</sub> en este formato de ELISA competitivo.

El caso de los anticuerpos PPM#43 y PPM#47 es particular. Con ambos se observó una buena correlación entre las constantes de equilibrio del conjugado obtenidas a partir de ELISA competitivo con captura, y en menor medida cuando se prescindió de la captura, con los datos de SPR. Sin embargo, las constantes de equilibrio del analito halladas mediante los tres formatos de ELISA competitivo difirieron notablemente de las obtenidas mediante SPR. Aun así, los tres formatos de ELISA competitivo proporcionaron constantes de equilibrio más coherentes con los valores de IC<sub>50</sub> que las atípicas constantes inferiores a 0.01 nM determinadas con el equipo Biacore. Teniendo en cuenta que estos últimos valores se calcularon a partir de datos cinéticos, una determinación más precisa de la constante de equilibrio para estos dos anticuerpos mediante SPR requeriría probablemente de un diseño experimental diferente.

En resumen, una muestra de mAbs para penthiopyrad ha sido caracterizada en términos cinéticos y termodinámicos. Se han evaluado las constantes de velocidad para los reconocimientos del fungicida y del conjugado HRP-PPM mediante resonancia de plasmones superficiales, y a partir de dichas constantes cinéticas se han calculado las correspondientes constantes de equilibrio para evaluar cuantitativamente la afinidad de los anticuerpos hacia ambas especies. Del mismo modo, las constantes de equilibrio se han estimado a partir de datos experimentales obtenidos mediante ELISA competitivo en varios formatos, y se han observado en muchos casos valores muy parecidos a los determinados mediante SPR. Por ello, esta aproximación puede constituir una alternativa rápida y económica para la estimación de constantes de equilibrio cuando no se dispone de un equipo de SPR. En cualquier caso, la información recabada también podría servir para seleccionar anticuerpos con aplicaciones diferentes a los inmunoensayos y en las que la cinética cobre importancia, como puede ser el caso de las columnas de inmunoafinidad o la inmunocromatografía de flujo lateral.

### 3.6. Inmunización con constructos de nanotubos de carbono

Además de la evaluación de diferentes haptenos para la obtención de anticuerpos policlonales y monoclonales para los fungicidas fluopyram y penthiopyrad, otro objetivo de esta Tesis Doctoral ha sido llevar a cabo un estudio más profundo del

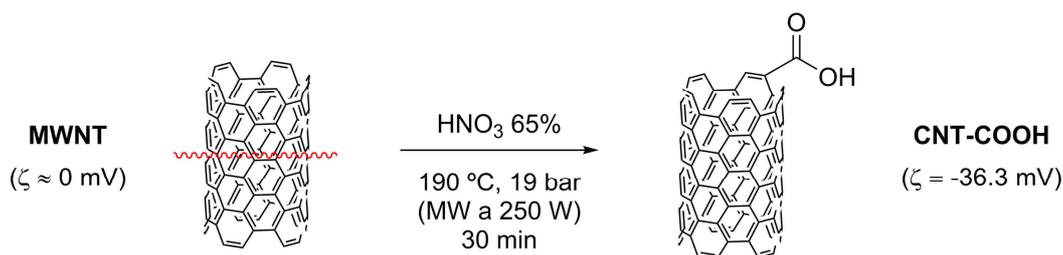
mecanismo de inmunización con haptenos empleando inmunógenos basados en nanotubos de carbono. Recientemente, nuestro grupo ha demostrado que la inmunización de animales con complejos formados por conjugados proteína–hapteno unidos covalentemente a un soporte de nanotubos de carbono da lugar a una buena respuesta inmunitaria dirigida hacia el hapteno con cantidades extraordinariamente bajas de éste.<sup>168</sup> El presente estudio constituye un nuevo capítulo en la investigación de la influencia de este tipo de nanomateriales para preparar inmunógenos y generar anticuerpos específicos de moléculas orgánicas pequeñas.

En este nuevo estudio, el propósito fue analizar cómo influye la presencia o la ausencia de proteína transportadora al inmunizar con constructos basados en nanotubos, en lo que se refiere tanto a la calidad de los anticuerpos generados como a la posibilidad de inducir respuesta inmunitaria sin necesidad de emplear adyuvantes. Para ello, se activaron y funcionalizaron en primer lugar nanotubos de carbono multicapa comerciales mediante química asistida por microondas, que resulta muy adecuada por la capacidad intrínseca de los nanotubos de absorber esta radiación, por lo que las transformaciones son mucho más sencillas que cuando se emplean técnicas convencionales.<sup>158,159</sup> En segundo lugar, los nanotubos funcionalizados fueron enlazados covalentemente a un conjugado proteína–hapteno o bien al propio hapteno mediante el método del éster activo.<sup>121</sup> Por último, el análisis de los antisueros obtenidos tras la inmunización de animales de laboratorio con los dos tipos de constructos, así como el seguimiento de las posibles secuelas fisiológicas en los animales inmunizados, permitió extraer diversas conclusiones relacionadas con el objetivo del estudio.

### **3.6.1. Preparación de inmunógenos basados en nanotubos**

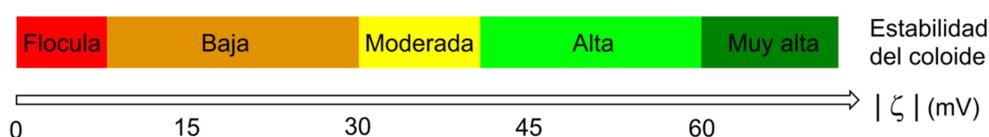
El estudio anterior reveló una dependencia de la respuesta inmunitaria con la forma del inmunógeno, obteniéndose los mejores resultados cuando se emplearon nanotubos cortos y gruesos.<sup>168</sup> Teniendo en cuenta este resultado y la estrategia empleada para su obtención, los inmunógenos utilizados en el presente estudio se prepararon a partir de nanotubos de carbono multicapa (MWNT) comerciales de 50–80 nm de diámetro externo, 5–15 nm de diámetro interno y 10–20 µm de longitud, es decir, gruesos y largos. Mediante una reacción de fragmentación oxidativa a presión y temperatura elevadas, inducida por HNO<sub>3</sub> y facilitada por irradiación con

microondas, los nanotubos de carbono fueron simultáneamente seccionados y funcionalizados con grupos carboxilato (CNT-COOH, Esquema 3.62).<sup>168,230</sup>



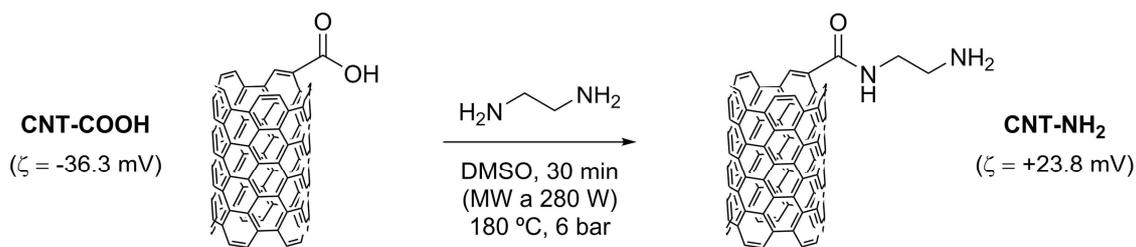
**Esquema 3.62.** Fragmentación oxidativa de MWNT para proporcionar CNT-COOH.

La transformación se verificó mediante la medida del potencial zeta ( $\zeta$ ) de una suspensión acuosa del producto de reacción. Esta magnitud, también llamada potencial electrocinético, indica la diferencia de potencial teórica existente entre la superficie de los nanotubos en suspensión y el seno del medio dispersante, y se calcula mediante modelos teóricos a partir de valores experimentales como la movilidad electroforética. Teniendo en cuenta que se trata de un potencial electrostático, su signo indica el tipo de carga eléctrica existente sobre la partícula (positiva o negativa) y su valor absoluto es proporcional a la densidad de carga superficial de ésta. Así, un valor absoluto elevado es característico de partículas cargadas que se repelen entre sí, originando una suspensión coloidal estable. Por el contrario, valores próximos a cero son consecuencia de partículas poco cargadas con tendencia a flocular, y por tanto se observan en suspensiones inestables. La relación existente entre los valores de  $\zeta$  y la estabilidad de una suspensión coloidal se muestra en la Figura 3.17.<sup>231</sup>



**Figura 3.17.** Estabilidad relativa de las suspensiones coloidales en función de su valor de potencial zeta.

La suspensión de CNT-COOH a una concentración de 1 mg/mL, que mostró una buena estabilidad durante prolongado tiempo, proporcionó un potencial zeta de  $-36.3$  mV, coherente con la presencia de grupos carboxilato cargados en la superficie de los nanotubos. Dichos grupos funcionales se hicieron reaccionar después con etilendiamina, lo que condujo a la formación de enlaces amida y al cambio de los puntos de anclaje carboxílicos por grupos amino (CNT-NH<sub>2</sub>, Esquema 3.63).<sup>168</sup>



**Esquema 3.63.** Preparación de CNT-NH<sub>2</sub> a partir de CNT-COOH y etilendiamina.

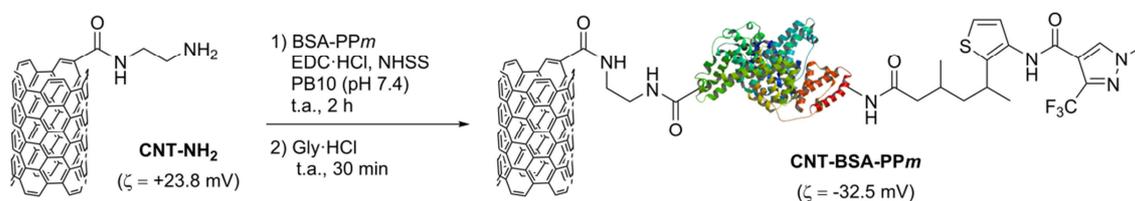
La presencia de dichos grupos amino en su forma protonada fue consistente con el potencial zeta de la suspensión acuosa a 1 mg/mL de CNT-NH<sub>2</sub>, cuyo valor fue de +23.8 mV. En consonancia con este valor, la suspensión resultó ser menos estable, observándose su floculación al cabo de pocos días.

Una vez preparados los nanomateriales con las dimensiones deseadas y funcionalizados con grupos amino, se procedió a la preparación de los inmunógenos finales. Para llevar a cabo este estudio se escogió el fungicida penthiopyrad como analito modelo, y considerando la calidad de los anticuerpos obtenidos frente a éste a partir de los distintos haptenos preparados, se decidió preparar inmunógenos basados en el hapteno PPM (**81**). La elección de este hapteno estuvo motivada por haber sido claramente el mejor representante estructural de penthiopyrad. De este modo, tanto el hapteno PPM como el conjugado BSA-PPM, cuya preparación se ha descrito anteriormente (secciones 3.2.4 y 3.3.2), serían unidos a los nanotubos por formación de enlaces amida entre los grupos carboxilo de los primeros y los grupos amino de los segundos, empleando para ello el método del éster activo.

Como se ha discutido anteriormente, la BSA es una proteína globular que contiene entre 30 y 35 residuos de lisina accesibles en su superficie, con grupos amino primarios disponibles para su derivatización, y también 40 residuos de aspartato y 59 de glutamato, con grupos carboxilato libres. En el conjugado BSA-PPM empleado, con un promedio de 18 moléculas de hapteno PPM por molécula de proteína, aproximadamente la mitad de dichos residuos dejaron de estar disponibles. Así pues, una posible vía de unión del conjugado a los nanotubos habría sido la condensación de CNT-COOH y los grupos amino todavía disponibles en el conjugado. Sin embargo, es probable que dichos grupos amino fuesen los menos accesibles entre los disponibles, lo que sumado a la pequeña cantidad de puntos de anclaje carboxílicos en los nanotubos reducía de forma drástica la probabilidad de que la unión deseada se produjera. Por este motivo, se decidió aprovechar el gran número de grupos carboxilo asociados a residuos de aspartato y glutamato presentes en la proteína e inalterados

en el conjugado, lo que incrementaría la probabilidad de producirse la conjugación buscada. El inconveniente de esta metodología fue la posibilidad de homoacoplamiento entre varias moléculas de conjugado BSA-PPm, lo que pudo solucionarse con una concentración baja de conjugado y activando los grupos carboxilo en presencia de una concentración relativamente elevada de CNT-NH<sub>2</sub>. Otra posibilidad habría sido la utilización de un conjugado con mayor relación molar hapteno-proteína, pero dada la disponibilidad inmediata del conjugado ya preparado, se descartó esta opción.

De esta forma, los grupos carboxilo del conjugado BSA-PPm fueron convertidos en sus correspondientes ésteres activos, que reaccionaron después con los grupos amino de CNT-NH<sub>2</sub> para dar lugar al constructo CNT-BSA-PPm (Esquema 3.64).

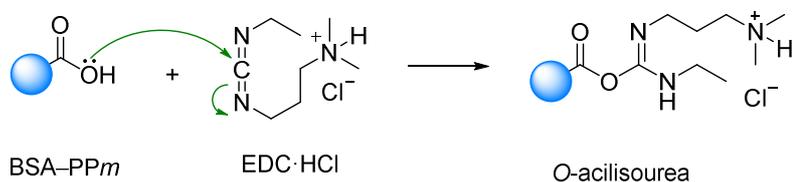


**Esquema 3.64.** Obtención del constructo inmunogénico CNT-BSA-PPm.

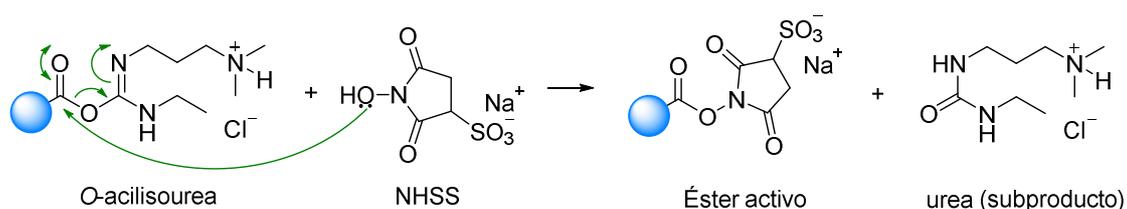
Para la activación inicial de los grupos carboxilo del conjugado BSA-PPm se utilizó EDC-HCl, un reactivo muy utilizado tanto en reacciones de bioconjugación como en síntesis orgánica para la formación de enlaces amida. La EDC está especialmente indicada cuando la reacción se efectúa en medio acuoso, ya que es soluble en agua. Sin embargo, debido a su carácter electrofílico, el reactivo se degrada a pH básico, por lo que la reacción se llevó a cabo en tampón fosfato sódico 10 mM, pH 7.4 (PB10), y por tanto en ausencia de nucleófilos distintos a CNT-NH<sub>2</sub> o al agua. Como se describió en la sección 3.3.1, la reacción entre un grupo carboxilo y una carbodiimida da lugar a una *O*-acilisourea intermedia, que reacciona fácilmente con nucleófilos y libera una urea como subproducto. En este caso, se añadió además a la mezcla de reacción sal sódica de *N*-hidroxisulfosuccinimida (NHSS), un derivado de NHS que incorpora un grupo sulfonato que le confiere una mayor solubilidad en agua. En estas condiciones, las moléculas de NHSS reaccionaron con las *O*-acilisoureas intermedias formadas a partir de los grupos carboxilo del conjugado BSA-PPm para dar lugar a ésteres activos hidrofílicos, preservando así la solubilidad de la proteína en el medio acuoso. Dichos ésteres activos reaccionaron posteriormente con los grupos amino de los nanotubos

de carbono para formar el constructo buscado. El mecanismo se resume en el Esquema 3.65.

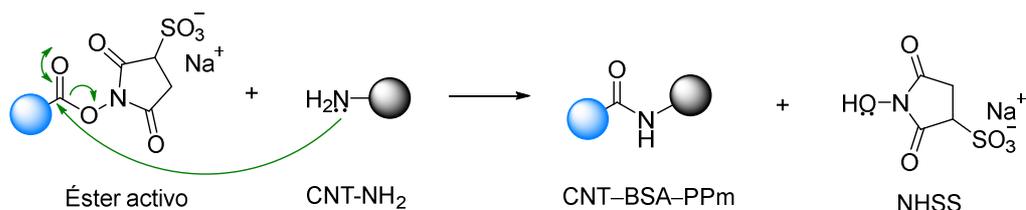
Formación de la O-acilisourea:



Formación del éster activo:



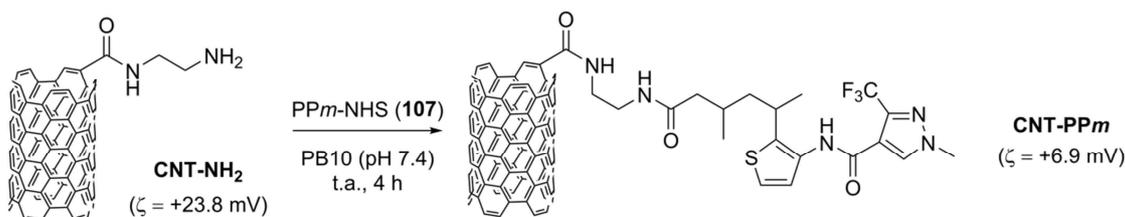
Formación del enlace amida:



**Esquema 3.65.** Mecanismo de formación del constructo CNT-BSA-PPm.

Tras el acoplamiento covalente, se desactivaron los grupos carboxilo sin reaccionar por adición de hidrócloruro de glicina (Gly-HCl). De este modo, se obtuvo un constructo con buena capacidad de dispersión en medio acuoso, reflejado en el valor del potencial zeta de  $-32.5$  mV para una suspensión a 2.5 mg/mL. Esta variación respecto al valor observado para CNT-NH<sub>2</sub> refleja la introducción de las moléculas de BSA con carga global negativa en la superficie del nanotubo.

En lo que respecta a la unión directa del hapteno PPM a los nanotubos, la reacción se llevó a cabo de forma similar a la preparación de conjugados proteína-hapteno, dado que en este caso cada molécula de hapteno contenía un único grupo carboxilo. De este modo, la adición del hapteno PPM activado (PPM-NHS, **107**) a una suspensión de CNT-NH<sub>2</sub> proporcionó el complejo CNT-PPM (Esquema 3.66).



**Esquema 3.66.** Preparación del complejo CNT-PPm por reacción entre CNT-NH<sub>2</sub> y PPM-NHS (107).

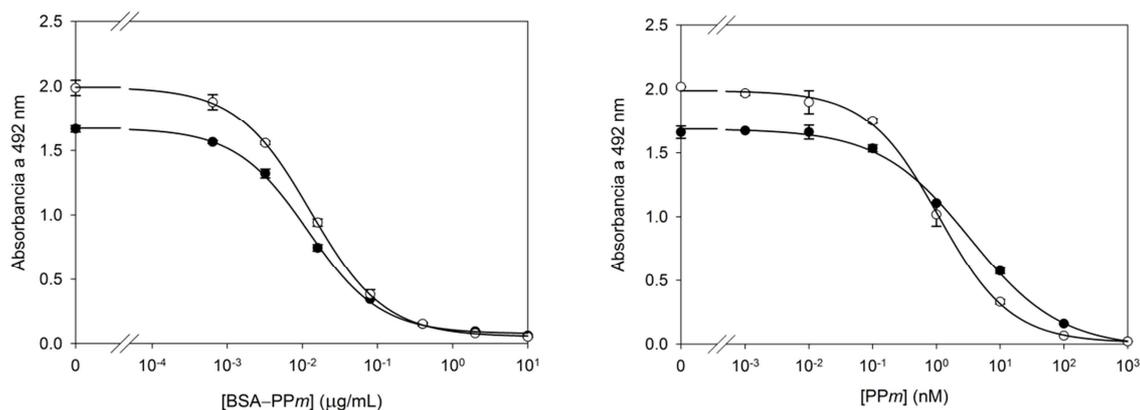
La medida del potencial zeta de una suspensión acuosa de CNT-PPm a 2 mg/mL arrojó un valor de +6.9 mV, coherente con la baja estabilidad de dicha suspensión, que tendía a la floculación en pocos minutos. La reducción del valor del potencial zeta puede explicarse por la desaparición de carga positiva tras la unión de moléculas apolares de hapteno. Sin embargo, el valor final indicó la presencia de grupos amino sin reaccionar. Este potencial residual confería una ligera capacidad de dispersión al constructo CNT-PPm para preparar inóculos más homogéneos y estables.

### 3.6.2. Caracterización de constructos

Como se ha discutido en el apartado anterior, el avance en la funcionalización de los nanotubos se registró mediante la medida del potencial zeta, relacionado con la estabilidad relativa de sus suspensiones coloidales. Los valores obtenidos en cada etapa fueron consistentes con la transformación realizada. Sin embargo, sólo proporcionaron información cualitativa sobre la carga eléctrica que soportaban los nanotubos. Por este motivo, los dos tipos de constructos preparados fueron caracterizados en mayor profundidad mediante el cálculo de las cantidades de conjugado y hapteno inmovilizados y en el caso de CNT-BSA-PPm por observación al microscopio electrónico.

La cuantificación de la carga de inmunógeno se llevó a cabo mediante ELISA competitivo indirecto. Dado que en el momento de llevar a cabo este estudio únicamente se disponía de anticuerpos policlonales para penthiopyrad, el análisis se llevó a cabo con los pAbs PPM#1 y PPM#2. Se emplearon dos anticuerpos distintos con el objetivo de reforzar la autenticidad de los resultados. De este modo, se tapizaron las placas con el conjugado OVA-PPm, se prepararon curvas estándar de conjugado BSA-PPm y de hapteno PPM, y simultáneamente se analizaron diversas diluciones de constructo CNT-BSA-PPm o bien de constructo CNT-PPm. En estas condiciones, se estableció una competición entre el conjugado de tapizado y el constructo analizado

por unirse al anticuerpo empleado, capaz de reconocer al hapteno *PPm* y por tanto con potencial capacidad de interactuar tanto con el conjugado *OVA-PPm* como con los dos tipos de complejos basados en nanotubos. La señal fue por tanto inversamente proporcional a la concentración de hapteno *PPm* sobre el constructo. Las curvas estándar empleadas para la cuantificación de la carga de inmunógeno en los constructos se muestran en la Figura 3.18.

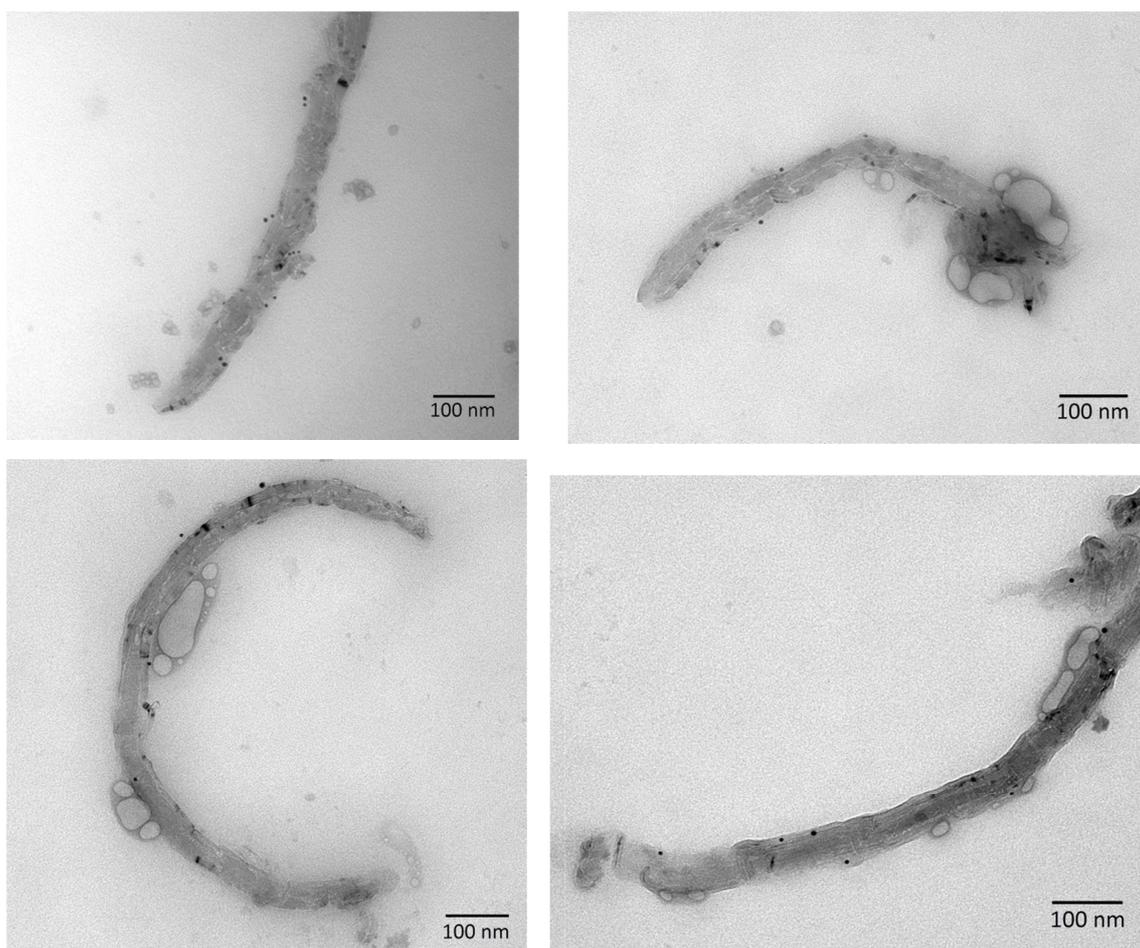


**Figura 3.18.** Curvas estándar obtenidas mediante ELISA competitivo indirecto homólogo con los pAbs *PPm*#1 (●) y *PPm*#2 (○) empleadas para la cuantificación de conjugado *BSA-PPm* (izquierda) y hapteno *PPm* (derecha) anclados covalentemente a los nanotubos de carbono.

Una vez interpolada la señal en su correspondiente curva estándar, y teniendo en cuenta la concentración de nanotubo, se estimó la proporción de conjugado *BSA-PPm* o de hapteno *PPm* presente en cada uno de los dos constructos. Además de llevar a cabo el ensayo con dos anticuerpos distintos, el experimento se repitió variando las concentraciones de anticuerpo y conjugado de tapizado, obteniendo resultados similares en todos los casos. De este modo, se determinó que el constructo *CNT-BSA-PPm* incorporó 2.6 µg de conjugado proteico por mg de nanotubo. Por su parte, la cantidad de hapteno *PPm* anclada en el constructo *CNT-PPm* por mg de nanotubo resultó ser de 0.1 µg. Estas cantidades tan pequeñas, en particular la densidad de hapteno en el constructo sin *BSA*, son consistentes con la dificultad que existe a la hora de funcionalizar nanotubos de carbono.<sup>157</sup>

Por otra parte, el complejo *CNT-BSA-PPm* fue caracterizado mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM) tras el inmunomarcado de los lugares que contenían conjugado *BSA-PPm* con nanopartículas de oro coloidal, perfectamente distinguibles como esferas oscuras de forma bien definida. Este experimento sirvió para demostrar

visualmente la presencia de conjugado, además de permitir confirmar las dimensiones esperadas de los nanotubos. Para llevar a cabo el marcaje, se incubó el constructo con el anticuerpo policlonal PPM#2 sobre la propia rejilla de observación al microscopio, y posteriormente se añadió un anticuerpo policlonal de cabra anti-inmunoglobulinas de conejo conjugado a oro coloidal de 5 nm, que quedó retenido en aquellos lugares donde el pAb PPM#2 había reconocido el hapteno PPM. Con este tratamiento fue posible observar tanto los propios nanotubos como las nanopartículas de oro retenidas. Algunas micrografías obtenidas en este estudio se muestran en la Figura 3.19.



**Figura 3.19.** Micrografías obtenidas mediante microscopía electrónica de transmisión a 30000 aumentos de muestras de constructo CNT-BSA-PPm tras su inmunomarcaje con oro coloidal.

Las micrografías mostraron la presencia de nanopartículas de oro sobre los nanotubos, no observándose presencia de éstas en el fondo de la imagen, lo que confirma la presencia del conjugado BSA-PPm. De hecho, un experimento de control llevado a cabo del mismo modo pero sin la adición del anticuerpo específico PPM#2

dio lugar a una muestra en la que no se apreció la presencia de nanopartículas. En cuanto a la forma de los constructos, las micrográficas mostraron nanotubos del grosor especificado por el fabricante del material de partida (50–80 nm) pero de longitud inferior (0.5–1  $\mu\text{m}$  frente a los 10–20  $\mu\text{m}$  del material de partida según el fabricante) como consecuencia de la fragmentación oxidativa.

En resumen, la fragmentación oxidativa de nanotubos de carbono multicapa comerciales, seguida de una condensación con etilendiamina y del acoplamiento covalente del conjugado BSA–PPm o bien del hapteno PPm, proporcionó los dos constructos inmunogénicos deseados. Dichos constructos fueron caracterizados en cuanto a carga de inmunógeno, dimensiones y dispersabilidad en medio acuoso. Los resultados obtenidos tanto para los constructos finales como para los distintos nanotubos funcionalizados intermedios se resumen en la Tabla 3.21.

**Tabla 3.21.** Propiedades de los distintos nanotubos funcionalizados preparados.

Especie	Propiedades			
	$\zeta$ (mV) <sup>a</sup>	Solubilidad <sup>b</sup>	[Conjugado] <sup>c</sup>	[Hapteno] <sup>d</sup>
CNT	0	Ninguna	-	-
CNT-COOH	$-36.3 \pm 0.7$	Alta	-	-
CNT-NH <sub>2</sub>	$+23.8 \pm 1.1$	Media-alta	-	-
CNT–BSA–PPm	$-32.5 \pm 1.0$	Alta	2.6	0.26 <sup>e</sup>
CNT–PPm	$+6.9 \pm 0.8$	Pobre	-	0.1

<sup>a</sup> Potencial zeta de una suspensión acuosa de la especie, en mV. <sup>b</sup> Solubilidad o capacidad de dispersión en medio acuoso a 1 mg/mL. <sup>c</sup> Densidad de conjugado expresada en  $\mu\text{g}/\text{mg}$  de nanotubo. <sup>d</sup> Densidad de hapteno expresada en  $\mu\text{g}/\text{mg}$  de nanotubo. <sup>e</sup> El valor se calculó considerando una relación molar hapteno/proteína de 18 en el conjugado BSA–PPm.

### 3.6.3. Evaluación inmunológica (I). Respuesta inmunitaria secundaria

Con los inmunógenos preparados se llevó a cabo un experimento de inmunización con conejos New Zealand, siguiendo para ello diferentes procedimientos en los que hubo dos variables fundamentales: la presencia o ausencia de proteína transportadora (BSA) y la utilización o no de adyuvante de Freund. El primer objetivo del estudio fue la evaluación de la influencia de la BSA en la respuesta inmunitaria secundaria hacia el hapteno, es decir, en la maduración del título y afinidad de los anticuerpos generados. Las pautas de inmunización empleadas se detallan en la Tabla 3.22.

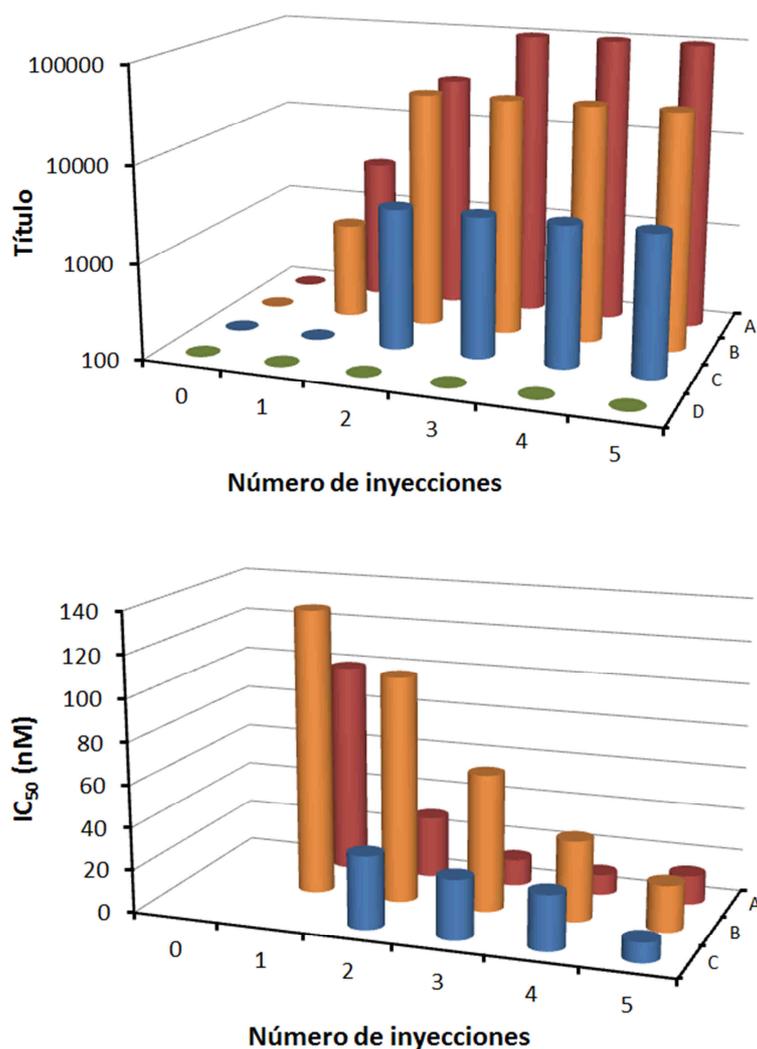
**Tabla 3.22.** Procedimientos de inmunización empleados para el estudio de la respuesta inmunitaria frente a inmunógenos basados en nanotubos de carbono.

Procedimiento	Inmunógeno		Dosis inoculada	
	Inyección 1	Inyecciones 2–5	BSA-PPm ( $\mu\text{g}$ )	PPm ( $\mu\text{g}$ )
A	CNT-BSA-PPm	CNT-BSA-PPm	2	0.1
B	CNT-BSA-PPm	CNT-PPm	0 <sup>a</sup>	0.1
C	BSA-PPm	BSA-PPm	2	0.1
D	CNT-PPm	CNT-PPm	0	0.1

<sup>a</sup> En la primera inmunización se inocularon 2  $\mu\text{g}$  de conjugado BSA-PPm.

Las inmunizaciones se llevaron a cabo empleando inmunógenos emulsionados con adyuvante de Freund en todos los casos y siguiendo los procedimientos A, B, C y D, de modo que se inmunizó un total de 8 conejos, dos con cada procedimiento. Las cantidades de los distintos inmunógenos se ajustaron en todos los casos para que la dosis de hapteno PPm fuese igual a 0.1  $\mu\text{g}$ . En la primera inmunización se emulsionaron los inmunógenos con adyuvante de Freund completo, mientras que en las posteriores se hizo lo propio con adyuvante de Freund incompleto. La evolución de la respuesta inmunitaria de los animales diez días después de cada inoculación se monitorizó mediante ELISA competitivo indirecto con el conjugado homólogo OVA-PPm. Los resultados se muestran gráficamente en la Figura 3.20.

El primer resultado destacable fue que la inmunización con el constructo CNT-PPm (procedimiento D) no produjo respuesta inmunitaria. Puesto que la generación de anticuerpos implica en sus primeras etapas la fagocitosis del inmunógeno por una célula del sistema inmunitario (habitualmente un macrófago), seguida de su degradación en pequeños fragmentos peptídicos y la presentación de éstos al sistema inmunitario por parte de una molécula del complejo principal de histocompatibilidad de clase II (MHC II, de sus siglas en inglés) de la célula, es razonable suponer que al no existir proteína en el inmunógeno no es posible la presentación del hapteno al sistema inmunitario. De hecho, el resto de procedimientos, en los que al menos uno de los inmunógenos empleados contenía BSA, sí dieron lugar a la generación de anticuerpos en mayor o menor medida.



**Figura 3.20.** Evolución del título (arriba) y de la afinidad (abajo) de los anticuerpos obtenidos por inmunización de conejos empleando inmunógenos basados en nanotubos de carbono emulsionados con adyuvante de Freund (completo en la primera inmunización, incompleto en las restantes). Los resultados corresponden a la media de los dos anticuerpos obtenidos en cada pauta.

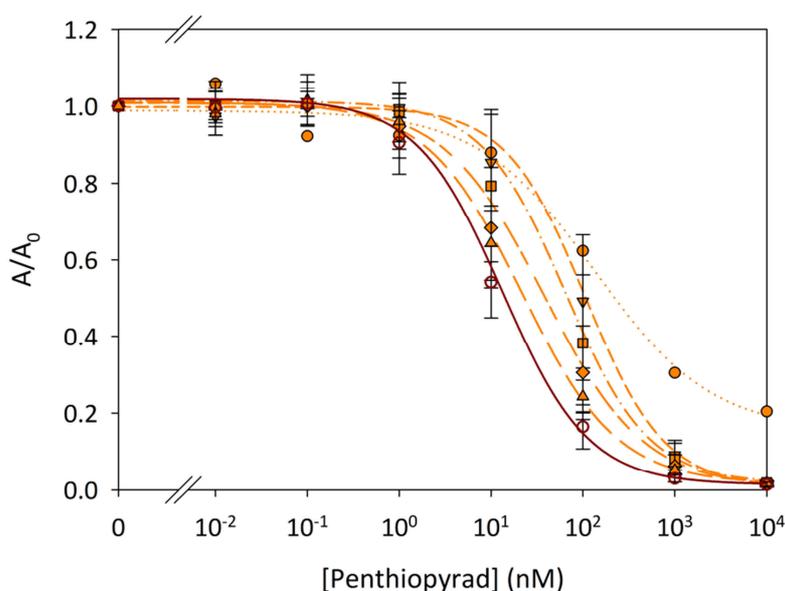
A diferencia de lo sucedido con el constructo CNT-PPm, la inoculación repetida del complejo CNT-BSA-PPm (procedimiento A) indujo una intensa respuesta inmunitaria. Así, tras solamente 3 inmunizaciones fue posible la generación de anticuerpos de elevada afinidad hacia penthiopyrad, reflejada en valores de IC<sub>50</sub> de orden nanomolar, y con un título tal que fue posible obtener una señal adecuada en los inmunoensayos competitivos tras ser diluidos 10<sup>5</sup> veces. Una vez producida esta rápida maduración, a partir de ese momento la respuesta inmunitaria se estabilizó, ya que no hubo cambios importantes ni en el título ni en la afinidad tras dos inmunizaciones adicionales. Es importante destacar que estos excelentes resultados se obtuvieron empleando dosis

de conjugado BSA-PPm unido al nanotubo de tan solo 2 µg, siendo 300 µg la dosis habitual para la inmunización rutinaria de conejos. De hecho, la inmunización convencional con dosis de 2 µg de conjugado BSA-PPm sin presencia de nanotubos (procedimiento C) requirió 5 inyecciones para lograr anticuerpos de afinidad similar, si bien el título fue mucho más reducido y no subió de  $3 \cdot 10^3$ . Estos resultados, ya observados en un estudio anterior frente a azoxystrobin,<sup>168</sup> muestran de nuevo que los nanotubos unidos covalentemente al conjugado BSA-PPm incrementan el carácter inmunogénico de éste, dando lugar a una maduración rápida de la respuesta inmunitaria y a un título elevado de anticuerpos.

Otro resultado relevante fue el que se obtuvo cuando se inoculó una primera dosis de constructo CNT-BSA-PPm seguida de inyecciones sucesivas de complejo CNT-PPm (procedimiento B). En este caso se obtuvieron anticuerpos de título estable ( $3 \cdot 10^4$ ) a partir de la segunda inmunización, mientras que su afinidad fue mejorando progresivamente hasta alcanzar, tras cinco inmunizaciones, valores de  $IC_{50}$  similares a los obtenidos mediante inoculación repetitiva del constructo CNT-BSA-PPm (procedimiento A). Es decir, la supresión de la proteína transportadora a partir de la segunda inmunización dio lugar, tras cinco inoculaciones, a una maduración de la respuesta inmunitaria que, si bien fue más lenta, permitió alcanzar un nivel cualitativamente equivalente al logrado incluyendo BSA en todas las dosis, tanto en lo que respecta a la afinidad como al título de los anticuerpos. Por tanto, la respuesta inmunitaria secundaria, que dio lugar a la maduración del título y la afinidad de los anticuerpos, se produjo en este caso probablemente sin mediación del MHC II. Sin embargo, para que esto fuese posible, fue necesaria una primera dosis acompañada de proteína, lo que sugiere que la respuesta inmunitaria primaria sí se produjo con mediación del MHC II.

La evolución gradual de la respuesta inmunitaria generada con el procedimiento B puede apreciarse con facilidad en la Figura 3.21, en la que se comparan las curvas de inhibición obtenidas mediante ELISA competitivo indirecto a lo largo del proceso. Las curvas se han normalizado para facilitar su comparación. La dosis inicial de constructo CNT-BSA-PPm indujo la respuesta inmunitaria primaria, materializada en la generación de anticuerpos de afinidad muy mejorable hacia penthiopyrad (el valor de  $IC_{50}$  fue superior a 100 nM), que además dieron lugar a una señal de fondo en los inmunoensayos. Considerando el carácter policlonal de los anticuerpos generados, este fondo se debe probablemente a la presencia minoritaria de inmunoglobulinas

capaces de reconocer débilmente el conjugado de tapizado pero con escasa afinidad hacia el fungicida, o bien a interacciones inespecíficas con el conjugado. Sin embargo, tras la segunda inyección, que constituyó la primera dosis de constructo CNT-PPm, la señal de fondo antes citada desapareció por completo, lo que probablemente tiene como causa la selección de las inmunoglobulinas de mejor calidad asociada a la maduración de la respuesta inmunitaria. Del mismo modo, la afinidad de los anticuerpos aumentó ligeramente, con un valor de  $IC_{50}$  ya en torno a 100 nM. Con cada nueva dosis de CNT-PPm la afinidad de los anticuerpos fue mejorando, hasta alcanzar un valor de  $IC_{50}$  de 31.45 nM tras un total de 5 inmunizaciones, bastante similar al valor de 12.37 nM obtenido con el mismo número de inoculaciones de constructo CNT-BSA-PPm.



**Figura 3.21.** Curvas normalizadas de inhibición obtenidas mediante ELISA competitivo indirecto con los anticuerpos generados tras sucesivas inyecciones del constructo CNT-PPm, precedidas de una primera dosis de CNT-BSA-PPm, y emulsionando todos los inmunógenos con adyuvante de Freund (líneas discontinuas, ver Tabla 3.22, procedimiento B). Número de inyecciones: primera (círculo), segunda (triángulo hacia abajo), tercera (cuadrado), cuarta (rombo) y quinta (triángulo hacia arriba). Se incluye la curva de inhibición normalizada obtenida tras cinco inoculaciones de CNT-BSA-PPm emulsionado con adyuvante de Freund (línea continua, ver Tabla 3.22, procedimiento A). Todos los valores son la media de los resultados obtenidos con dos anticuerpos y tres réplicas independientes ( $n = 6$ ).

En resumen, cuando se emplearon inmunógenos emulsionados con adyuvante de Freund, la inmunización con el conjugado BSA–PPm anclado covalente a nanotubos de carbono dio lugar a la generación de anticuerpos de elevada afinidad hacia penthiopyrad con dosis de tan solo 2  $\mu\text{g}$ , frente a los 300  $\mu\text{g}$  empleados habitualmente sin nanotubos. Del mismo modo, la maduración de la respuesta inmunitaria pudo llevarse a cabo sin mediación de proteína transportadora a partir de la segunda inmunización, inoculando dosis de hapteno de solo 0.1  $\mu\text{g}$  y provocando una respuesta inmunitaria dirigida hacia el hapteno y no hacia la proteína transportadora. Por lo tanto, el uso de inmunógenos basados en nanotubos de carbono constituye una potencial alternativa para la generación de anticuerpos de elevada afinidad cuando por circunstancias diversas se disponga de poca cantidad de hapteno. Del mismo modo, este tipo de inmunógenos también podrían ser útiles en aquellos casos en los que fuese conveniente la inoculación de una baja concentración de hapteno para evitar un perjuicio al animal o incluso su muerte, como podrían ser los casos en los que la diana fuese una toxina.

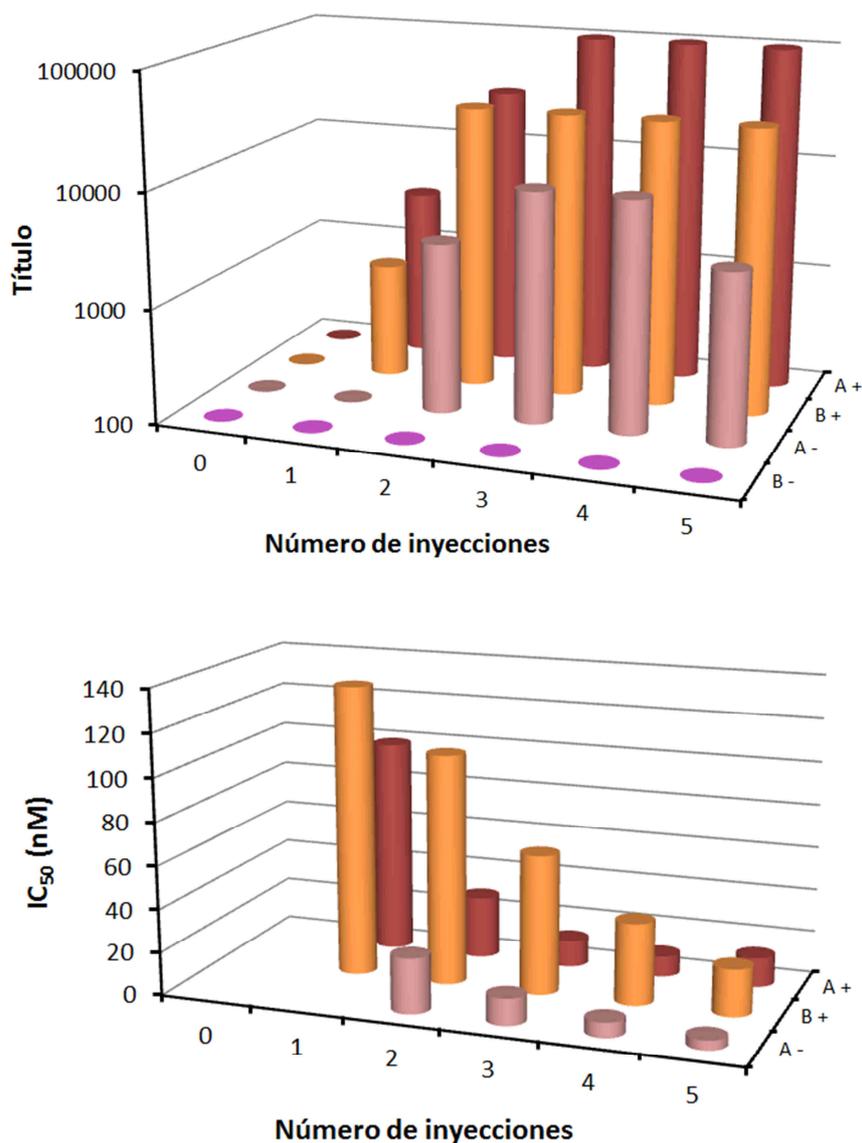
#### **3.6.4. Evaluación inmunológica (II). Efecto adyuvante**

El segundo objetivo de este estudio fue comprobar si los inmunógenos empleados poseían carácter adyuvante y si éste era dependiente o no de la presencia de proteína transportadora. Los haptenos, por definición, son moléculas capaces de ser reconocidas por anticuerpos pero no de desencadenar por sí solas la respuesta inmunitaria, es decir, son antigénicas pero no inmunogénicas. Para obtener anticuerpos frente a haptenos, es necesario enlazarlos covalentemente a una proteína transportadora, obteniendo de esta forma un conjugado proteína–hapteno. No obstante, la inoculación de estos conjugados siempre se hace junto con adyuvantes, es decir, sustancias que actúan como inmunopotenciadores, facilitando así la captación del inmunógeno por parte del sistema inmunitario. Los más habituales son los aceites minerales, entre ellos el adyuvante de Freund, que en esta Tesis Doctoral se ha empleado tanto para la generación convencional de anticuerpos policlonales y monoclonales, como para el estudio con inmunógenos basados en nanotubos de carbono descrito en el apartado anterior. Sin embargo, este adyuvante es costoso y peligroso para el manipulador, y también es responsable de la generación de heridas de importante consideración en los animales inmunizados (ver Figura 3.24), por lo que resultaría de interés encontrar métodos alternativos para evitar su uso. Dado que en

nuestro grupo se demostró previamente que los nanotubos de carbono poseen cierto carácter adyuvante,<sup>168</sup> en esta Tesis se ha llevado a cabo un segundo estudio para determinar si este efecto es extensible a otro analito y si es dependiente o no de la presencia de proteína transportadora.

Para la evaluación del efecto adyuvante de los nanotubos de carbono, se llevaron a cabo inmunizaciones adicionales respecto a las descritas en el apartado anterior, en las que los inmunógenos se inocularon sin emulsionarse con adyuvante de Freund. Así, junto con los 8 conejos inmunizados con adyuvante de Freund, otros 4 conejos se inmunizaron siguiendo los procedimientos A y B sin adyuvante (Tabla 3.22), evaluando por tanto cada uno de ellos en 2 animales. Todas las dosis se ajustaron de modo que la cantidad inoculada de hapteno fuese siempre de 0.1 µg. La respuesta inmunitaria generada mediante cada pauta se evaluó del mismo modo que en el estudio de respuesta inmunitaria secundaria. En la Figura 3.22 se recoge la evolución del título y de la afinidad de los anticuerpos obtenidos siguiendo los procedimientos A y B y con adyuvante (A+ y B+, respectivamente) y los resultados obtenidos con los procedimientos A y B sin adyuvante (A- y B-, respectivamente).

Como se ha detallado en el apartado anterior, la inoculación repetida del constructo CNT-BSA-PPm emulsionado con adyuvante de Freund (procedimiento A+) indujo la generación de anticuerpos de elevada afinidad hacia penthiopyrad, con un grado final de maduración de la respuesta inmunitaria similar al que se obtuvo tras dosis sucesivas del complejo CNT-PPm precedidas de una inoculación inicial de CNT-BSA-PPm, todas ellas con adyuvante (procedimiento B+). Por su parte, la inmunización con el constructo CNT-BSA-PPm sin adyuvante (procedimiento A-) dio lugar también a la generación de anticuerpos de afinidad significativa hacia penthiopyrad con solo dos dosis, la cual se elevó aun más tras un total de cinco inoculaciones hasta alcanzarse el valor más bajo de IC<sub>50</sub> observado en todo el estudio (4.50 nM). Del mismo modo, el título de los anticuerpos obtenidos mediante esta pauta de inmunización se estabilizó a partir de la segunda inmunización en valores aceptables que oscilaron entre  $3 \cdot 10^3$  y  $10^4$ . Estos resultados revelan por tanto el carácter adyuvante del complejo CNT-BSA-PPm, algo esperable teniendo en cuenta lo observado en el estudio anterior con azoxystrobin.



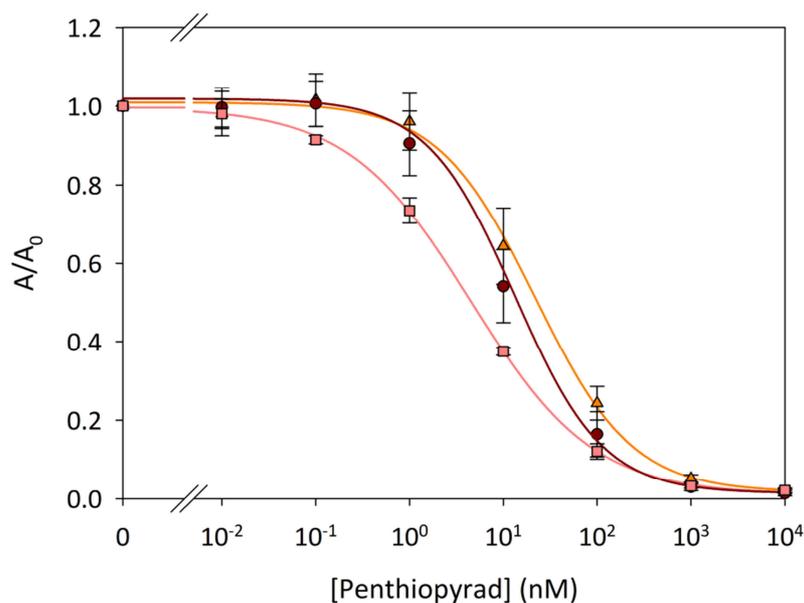
**Figura 3.22.** Evolución del título (arriba) y de la afinidad (abajo) de los anticuerpos obtenidos por inmunización de conejos empleando inmunógenos basados en nanotubos de carbono emulsionados con adyuvante de Freund (completo en la primera inmunización, incompleto en las restantes) o sin adyuvante. La presencia o ausencia de adyuvante se indica respectivamente con un signo + o – junto al nombre del procedimiento (Tabla 3.22). Los resultados son la media de los dos anticuerpos obtenidos en cada pauta.

Otro resultado a destacar fue el que se obtuvo tras la inyección periódica de cuatro dosis de CNT-PPm precedidas de una inoculación inicial de CNT-BSA-PPm, prescindiendo en todos los casos de adyuvante (procedimiento B-). Tras la primera dosis se obtuvieron anticuerpos incapaces de reconocer penthiopyrad y de título muy reducido (inferior a  $10^2$ ), que corresponden a una débil respuesta inmunitaria primaria. No obstante, a partir de este punto, inoculaciones sucesivas de constructo CNT-PPm

no dieron lugar ni al aumento del título ni a la generación de anticuerpos afines a penthiopyrad, lo cual sí sucedió cuando el inmunógeno incorporó proteína (procedimiento A-) o cuando todas las inmunizaciones se llevaron a cabo acompañadas de adyuvante de Freund (procedimiento B+).

En estudios anteriores se había visto que la inoculación de una mezcla no covalente de nanotubos y conjugado sin adyuvante de Freund no producía respuesta inmunitaria.<sup>168</sup> Todas estas observaciones sugieren que la manifestación del carácter adyuvante de los nanotubos de carbono requiere de la presencia de proteína transportadora unida covalentemente y, por otra parte, que la maduración de la respuesta inmunitaria sin mediación de proteína sólo parece ser posible cuando los inmunógenos se inoculan junto con adyuvante de Freund. En cualquier caso, cuando hubo maduración de la respuesta inmunitaria, los inmunógenos basados en nanotubos de carbono sintetizados permitieron obtener anticuerpos de afinidades cualitativamente muy similares empleando diferentes procedimientos de inmunización. Dicha similitud se hace visible en la Figura 3.23, que muestra las curvas de inhibición obtenidas tras la inmunización completa con los procedimientos A+, B+ y A-.

Aunque las tres curvas no son coincidentes, todas ellas reflejan la generación de anticuerpos de elevada afinidad. Como ya se indicó en la Figura 3.21, el reconocimiento de penthiopyrad con los anticuerpos generados tras cinco inoculaciones de inmunógenos emulsionados con adyuvante de Freund fue prácticamente equivalente con mediación de la proteína en la maduración de la respuesta inmunitaria o sin ella (procedimientos A+ y B+, respectivamente). En términos absolutos, los anticuerpos que mostraron una mayor afinidad hacia penthiopyrad fueron los obtenidos por inmunización con CNT-BSA-PPm sin acompañamiento de adyuvante de Freund (procedimiento A-), con un excelente valor de IC<sub>50</sub> de 4.50 nM. No obstante, los anticuerpos con el título más elevado del estudio fueron los generados con este mismo constructo, pero emulsionado con adyuvante (procedimiento A+). Teniendo en cuenta el carácter inmunopotenciador del constructo CNT-BSA-PPm, el título tan elevado con el procedimiento A+ podría deberse a la suma de dicho carácter con el del adyuvante de Freund. En cualquier caso, no hubo diferencias significativas en el título y la afinidad de los anticuerpos generados con cualquiera de los tres procedimientos.



**Figura 3.23.** Curvas normalizadas de inhibición obtenidas mediante ELISA competitivo indirecto con los anticuerpos generados tras cinco inmunizaciones con los constructos CNT-BSA-PPm y CNT-PPm acompañados o no de adyuvante de Freund, siguiendo los procedimientos descritos en la Tabla 3.22 nombrados como A+ (círculos), A- (cuadrados) y B+ (triángulos). Los valores son la media de los resultados obtenidos con dos anticuerpos y tres réplicas independientes ( $n = 6$ ).

### 3.6.5. Efectos secundarios de la inmunización con nanotubos

Paralelamente al seguimiento de los anticuerpos generados se monitorizó el estado de los animales inmunizados con constructos de nanotubos de carbono. A lo largo del proceso de inmunización, todos los conejos mostraron una evolución similar en su peso, sin anomalías en cuanto a comportamiento o ingesta de comida y agua. Puesto que las inoculaciones fueron por vía subcutánea, se observaron alteraciones importantes en la piel de los animales a los que se inyectó inmunógenos emulsionados con adyuvante, como ocurre siempre al utilizar adyuvante de Freund. Por el contrario, los que no incluyeron adyuvante no presentaron alteración alguna. En general, los primeros presentaron inflamación local o abscesos en la zona de inyección (Figura 3.24, izquierda), mientras que los segundos no desarrollaron ninguno de estos daños (Figura 3.24, derecha). Por tanto, queda claro que los nanotubos de carbono acompañados de proteína transportadora ejercen efecto adyuvante y aparentemente sin causar daño severo a los animales de laboratorio, lo que sí sucede cuando los inmunógenos se acompañan de adyuvante de Freund.



**Figura 3.24.** A la izquierda, absceso generado en la piel de un conejo tras la inyección de un inmunógeno emulsionado con adyuvante de Freund. A la derecha, la misma zona de la piel de otro conejo al que se inyectó el constructo CNT-BSA-PPm sin adyuvante de Freund.

En resumen, la generación de anticuerpos de elevado título y afinidad hacia un analito de bajo peso molecular como es penthiopyrad empleando inmunógenos basados en nanotubos de carbono fue posible cuando el primer contacto del antígeno con el sistema inmunitario estuvo mediado por proteína transportadora. Tras la generación de la respuesta inmune primaria, la respuesta inmunitaria secundaria o maduración de la afinidad y el título de los anticuerpos se pudo llevar a cabo, tanto con mediación de proteína como sin ella, y haciendo uso de adyuvante de Freund, lo que sugiere la existencia de mecanismos alternativos a la participación del MHC II en dicho proceso de maduración y además abre la puerta a la generación de anticuerpos cuya respuesta se dirigiese exclusivamente al hapteno. Del mismo modo, los nanotubos mostraron un carácter adyuvante cuando se acompañaron de proteína transportadora. Así, la inoculación repetida del constructo CNT-BSA-PPm permitió la generación de anticuerpos de afinidad igualmente elevada sin necesidad de utilizar adyuvante de Freund, evitando además la aparición de heridas en los animales inmunizados. Todas estas metodologías dieron muy buenos resultados con dosis realmente bajas de conjugado BSA-PPm y de hapteno PPm, de tan solo 2 y 0.1  $\mu\text{g}$ , respectivamente. Por tanto, los procedimientos descritos constituyen potenciales alternativas para la generación de anticuerpos de elevada afinidad hacia moléculas pequeñas en aquellos casos en los que la cantidad de hapteno o la minimización del daño infringido a los animales de laboratorio sean variables determinantes.

### 3.7. Optimización y desarrollo de inmunoensayos

Una vez generados y caracterizados los anticuerpos tanto policlonales como monoclonales para los dos analitos de estudio, se escogieron las parejas anticuerpo/conjugado que dieron lugar a los mejores inmunoensayos competitivos. Dada la gran influencia que pueden ejercer las propiedades fisicoquímicas del entorno sobre las interacciones anticuerpo/analito y anticuerpo/conjugado, el desarrollo de los mejores inmunoensayos se completó tras una evaluación de algunas de las variables de ensayo más importantes, como son el pH y la fuerza iónica en la etapa de competición, y un estudio de tolerancia a la presencia de algunos disolventes orgánicos, dado que los ensayos irían dirigidos a muestras de origen vegetal y por tanto sería altamente probable que los análisis se llevaran a cabo sobre sus correspondientes extractos orgánicos.

#### 3.7.1. Selección de inmunoensayos

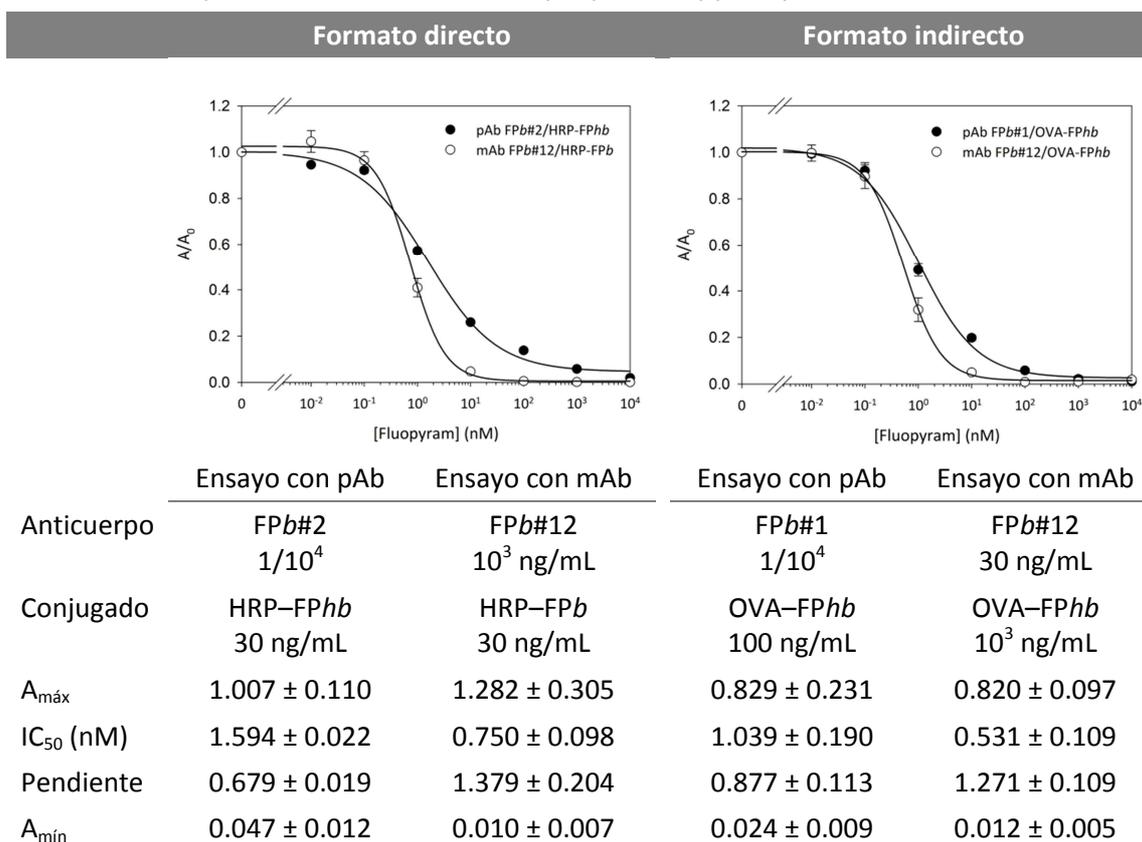
La selección de los inmunoensayos competitivos de mayor interés se hizo atendiendo en primer lugar a la afinidad y especificidad de los anticuerpos, primando así la selección de parejas anticuerpo/conjugado que dieran lugar a ensayos de la mayor sensibilidad posible (valores bajos de  $IC_{50}$ ) y a su vez de anticuerpos con la menor reactividad cruzada posible hacia los diferentes compuestos ensayados. En segundo lugar se tuvieron en cuenta algunos criterios prácticos, como la utilización de concentraciones de inmunorreactivos lo más bajas posibles o bien la búsqueda de curvas de inhibición con valores de pendiente cercanos a la unidad para garantizar un buen compromiso entre la exactitud del ensayo y el rango de trabajo.

Teniendo en cuenta todos los criterios anteriores, en primer lugar para cada analito se preseleccionaron cuatro inmunoensayos, tanto de anticuerpos monoclonales como de policlonales y de los dos formatos de ELISA competitivo evaluados. Los ensayos seleccionados para fluopyram se recogen en la Tabla 3.23. La sensibilidad hacia fluopyram de los inmunoensayos preseleccionados fue excelente, a la vista de los valores de  $IC_{50}$  de todos ellos. De hecho, éstos fueron extraordinariamente reducidos cuando los ensayos hicieron uso del mAb FPb#12, incluso cuando se empleó el conjugado homólogo, como se observó en el ensayo directo (FPb#12/HRP-FPb). Por otra parte, y como suele observarse cuando se emplean anticuerpos monoclonales, la pendiente fue más elevada cuando los ensayos se efectuaron con el mAb FPb#12. Por

## Resultados y Discusión

todo ello, y teniendo en cuenta que todos los resultados mostraron la elevada calidad del mAb FPb#12, se decidió llevar a cabo la optimización y el desarrollo de los dos inmunoensayos que hacían uso de este anticuerpo, es decir, el ensayo en formato directo FPb#12/HRP-FPb y el ensayo en formato indirecto FPb#12/OVA-FPb, con valores de IC<sub>50</sub> de 0.750 y 0.531 nM, respectivamente.

**Tabla 3.23.** Propiedades de los inmunoensayos para fluopyram preseleccionados.<sup>a</sup>

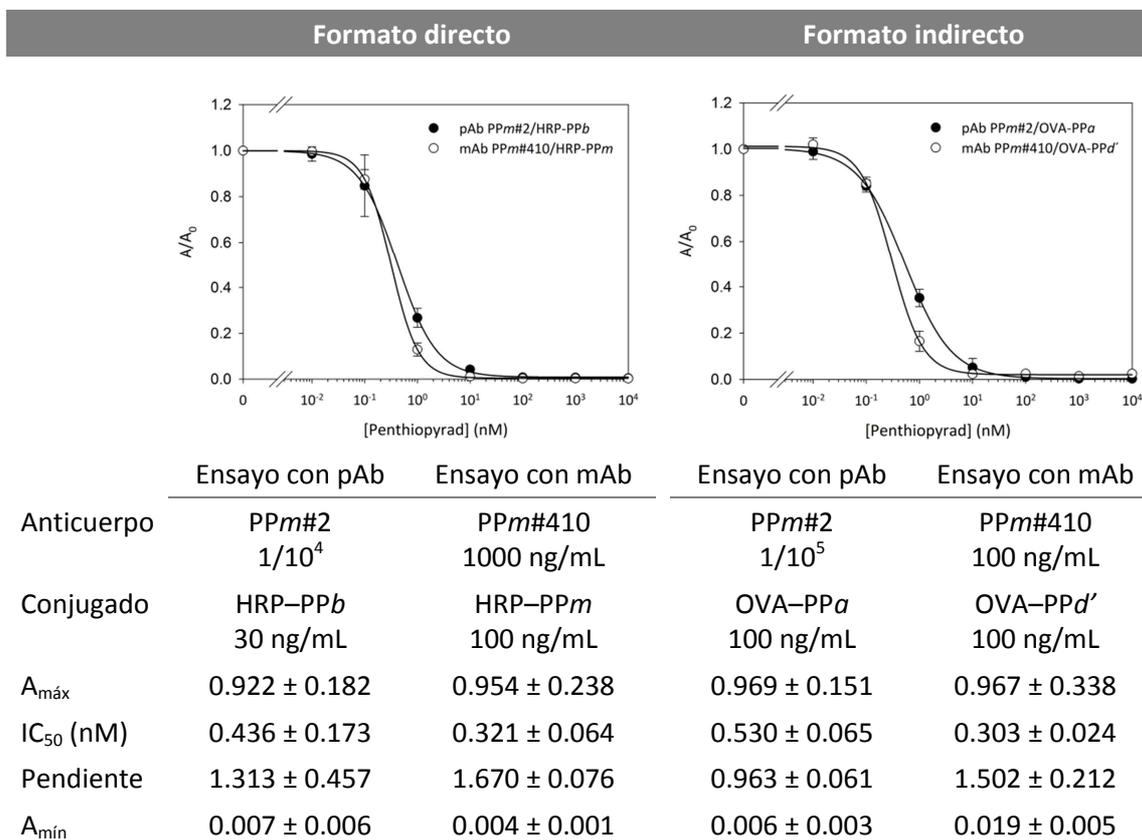


<sup>a</sup> Los valores son la media de tres determinaciones independientes.

En la Tabla 3.24 se recopilan los cuatro inmunoensayos seleccionados para penthiopyrad. Todos ellos mostraron una sensibilidad extraordinaria hacia el analito, con valores de IC<sub>50</sub> en torno a 0.5 nM independientemente de la naturaleza de los anticuerpos empleados. Como se observó en los ensayos seleccionados para fluopyram, la pendiente de las curvas de inhibición fue algo mayor cuando se empleó el monoclonal PPM#410, siendo especialmente elevada en el ensayo directo (PPM#410/HRP-PPM). Con todas estas características, cualquiera de los cuatro ensayos sería adecuado para su optimización, desarrollo y posterior validación de acuerdo con los objetivos de esta Tesis Doctoral. No obstante, desde el punto de vista de su posterior aplicación y considerando las características generales de monoclonales y policlonales, se consideró más conveniente la selección definitiva de

los ensayos basados en el mAb PPM#410, ya que siempre que fuese necesario podría generarse homogénea e indefinidamente más cantidad a partir de su correspondiente hibridoma. Por tanto, se escogieron definitivamente el ensayo en formato directo PPM#410/HRP-PPm y el ensayo en formato indirecto PPM#410/OVA-PPd'.

**Tabla 3.24.** Propiedades de los inmunoensayos para penthiopyrad preseleccionados.<sup>a</sup>

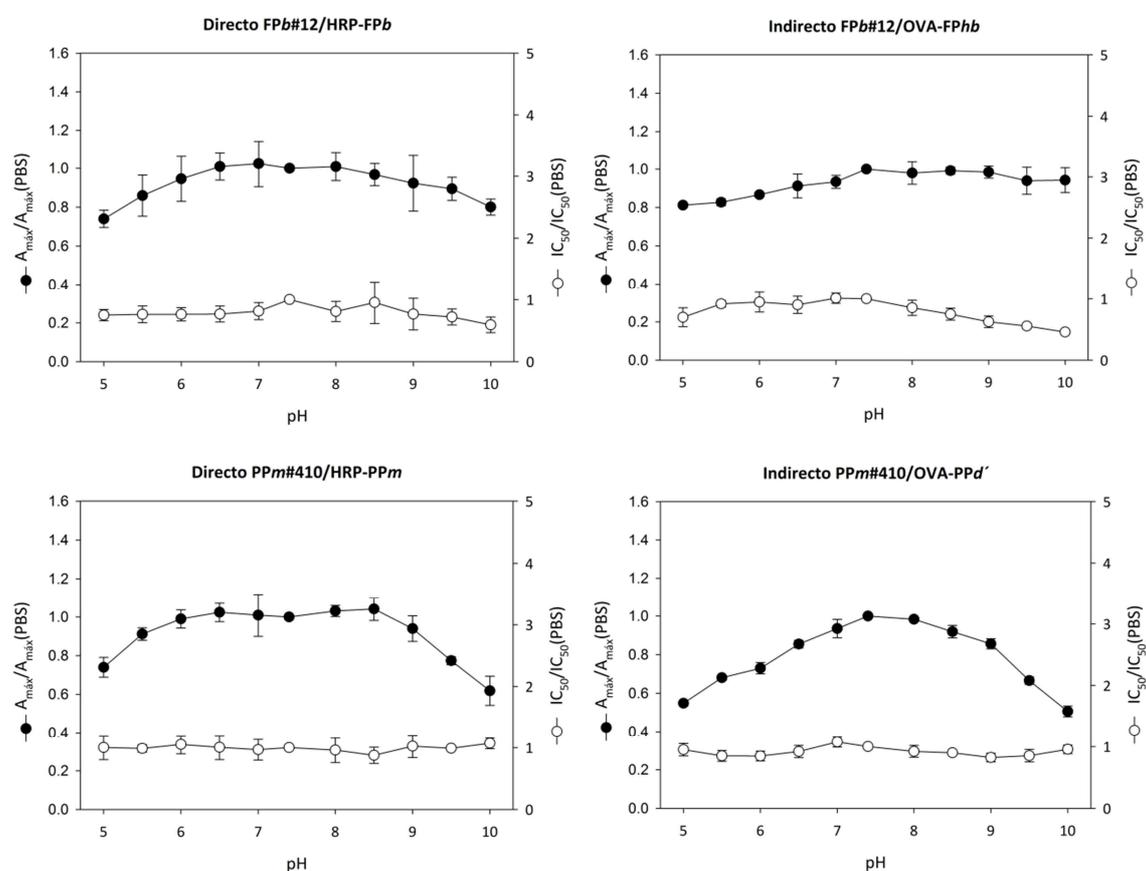


<sup>a</sup> Los valores son la media de tres determinaciones independientes.

### 3.7.2. Influencia del pH y de la fuerza iónica

Con el objetivo de maximizar la eficacia de los anticuerpos, todos los ensayos se habían llevado a cabo en un medio basado en tampón fosfato salino (PBS), y por tanto en condiciones fisiológicas de pH y fuerza iónica (*I*), con valores de 7.4 y 166 mM respectivamente. No obstante, determinadas muestras podrían contener sustancias capaces de alterar significativamente dichos valores en el transcurso del ensayo, por lo que se hizo necesario evaluar qué efecto podría tener sobre las curvas de inhibición la modificación de estas condiciones iniciales. Para ello, se llevaron a cabo dos estudios paralelos en los que se efectuaron los inmunoensayos manteniendo una de las dos variables fijada en su valor inicial y variando la otra.

Para estudiar la influencia del pH, se prepararon curvas estándar de analito en agua MilliQ y se mezclaron con disoluciones del inmunorreactivo de competición en tampones fosfato, borato o carbonato, cubriendo un rango de valores de pH desde 5 hasta 10, y preparados de tal modo que en todos los casos se mantuviese en el ensayo la concentración total de sistema amortiguador (10 mM) y la fuerza iónica (166 mM). El tipo de tampón se decidió en cada caso de acuerdo a la correspondencia entre el pH deseado con el intervalo de máxima capacidad amortiguadora del tampón. La Figura 3.25 muestra la variación relativa de los valores de  $A_{m\acute{a}x}$  e  $IC_{50}$  de los cuatro inmunoensayos competitivos seleccionados respecto a los valores obtenidos en las condiciones iniciales, es decir, en PBS (pH 7.4).



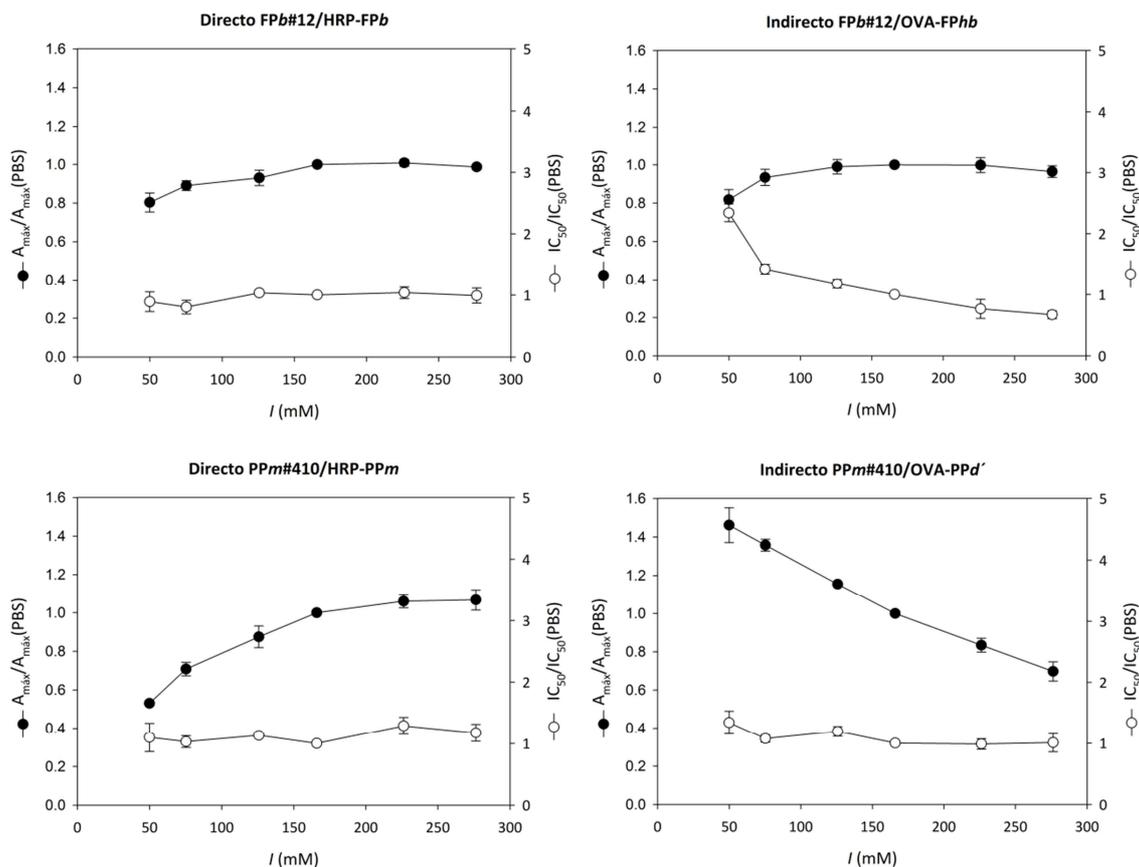
**Figura 3.25.** Influencia del pH en la etapa de competición en los valores de  $A_{m\acute{a}x}$  e  $IC_{50}$  de los inmunoensayos competitivos seleccionados para los fungicidas fluopyram (gráficos superiores) y penthiopyrad (gráficos inferiores). Los valores están referidos al comportamiento en PBS y son la media de tres réplicas independientes.

Para el ensayo directo de fluopyram (FPb#12/HRP-FPb), prácticamente no hubo variaciones significativas de comportamiento en el intervalo de pH desde 6.5 hasta 8.5, mientras que por encima y por debajo de dichos límites se observó un leve y gradual

descenso de los valores de  $A_{m\acute{a}x}$ . En cuanto a la  $IC_{50}$ , su valor prácticamente no se vio alterado en todo el rango ensayado de pH, con tan solo un leve descenso a pH básico. Por su parte, en el ensayo indirecto de fluopyram (FPb#12/OVA-FPb) se observó un comportamiento bastante estable al aumentar o disminuir el pH respecto al ensayo en PBS. Así, tanto el valor de  $A_{m\acute{a}x}$  como el de  $IC_{50}$  disminuyeron ligeramente cuando el ensayo se llevó a cabo a pH cada vez más ácido. En contraposición, conforme el pH se hizo más básico, sólo fue el valor de  $IC_{50}$  el que se redujo progresivamente.

En cuanto al ensayo directo de penthiopyrad (PPm#410/HRP-PPm), el pH resultó tener una considerable influencia sobre el valor de  $A_{m\acute{a}x}$ , observándose un comportamiento cualitativamente parecido al del ensayo directo de fluopyram (FPb#12/HRP-FPb) pero mucho más acusado, especialmente a pH básico. Así, la señal máxima se mantuvo invariable en el intervalo de pH desde 6 hasta 8.5, mientras que se redujo un 30% a pH 5 y un 40% a pH 10. En cambio, el valor de  $IC_{50}$  no mostró dependencia alguna con el pH, manteniéndose prácticamente constante en todo el rango de pH estudiado. Finalmente, para el ensayo indirecto de penthiopyrad (PPm#410/OVA-PPd') se observaron resultados similares a los del ensayo directo para este analito, con la diferencia de que el valor de  $A_{m\acute{a}x}$  fue mucho más dependiente del pH en los extremos del rango evaluado. De este modo, la señal máxima sólo se mantuvo prácticamente invariable a pH 7.4 y 8, produciéndose importantes disminuciones en su valor (hasta del 50%) al efectuar el ensayo tanto a pH 5 como a pH 10. De hecho, cualquier variación de pH supuso una reducción en mayor o menor medida de la señal máxima. En cuanto a la sensibilidad de este ensayo, el valor de  $IC_{50}$  no experimentó modificaciones importantes a ninguno de los pH ensayados.

Una vez evaluada la influencia del pH sobre los valores de  $A_{m\acute{a}x}$  e  $IC_{50}$  de los inmunoensayos seleccionados, se llevó a cabo un estudio equivalente para determinar el efecto de la fuerza iónica. En este caso, el inmunorreactivo de competición se disolvió en tampones fosfato con concentraciones variables de NaCl, preparados de tal manera que en todos los casos se mantuviesen constantes en el ensayo tanto el pH (7.4) como, al igual que en el estudio de pH, la concentración total de sistema amortiguador (10 mM). Se cubrió así un rango de valores de fuerza iónica en ensayo desde 50 hasta 280 mM. La influencia de esta variable sobre los inmunoensayos seleccionados se muestra gráficamente en la Figura 3.26 como variación relativa respecto al comportamiento observado en PBS ( $I = 166$  mM).



**Figura 3.26.** Influencia de la fuerza iónica en la etapa de competición sobre los valores de  $A_{\max}$  e  $IC_{50}$  de los inmunoensayos competitivos seleccionados para fluopyram (gráficos superiores) y penthiopyrad (gráficos inferiores). Los valores están referidos al comportamiento en PBS y son la media de tres réplicas independientes.

Para el ensayo directo de fluopyram (FPb#12/HRP-FPb), el aumento de la fuerza iónica no indujo cambios importantes en los valores de  $A_{\max}$  e  $IC_{50}$ , aunque sí se observó una leve disminución de ambos parámetros cuando el ensayo se efectuó a fuerza iónica más baja. En cualquier caso, este ensayo resultó ser bastante robusto frente a las modificaciones de esta variable. Por su parte, el ensayo indirecto (FPb#12/OVA-FPhb) para este analito mostró una mayor dependencia con la fuerza iónica, especialmente en lo que respecta al valor de  $IC_{50}$ , que aumentó entre 2 y 2.5 veces cuando se llevó a cabo el ensayo a la fuerza iónica más baja estudiada (50 mM) y disminuyó alrededor de un 30% en el extremo opuesto del rango evaluado ( $I = 276$  mM). Para la señal máxima, la tendencia observada fue similar a la del ensayo directo (FPb#12/HRP-FPb), es decir, poca variación en el intervalo de fuerza iónica estudiado.

En cuanto al ensayo directo de penthiopyrad (PPm#410/HRP-PPm), no se observaron variaciones sustanciales en la sensibilidad inducidas por los cambios de fuerza iónica, pero sí se produjo un importante descenso en la señal máxima cuando el

ensayo se efectuó a los valores más bajos de esta variable de estudio, alcanzando la mitad de su valor inicial en el extremo inferior del rango evaluado. La variación de este parámetro fue mucho más evidente en el ensayo indirecto para este analito (PPm#410/OVA-PPd'), observándose una disminución aproximadamente lineal del valor de  $A_{m\acute{a}x}$  con el aumento de la fuerza iónica desde el valor más bajo ensayado, mientras que el valor de  $IC_{50}$  prácticamente no se vio modificado.

A la vista de los resultados obtenidos en los dos estudios anteriores, puede concluirse que los inmunoensayos escogidos para la cuantificación de fluopyram fueron robustos frente a cambios de pH y fuerza iónica, si bien valores extremos de ambas variables experimentales indujeron en algunos casos cambios importantes en la sensibilidad y/o la señal máxima de los ensayos. En este sentido, un resultado a destacar es la disminución del valor de  $IC_{50}$  del ensayo indirecto de fluopyram (FPb#12/OVA-FPhb) al aumentar tanto la fuerza iónica como el pH, por lo que cabría la posibilidad de modificar en este sentido las condiciones del ensayo para optimizar así la sensibilidad. Sin embargo, puesto que el valor de  $IC_{50}$  logrado con PBS ya era excelente, se consideró más oportuno mantener las condiciones iniciales con el fin de garantizar la compatibilidad del ensayo con todo tipo de muestras, independientemente de la modificación que pudieran ejercer sobre el pH o la fuerza iónica. Por tanto, para ambos ensayos se mantuvo el valor inicial de ambas variables experimentales.

En cuanto a los ensayos escogidos para el análisis de penthiopyrad, la sensibilidad no se vio afectada por las modificaciones de ninguna de las dos variables experimentales estudiadas, reflejando por tanto una interacción anticuerpo/analito muy robusta. No obstante, la señal máxima sí presentó una dependencia relevante tanto con el pH como con la fuerza iónica, siendo particularmente importante en el ensayo indirecto (PPm#410/OVA-PPd'). En cualquier caso, los resultados dieron a entender que los valores óptimos de estas variables experimentales en estos ensayos fueron los del PBS, dado que el intervalo de pH para el cual la señal máxima fue estable tuvo su centro aproximadamente a pH 7.4, mientras que una fuerza iónica de 166 mM constituyó un buen valor de compromiso para lograr una señal máxima en torno a la unidad.

### 3.7.3. Influencia de la presencia de disolventes orgánicos

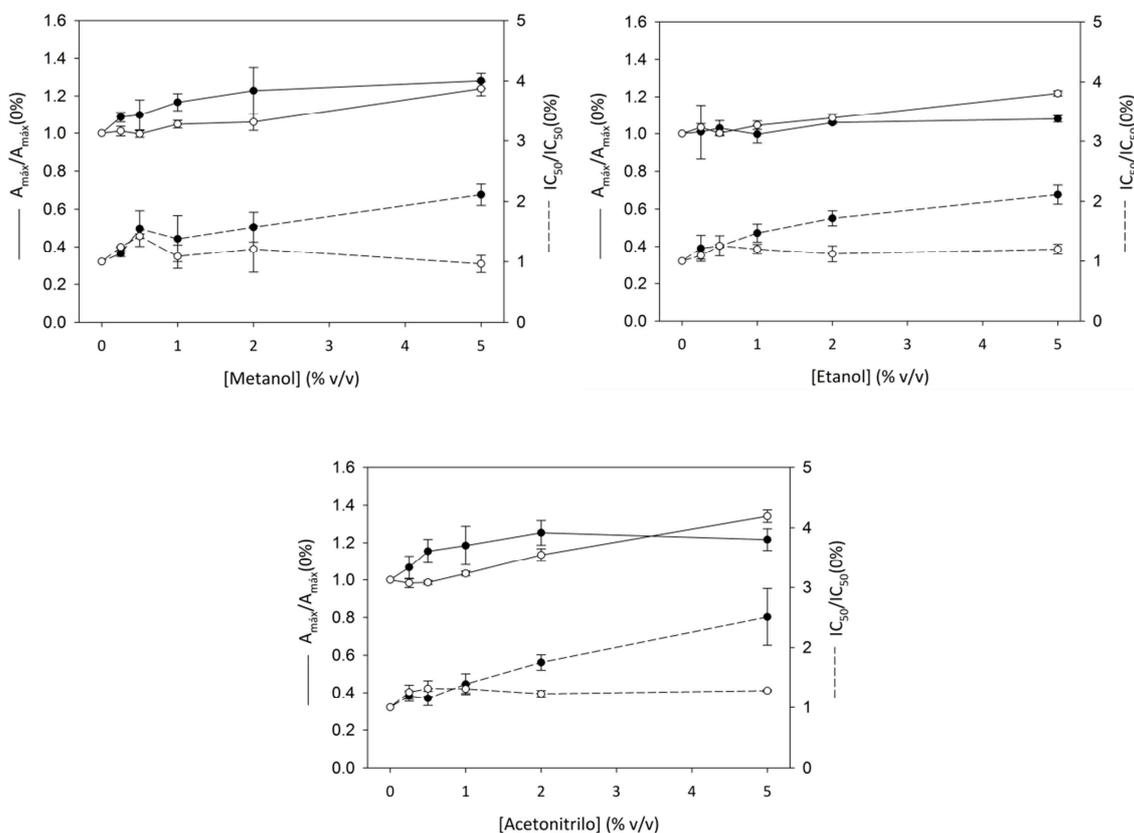
Dado el carácter fungicida de los dos analitos de estudio, el objetivo de los inmunoensayos a desarrollar fue su aplicación a muestras de origen vegetal que pudieran contener residuos de éstos. No obstante, el análisis mediante inmunoensayo se lleva a cabo con muestras líquidas, por lo que debe realizarse previamente un proceso de extracción de los posibles fungicidas de la muestra con un disolvente orgánico miscible con agua. Esto implica que el ensayo tendrá lugar en presencia de una pequeña concentración del disolvente de extracción, que puede llegar a influir en las propiedades del ensayo. Del mismo modo, algunos tipos de muestras pueden incorporar intrínsecamente componentes similares a los disolventes de extracción, como es el caso del etanol de los vinos. Por ello, se llevó a cabo un estudio de tolerancia a la presencia de dos disolventes de extracción habituales, como son el metanol y el acetonitrilo, y también a la de etanol, dado que los inmunoensayos pretendían aplicarse a muestras de vino, como se describirá más adelante.

Para llevar a cabo el estudio, se prepararon curvas estándar de los analitos en agua MilliQ conteniendo diferentes concentraciones del disolvente orgánico a evaluar, y se añadió el inmunorreactivo de competición disuelto en tampón fosfato con NaCl, de tal modo que la mezcla en ensayo tuviese la composición del PBS. De este modo, la influencia de los disolventes estudiados sobre los ensayos seleccionados para fluopyram se muestra en la Figura 3.27 en forma de variación de los valores de  $A_{\text{máx}}$  e  $IC_{50}$  respecto a los valores observados en ausencia de disolvente.

El ensayo directo de fluopyram (FPb#12/HRP-FPb) resultó ser tolerante a la presencia de los tres disolventes en el rango de concentración estudiado, ya que la presencia de ninguno de ellos dio lugar a grandes cambios de señal o sensibilidad. Así, no se produjo variación de la señal máxima hasta con un 5% (v/v) de etanol y ésta solamente se incrementó ligeramente conforme aumentó la proporción de metanol y acetonitrilo. Además, el valor de  $IC_{50}$  tan solo se duplicó con un 5% (v/v) de etanol o metanol y con un 2% (v/v) de acetonitrilo. Por tanto, el disolvente mejor tolerado por este ensayo fue el etanol.

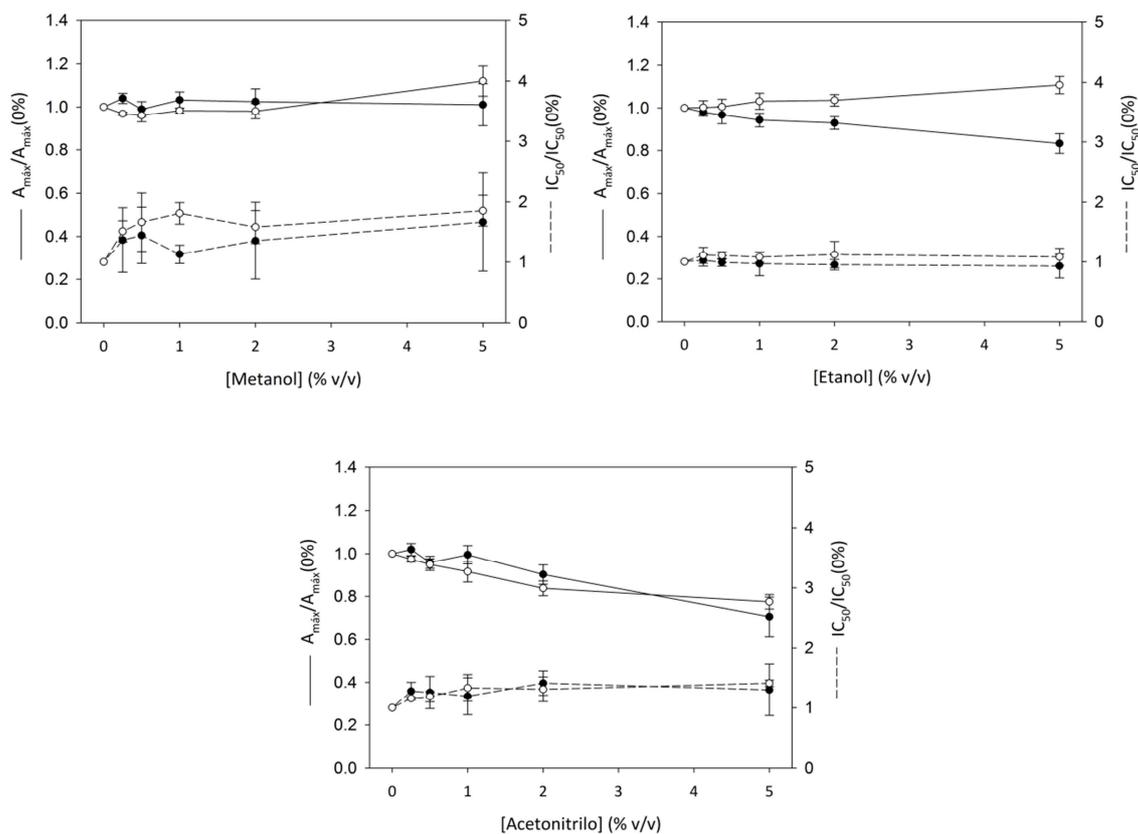
La situación fue todavía mejor para el ensayo indirecto (FPb#12/OVA-FPhb), que mostró muy buena tolerancia a los tres disolventes, especialmente a los dos alcoholes. Así, el valor de  $IC_{50}$  se mantuvo prácticamente invariable con concentraciones de hasta el 5% (v/v) de todos ellos. Por otro lado, solamente se observaron leves incrementos

de la señal máxima en el rango de concentraciones ensayado. Este ensayo mostró ser particularmente tolerante a etanol. Por ello, además de ser útil para el análisis de extractos diluidos de cualquiera de los tres disolventes, este ensayo podría ser de interés para el análisis de fluopyram en muestras con elevados contenidos de etanol.



**Figura 3.27.** Tolerancia de los inmunoensayos directo (●) e indirecto (○) de fluopyram a la presencia de disolventes orgánicos. Los valores corresponden a las condiciones en ensayo y son la media de tres réplicas independientes.

La Figura 3.28 muestra la influencia de metanol, etanol y acetonitrilo sobre los principales parámetros de la curva de inhibición de los ensayos seleccionados para penthiopyrad. El ensayo directo para este analito (PPm#410/HRP-PPm) fue bastante tolerante a la presencia de metanol y etanol. La señal máxima se mantuvo prácticamente invariable con hasta un 5% (v/v) de metanol hasta un 2% (v/v) de etanol, mostrando mayor variación en presencia de acetonitrilo. Por otro lado, la sensibilidad de este ensayo no experimentó prácticamente modificación alguna hasta con un 5% (v/v) de etanol, mientras que la presencia de metanol o de acetonitrilo aumentó ligeramente el valor de  $IC_{50}$  en el rango de concentración estudiado.



**Figura 3.28.** Tolerancia de los inmunoensayos directo (●) e indirecto (○) de penthiopyrad a la presencia de disolventes orgánicos. Los valores corresponden a las condiciones en ensayo y son la media de tres réplicas independientes.

En cuanto al ensayo indirecto de penthiopyrad (PPm#410/OVA-PPd'), el comportamiento observado fue muy similar al del ensayo directo para este analito. La presencia de metanol únicamente generó una variabilidad apreciable en la sensibilidad del ensayo. Por otro lado, el ensayo toleró perfectamente la presencia de proporciones de etanol de hasta el 5% (v/v), manteniéndose prácticamente inalteradas tanto la sensibilidad como la señal máxima. Por último, la respuesta al acetonitrilo fue prácticamente idéntica a la observada con el ensayo directo, es decir, se observó un ligero descenso de la señal máxima al incrementar la concentración de este disolvente pero sin producirse variación significativa de la  $IC_{50}$ .

A la vista de los resultados anteriores, se puede concluir que el disolvente que resultó globalmente mejor tolerado por todos los inmunoensayos seleccionados fue el etanol. En general, el acetonitrilo y el metanol también fueron tolerados por todos los ensayos, aunque ambos ejercieron una ligera influencia sobre un parámetro u otro de algunos ensayos. Por lo tanto, cualquiera de estos disolventes sería adecuado para la

obtención de extractos orgánicos destinados al análisis de fluopyram o penthiopyrad mediante los inmunoensayos propuestos.

#### 3.7.4. Características de los inmunoensayos desarrollados

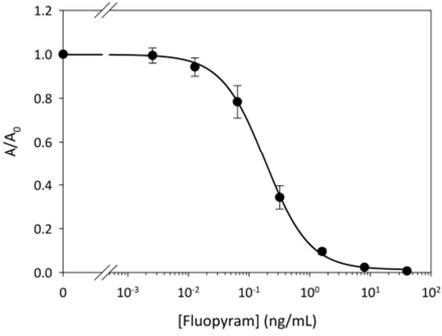
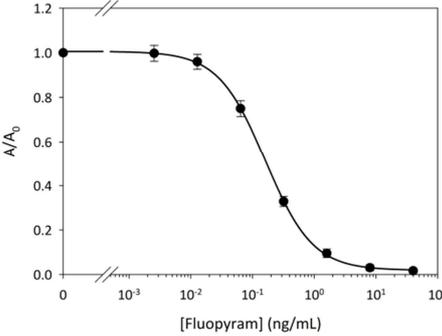
Una vez completados los estudios descritos anteriormente, el desarrollo de los cuatro inmunoensayos propuestos se dio por completado. A continuación se recogen las principales características de los métodos desarrollados, incluyendo la representación gráfica y los parámetros de la curva de calibrado, las condiciones de ensayo y algunos parámetros analíticos de interés, como son el límite de detección (LOD), el rango de trabajo y la precisión observada dentro del mismo día y a lo largo de diferentes días para la señal máxima y la sensibilidad de los ensayos.

Los ensayos desarrollados para el análisis de fluopyram se muestran en la Tabla 3.25. El ensayo directo (*FPb#12/HRP-FPb*) se caracterizó por un LOD de 0.031 ng/mL y por un intervalo de medida comprendido entre 0.060 y 0.595 ng/mL de fluopyram. En cuanto al ensayo indirecto para este analito (*FPb#12/OVA-FPhb*), el LOD se situó en un excelente valor de 0.024 ng/mL y el rango de trabajo fue desde 0.048 hasta 0.554 ng/mL de fungicida. Los rangos de trabajo de ambos métodos cubrieron así un orden de magnitud, característica derivada de los valores de pendiente próximos a la unidad. La medición de los valores de  $A_{m\acute{a}x}$  del ensayo directo fue bastante precisa, mientras que los coeficientes de variación para la  $IC_{50}$  fueron ligeramente elevados tanto en determinaciones inter-día como intra-día. Por su parte, el ensayo indirecto resultó ser altamente preciso, obteniéndose coeficientes de variación inter e intra-día inferiores al 10%.

Los inmunoensayos competitivos desarrollados para penthiopyrad se muestran en la Tabla 3.26. En el caso del ensayo directo (*PPm#410/HRP-PPm*), el LOD fue de 0.033 ng/mL y el rango de trabajo estuvo comprendido entre 0.057 y 0.393 ng/mL. Por su parte, el LOD del ensayo indirecto (*PPm#410/OVA-PPd'*) resultó ser de 0.038 ng/mL, mientras que el intervalo de medida fue desde 0.059 hasta 0.277 ng/mL. En comparación con los ensayos desarrollados para fluopyram, los rangos de trabajo de estos inmunoensayos fueron más estrechos debido a los valores relativamente elevados de la pendiente, especialmente en el caso del ensayo indirecto. A cambio, la cuantificación mediante cualquiera de estos métodos debería ser más precisa, dado que pequeños cambios en la concentración de penthiopyrad supondrían grandes

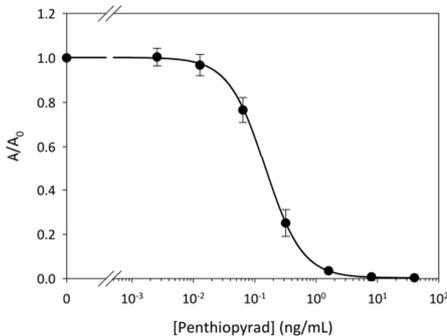
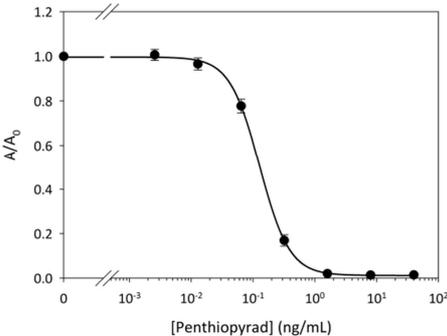
cambios en la señal. A la vista de los coeficientes de variación inter e intra-día para la medición de  $A_{m\acute{a}x}$  e  $IC_{50}$ , casi todos ellos inferiores al 10%, se puede afirmar que ambos inmunoensayos fueron altamente precisos, en especial el ensayo en formato indirecto.

**Tabla 3.25.** Curvas estándar normalizadas, condiciones y parámetros analíticos de los inmunoensayos desarrollados para fluopyram.<sup>a</sup>

	Formato directo	Formato indirecto
		
Anticuerpo	mAb FPb#12 a 1000 ng/mL	mAb FPb#12 a 30 ng/mL
Conjugado	HRP-FPb a 30 ng/mL	OVA-FPb a 1000 ng/mL
Tampón <sup>b</sup>	pH 7.4, I = 166 mM	pH 7.4, I = 166 mM
$A_{m\acute{a}x}$	$1.187 \pm 0.124$	$1.001 \pm 0.055$
$IC_{50}$ (ng/mL)	$0.187 \pm 0.046$	$0.162 \pm 0.016$
Pendiente	$-1.201 \pm 0.163$	$-1.139 \pm 0.083$
$A_{m\acute{i}n}$	$0.015 \pm 0.012$	$0.019 \pm 0.015$
LOD (ng/mL)	$0.031 \pm 0.014$	$0.024 \pm 0.004$
R. T. (ng/mL) <sup>c</sup>	De $0.060 \pm 0.022$ a $0.595 \pm 0.112$	De $0.048 \pm 0.007$ a $0.554 \pm 0.066$
CV inter-día (%) <sup>d</sup>		
$A_{m\acute{a}x}$	8	5
$IC_{50}$	25	8
CV intra-día (%) <sup>e</sup>		
$A_{m\acute{a}x}$	9	3
$IC_{50}$	11	8

<sup>a</sup> Los valores son la media de 12 réplicas independientes. <sup>b</sup> Parámetros fisicoquímicos óptimos del tampón de ensayo. <sup>c</sup> Rango de trabajo calculado como el intervalo  $IC_{20}$ - $IC_{80}$ . <sup>d</sup> Precisión inter-día calculada como el coeficiente de variación de 4 réplicas independientes. <sup>e</sup> Precisión intra-día calculada como el coeficiente de variación de 4 réplicas independientes.

**Tabla 3.26.** Curvas estándar normalizadas, condiciones y parámetros analíticos de los inmunoensayos desarrollados para penthiopyrad.<sup>a</sup>

	Formato directo	Formato indirecto
		
Anticuerpo	mAb PPm#410 a 1000 ng/mL	mAb PPm#410 a 100 ng/mL
Conjugado	HRP-PPm a 100 ng/mL	OVA-PPd' a 100 ng/mL
Tampón <sup>b</sup>	pH 7.4, I = 166 mM	pH 7.4, I = 166 mM
A <sub>máx</sub>	1.504 ± 0.263	0.985 ± 0.073
IC <sub>50</sub> (ng/mL)	0.150 ± 0.035	0.128 ± 0.012
Pendiente	-1.447 ± 0.137	-1.805 ± 0.093
A <sub>mín</sub>	0.003 ± 0.007	0.012 ± 0.005
LOD (ng/mL)	0.033 ± 0.009	0.038 ± 0.004
R. T. (ng/mL) <sup>c</sup>	De 0.057 ± 0.014 a 0.393 ± 0.094	De 0.059 ± 0.006 a 0.277 ± 0.030
CV inter-día (%) <sup>d</sup>		
A <sub>máx</sub>	14	4
IC <sub>50</sub>	9	5
CV intra-día (%) <sup>e</sup>		
A <sub>máx</sub>	7	7
IC <sub>50</sub>	8	8

<sup>a</sup> Los valores son la media de 12 réplicas independientes. <sup>b</sup> Parámetros fisicoquímicos óptimos del tampón de ensayo. <sup>c</sup> Rango de trabajo calculado como el intervalo IC<sub>20</sub>-IC<sub>80</sub>. <sup>d</sup> Precisión inter-día calculada como el coeficiente de variación de 4 réplicas independientes. <sup>e</sup> Precisión intra-día calculada como el coeficiente de variación de 4 réplicas independientes.

### 3.8. Validación y aplicación de inmunoensayos

La implementación de cualquier método de análisis requiere de la comprobación de la veracidad de los resultados que proporciona, es decir, de su validación analítica. Por este motivo, una vez optimizados y desarrollados los diferentes inmunoensayos competitivos para fluopyram y penthiopyrad, se llevó a cabo su validación empleando muestras de diferentes matrices alimentarias en las que fueran potencialmente

aplicables. En primer lugar, se cuantificaron los analitos de interés en muestras dopadas con concentraciones conocidas de éstos, y posteriormente se analizaron muestras de campo de concentración desconocida y se compararon los resultados con los obtenidos mediante un método de referencia. Una vez validados, y con el fin de demostrar su utilidad real, los inmunoensayos fueron empleados como técnica de análisis para llevar a cabo un estudio de transferencia de fungicidas desde la uva al vino en procesos de vinificación.

### 3.8.1. Obtención de muestras

Para validar los inmunoensayos desarrollados se decidió emplear muestras de frutos con relaciones superficie/volumen relativamente elevadas, tales como frutas de hueso o de pepita de tamaño mediano o pequeño. De este modo, las matrices modelo escogidas fueron ciruela amarilla y uva de cuatro variedades distintas: una blanca (macabeo) y tres tintas (bobal, garnacha y tempranillo). Los LMR europeos actuales para fluopyram en ciruela y uva son, respectivamente, 0.5 y 1.5 mg/kg. Para penthiopyrad, dicho valor en ciruela es 1.5 mg/kg, mientras que en uva corresponde al límite de cuantificación genérico fijado por la Comisión Europea, que es de 0.01 mg/kg.<sup>54</sup> Por tanto, considerando las características de los ensayos desarrollados, con cualquiera de ellos debería ser posible cuantificar concentraciones de analito muy inferiores a dichos límites legales.

Todas las matrices escogidas para la validación de los inmunoensayos eran frutos con pulpa y hueso o pepita, de modo que su análisis directo mediante ELISA competitivo no era posible. Por ello, fue necesario emplear una técnica de extracción para poder manejar muestras líquidas. La extracción también fue necesaria para los análisis mediante el método cromatográfico de referencia, como se describirá más adelante en la sección 3.8.4. Los extractos de ciruela y uva se obtuvieron a partir de las correspondientes muestras homogeneizadas mediante el método de extracción QuChERS, acrónimo en inglés de “*Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe*”. Este método es la estrategia recomendada por la AOAC International (*Association of Analytical Communities*, Método Oficial AOAC 2007.01) y por el CEN (*Comité Européen de Normalisation*, EN 15662:2008) para la extracción de residuos de fungicidas de matrices alimentarias.<sup>181-183</sup>

El método QuEChERS consta de una primera etapa de extracción con acetonitrilo en la que se añaden ácido acético, acetato sódico,  $\text{MgSO}_4$  y, si procede, una determinada cantidad de un patrón interno. La homogeneización de la mezcla da lugar a una fase acuosa tamponada con pH ligeramente ácido que favorece la migración de los fungicidas y del patrón interno a la fase orgánica, la cual es a su vez secada por acción del  $\text{MgSO}_4$ . En una segunda etapa, la fase orgánica se seca con más  $\text{MgSO}_4$  y se limpia mediante extracción en fase sólida dispersiva empleando PSA (*primary/secondary amine*), que viene a ser gel de sílice funcionalizado con etilendiamina. Esta funcionalización le confiere una densidad superficial de carga positiva, por lo que puede adsorber por interacción electrostática diversos tipos de moléculas, habitualmente presentes en alimentos, que podrían interferir en el posterior análisis (pigmentos, azúcares o ácidos grasos, entre otros). Se obtiene así un extracto purificado en acetonitrilo que contiene los fungicidas de la muestra inicial y el patrón interno añadido inicialmente.

Aunque el principal objetivo de la obtención de muestras fue la validación de los ensayos desarrollados, también se contempló su utilización con el fin de aplicar los inmunoensayos desarrollados a un estudio analítico real. En particular, se planteó llevar a cabo un breve estudio de la transferencia de los fungicidas fluopyram y penthiopyrad desde la uva al vino. Con este objetivo, en primer lugar se obtuvo un conjunto de muestras de campo con distintas concentraciones de analitos a partir de cultivos de los frutos escogidos, que fueron sometidos antes de ser recogidos a dos tratamientos con los fungicidas de estudio. El tratamiento 1 (T1) consistió en la aplicación de fluopyram (*Luna® Experience*) o penthiopyrad (*Fontelis®*) a las dosis recomendadas por los fabricantes, mientras que el tratamiento 2 (T2) se llevó a cabo empleando el doble de dicha dosis, emulando así una mala práctica agrícola. Cuando se trataron ciruelas, se recogieron dos muestras por día (M1 y M2) a lo largo de una semana (D1, D3, D5 y D7). En el caso de la uva, se recogió una muestra de cada variedad en distintos días (D1 y D3). De esta forma, para cada analito se reunieron 16 muestras de ciruela y 4 muestras de cada una de las cuatro variedades de uva, es decir, 16 muestras de uva en total. Asimismo, en todos los casos se recogieron frutos sin tratar, que sirvieron como control y también para la preparación posterior de muestras dopadas. Tras su recolección, las muestras fueron trituradas, homogeneizadas y conservadas a  $-20\text{ °C}$  hasta el momento de su análisis, para lo que se obtuvieron los correspondientes extractos mediante el método QuEChERS. Siguiendo este

procedimiento, a partir de las muestras de campo se obtuvieron 16 extractos de ciruela y 16 extractos de uva para cada analito. Del mismo modo, se obtuvieron extractos de las muestras no tratadas.

En segundo lugar, a partir de las diferentes muestras de uva homogeneizada, tanto tratadas como sin tratar, se obtuvieron por filtración los correspondientes mostos, que se sometieron después a una fermentación alcohólica promovida por la acción de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. El proceso dio lugar así a un conjunto de vinos, blancos o tintos en función de la variedad de uva de partida, cuyo contenido en etanol y otros componentes habituales fue monitorizada como control de calidad del proceso (Tabla 3.27). Esta información también resultó de interés para los inmunoensayos, puesto que algunos componentes como los azúcares o el etanol podrían afectar a su funcionamiento.

**Tabla 3.27.** Propiedades de mostos y vinos obtenidos a partir de las muestras de uva recolectadas.<sup>a</sup>

	Bobal	Garnacha	Macabeo	Tempranillo
Fermentación (h)	141.11	157.11	167.78	143.78
Composición mosto				
Glucosa (mg/mL)	91.33	102.57	105.64	103.76
Fructosa (mg/mL)	91.65	105.48	101.91	106.87
Glicerol (mg/mL)	0.20	0.35	0.41	0.28
Etanol (% v/v)	3.75	4.78	4.88	4.75
Ác. acético (mg/mL)	0.00	0.00	0.00	0.00
Composición vino				
Glucosa (mg/mL)	0.43	0.96	3.82	0.55
Fructosa (mg/mL)	1.39	1.54	1.21	3.83
Glicerol (mg/mL)	7.34	9.24	8.83	7.40
Etanol (% v/v)	10.01	12.27	12.38	10.74
Ác. acético (mg/mL)	0.59	0.84	0.70	0.69

<sup>a</sup> Los valores son la media de las nueve muestras de cada variedad, independientemente de su tratamiento o del día de recogida.

Todas las muestras tardaron en torno a 6 días en completar su vinificación, monitorizada mediante el seguimiento de la densidad de la mezcla. Los resultados también reflejan la desaparición casi completa de los altos contenidos en azúcares de los mostos tras completarse la fermentación, produciéndose a su vez la formación de glicerol, etanol y ácido acético hasta concentraciones en torno a 8 mg/mL, 11% (v/v) y

0.7 mg/mL, respectivamente. Comparando las distintas variedades de uva, los mostos de tipo bobal mostraron una concentración de azúcares algo más reducida que los restantes, lo que probablemente repercutió en menores tiempos de fermentación. Por su parte, el contenido en glucosa y fructosa en los vinos de variedades macabeo y tempranillo tras la vinificación fue levemente superior. En cuanto a la graduación alcohólica, los vinos de tipo garnacha y macabeo resultaron contener las mayores proporciones de etanol.

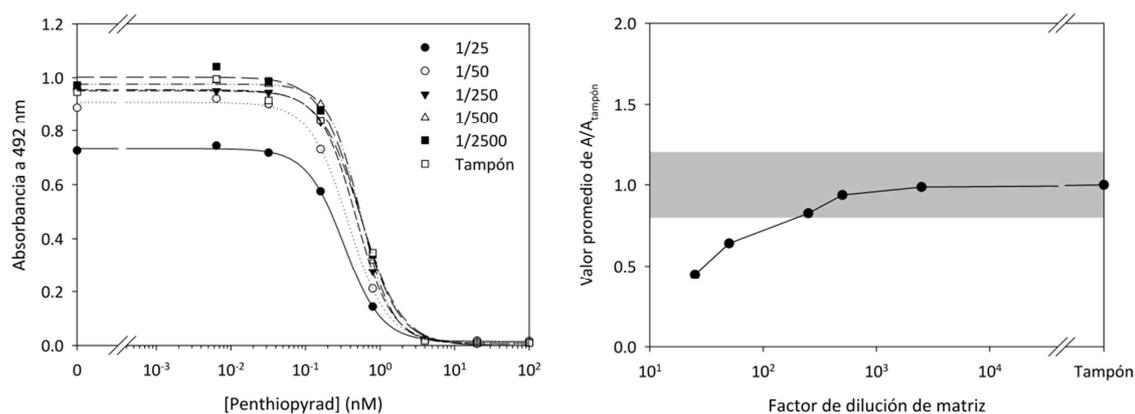
En resumen, la aplicación de los preparados comerciales de fluopyram y penthiopyrad a cultivos de ciruela amarilla y de cuatro variedades de uva proporcionó un total de 32 muestras de campo para cada analito, la mitad de ellas de ciruela y la otra mitad de uva, cuyo tratamiento con el método QuEChERS dio lugar a los correspondientes extractos orgánicos de fruta, aptos ya para su análisis. Además, a partir de las muestras de uva se obtuvieron los respectivos mostos, cuya fermentación alcohólica dio lugar al correspondiente conjunto de vinos. Del mismo modo, la utilización de dichos procedimientos con frutas no tratadas proporcionó muestras de todos los tipos libres de fluopyram y penthiopyrad.

### **3.8.2. Estudio de los efectos matriz**

Una característica común a todos los métodos analíticos que hacen uso de curvas de calibrado con patrones es la diferencia de composición existente entre dichos patrones y las muestras a analizar. Por ello, en ocasiones, algunos componentes de la muestra procedentes de la matriz pueden interferir notablemente en el resultado del análisis, dando lugar a lo que se conoce como efecto matriz. En el caso de los inmunoensayos las muestras son líquidas y los límites de detección son generalmente muy reducidos, por lo que el efecto debería poder corregirse si la muestra se diluye lo suficiente.

De este modo, con el fin de encontrar la dilución mínima de muestra necesaria para corregir el efecto matriz en los inmunoensayos desarrollados, se ensayaron las curvas estándar en presencia de diversas diluciones de cada matriz estudiada (extracto de fruta, mosto o vino), y se compararon con la curva estándar obtenida en ausencia de matriz. Se utilizó para ello las muestras no tratadas, que fueron diluidas en agua MilliQ (diluciones 1/25, 1/50, 1/250, 1/500 y 1/2500) y suplementadas con analito en el momento del ensayo. A modo de ejemplo, la Figura 3.29 (izquierda) muestra el

efecto matriz del mosto de variedad macabeo en el inmunoensayo indirecto de penthiopyrad (PPm#410/OVA-PPd'), reflejado en las variaciones que experimenta la curva de inhibición cuando se lleva a cabo el ensayo en un medio con contenido creciente de mosto. En este caso, el incremento en la proporción de matriz generó un descenso generalizado de la señal, incluso en el rango de trabajo (intervalo IC<sub>20</sub>-IC<sub>80</sub>), por lo que la cuantificación de penthiopyrad en una muestra insuficientemente diluida daría lugar previsiblemente a una sobreestimación del valor real.



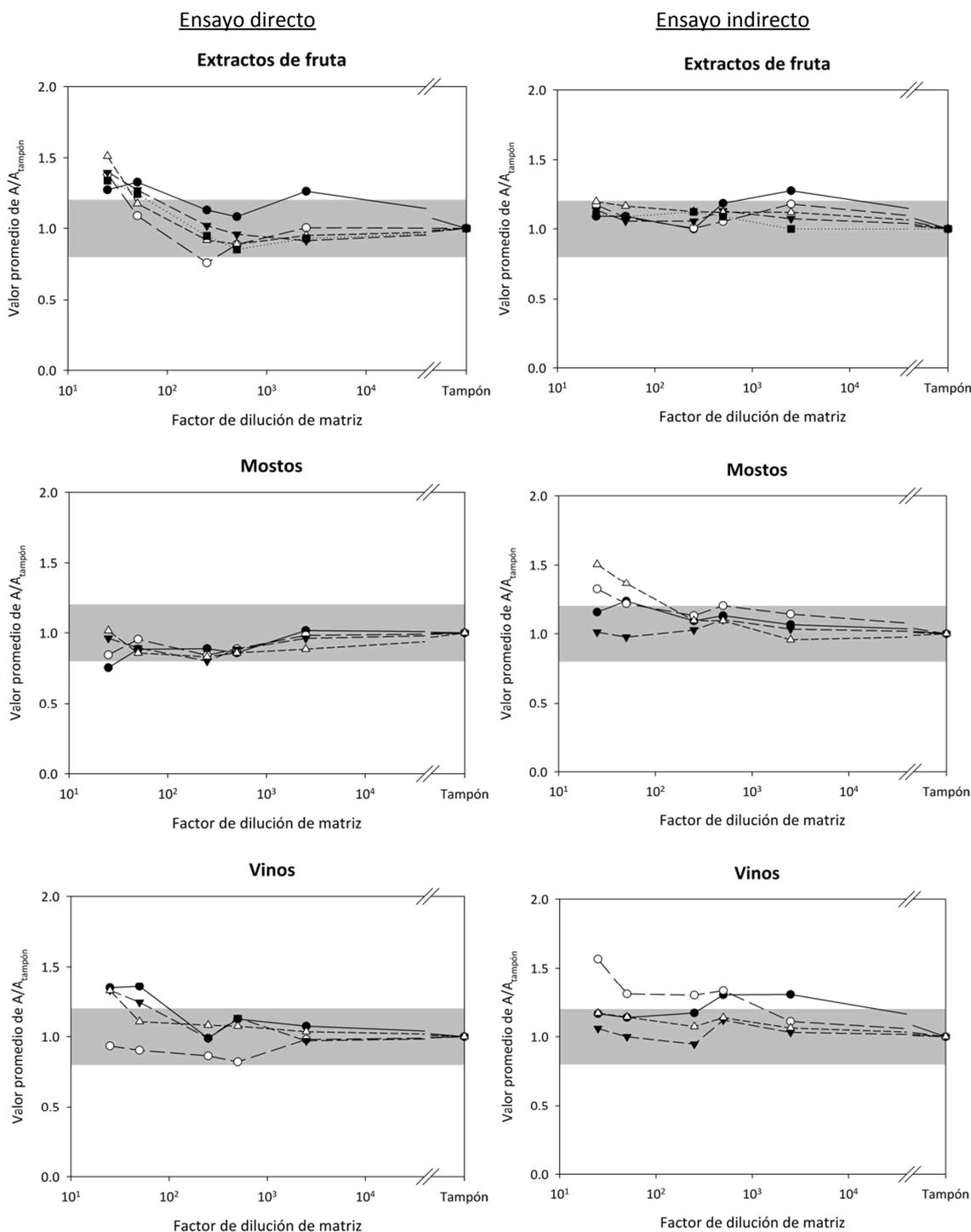
**Figura 3.29.** Efecto del mosto de variedad macabeo en el ensayo indirecto de penthiopyrad (PPm#410/OVA-PPd'). A la izquierda, modificación de la curva de inhibición en presencia de diferentes diluciones de la matriz. A la derecha, evolución del valor promedio del cociente entre la señal obtenida en cada punto de la curva en presencia de matriz y la señal obtenida en cada punto de la curva de control a lo largo del rango de trabajo (en gris se ha resaltado el intervalo 0.8–1.2 para el eje de ordenadas). Las diluciones de matriz mostradas en ambas gráficas son antes de ensayo.

Dada la importancia que tiene la variación de la señal en el rango de trabajo debida al efecto matriz, es interesante efectuar una representación gráfica alternativa y más compacta de dicha variación en función del factor de dilución de la matriz que permita estimar la dilución mínima recomendable, por ejemplo en forma de valor promedio del cociente entre la señal en cada punto de la curva en presencia de matriz y la señal en cada punto de la curva de control en tampón ( $A/A_{\text{tampón}}$ ) en dicho rango. Puesto que los puntos experimentales de un ELISA competitivo definen una curva sigmoide que puede ajustarse matemáticamente a una función logística de cuatro parámetros (Ecuación 5.4, sección 5.8.3), dicho valor promedio puede estimarse a partir del cociente de las dos funciones logísticas implicadas mediante cálculo integral (Ecuación 5.16, sección 5.11.4). Así, en la Figura 3.29 (derecha) se muestra una representación

gráfica de este tipo para el mismo inmunoensayo y matriz indicados en el párrafo anterior. Tomando como referencia la señal de la curva control (valor promedio del cociente  $A/A_{\text{tampón}}$  igual a 1), en ella puede apreciarse claramente una significativa disminución de la señal promedio en el rango de trabajo al realizar el ensayo con el mosto diluido al menos 50 veces, mientras que no hubo perturbaciones importantes cuando la matriz se diluyó al menos 250 veces, quedando el valor promedio de  $A/A_{\text{tampón}}$  a partir de este umbral en un intervalo de fiabilidad establecido arbitrariamente en  $\pm 0.2$ .

Este tratamiento de los resultados se aplicó a la representación gráfica del efecto matriz de los 13 tipos de muestras disponibles (5 tipos de extractos de fruta, 4 de mostos y 4 de vinos) sobre los cuatro inmunoensayos desarrollados. De este modo, para los ensayos para fluopyram, los resultados se muestran en la Figura 3.30.

En el caso del ensayo directo de fluopyram (FPb#12/HRP-FPb) realizado en presencia de extractos de fruta, la curva únicamente se vio modificada de forma significativa cuando éstos se diluyeron 50 veces o menos, produciéndose un aumento de la señal promedio en el rango de trabajo. Dado que todos los extractos dieron lugar a un comportamiento muy similar, y teniendo en cuenta que el procedimiento de extracción también implicaba una limpieza del extracto, es muy probable que el efecto en este caso fuese debido al acetonitrilo. De hecho, el análisis de una muestra diluida 25 veces implica la presencia de un 2% (v/v) de disolvente en ensayo, capaz de duplicar el valor de  $IC_{50}$  e incrementar levemente el valor de  $A_{\text{máx}}$  (ver Figura 3.27), lo que daría lugar al aumento observado de la señal promedio. Por su parte, para este ensayo no se observó un efecto matriz importante cuando se ensayaron los cuatro mostos disponibles, ni tan siquiera a una dilución 1/25, lo cual sorprende teniendo en cuenta el considerable contenido en azúcares de todos ellos. Con el vino de variedad garnacha se observó una tendencia parecida, mientras que el de tipo tempranillo sólo hubo cambios significativos en la curva de inhibición en la menor dilución ensayada (1/25). Los restantes vinos tuvieron que ser diluidos al menos 250 veces para eliminar el efecto matriz.



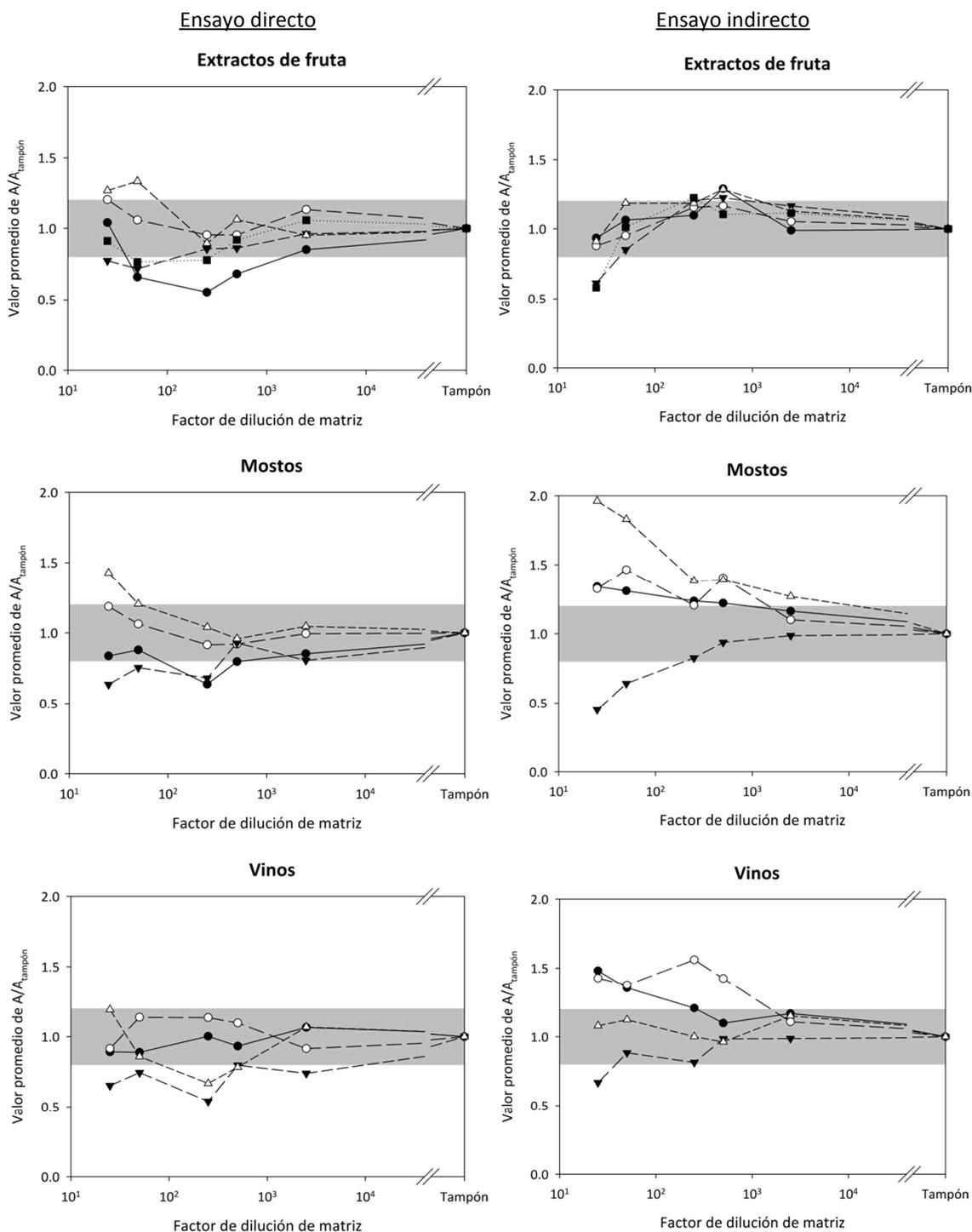
**Figura 3.30.** Efecto matriz para los extractos de ciruela (■) y para los extractos de uva, mostos y vinos de variedades bobal (●), garnacha (○), macabeo (▼) y tempranillo (△) en los ensayos seleccionados para fluopyram. Se ha resaltado en fondo gris el intervalo 0.8–1.2 para el eje de ordenadas. Los factores de dilución (1/25, 1/50, 1/250, 1/500 y 1/2500) son antes de ensayo.

El efecto de los extractos de fruta sobre el ensayo indirecto propuesto para fluopyram (FPb#12/OVA–FPhb) fue menor que en el correspondiente ensayo directo,

ya que ninguno de ellos indujo cambios importantes en la curva de inhibición, ni tan siquiera diluyéndolos 25 veces. Este resultado pone indirectamente de manifiesto la eficacia del método QuEChERS para obtener un extracto libre de compuestos que puedan interferir potencialmente en los ensayos. Del mismo modo, el ensayo toleró muy bien la presencia de los mostos de variedades bobal y macabeo, mientras que se mostró algo más sensible a los de variedades garnacha y tempranillo, los cuales tuvieron que ser diluidos al menos 250 veces para eliminar completamente el efecto matriz. Por su parte, el vino de variedad garnacha produjo un aumento de la señal promedio a diluciones iguales o inferiores a 1/500, mientras que el resto de vinos no provocaron perturbaciones importantes en la curva de inhibición.

El efecto matriz de los distintos tipos de muestras sobre los inmunoensayos desarrollados para penthiopyrad se muestra gráficamente en la Figura 3.31. En el caso del ensayo directo ( $PPm\#410/HRP-PPm$ ), de los cinco extractos de fruta ensayados, únicamente el obtenido a partir de uva garnacha fue tolerado dentro de los límites aceptables. Los extractos de ciruela y los de uva de tipos macabeo y tempranillo provocaron perturbaciones leves en la curva de inhibición, cuya corrección se pudo efectuar tras ser diluidos entre 250 y 500 veces. Por su parte, el extracto de uva bobal indujo una severa reducción de la señal promedio en el rango de trabajo, siendo necesario diluirlo al menos 2500 veces (1/5000 en ensayo) para obtener una curva aceptable. Sin embargo, el correspondiente mosto no pareció afectar al ensayo, siendo posible obtener una curva mínimamente disminuida en presencia de una dilución 1/25 de la matriz. Los restantes mostos indujeron perturbaciones en la curva de inhibición muy similares a las de sus correspondientes extractos de fruta, con la diferencia de que el efecto matriz debido al mosto macabeo se corrigió a una dilución algo superior. Por su parte, la mayoría de los vinos no afectaron de forma importante a este ensayo, siendo el único caso destacable el de variedad macabeo, que tuvo una influencia sobre el inmunoensayo muy similar a la de su correspondiente mosto.

A diferencia de la considerable influencia que ejercieron casi todos los extractos de fruta sobre el ensayo directo de penthiopyrad ( $PPm\#410/HRP-PPm$ ), dichas matrices fueron mucho mejor toleradas por parte del ensayo indirecto para este analito ( $PPm\#410/OVA-PPd'$ ). Así, únicamente los extractos de ciruela y de uva macabeo dieron lugar a una reducción significativa de la señal promedio en el intervalo de medida que pudo corregirse hasta entrar en límites aceptables tras ser diluidos únicamente 50 veces. Sin embargo, la curva de inhibición se vio severamente alterada



**Figura 3.31.** Efecto matriz para los extractos de ciruela (■) y para los extractos de uva, mostos y vinos de variedades bobal (●), garnacha (○), macabeo (▼) y tempranillo (△) en los ensayos seleccionados para penthiopyrad. Se ha resaltado en fondo gris el intervalo 0.8–1.2 para el eje de ordenadas. Los factores de dilución (1/25, 1/50, 1/250, 1/500 y 1/2500) son antes de ensayo.

con todos los mostos ensayados, especialmente los de variedades macabeo y tempranillo, probablemente debido a la interferencia de la glucosa y fructosa

altamente presentes en estas matrices. Mientras que el efecto debido al mosto de variedad macabeo sí pudo corregirse a una dilución moderada de 1/250, los restantes mostos requirieron diluciones iguales o superiores a la más alta ensayada (1/2500) para obtener una curva de calibrado adecuada. Curiosamente, los vinos de variedades macabeo y tempranillo fueron muy bien tolerados por el ensayo, produciéndose únicamente un leve descenso de la señal promedio con el de tipo macabeo a una dilución 1/25. Por su parte, los vinos de variedades bobal y garnacha provocaron aumentos de la señal promedio del ensayo, que fueron corregidos a diluciones 1/250 y 1/2500, respectivamente.

A la vista de todos los resultados anteriores, puede concluirse que cualquiera de los dos inmunoensayos desarrollados para fluopyram podría emplearse en el análisis de muestras de cualquiera de las matrices estudiadas diluidas al menos 50 veces (1/100 en ensayo), con la excepción de los vinos de variedad garnacha, que parecieron requerir una dilución mayor para su análisis con el ensayo indirecto (FPb#12/OVA-FPhb). Por su parte, los inmunoensayos desarrollados para penthiopyrad necesitaron diluciones generalmente más elevadas de los mismos tipos de muestras para la eliminación de los efectos matriz, especialmente en el caso de mostos analizados mediante el ensayo indirecto (PPm#410/OVA-PPd'). Dado que todos los inmunoensayos desarrollados constituyen métodos de análisis de trazas, en este tipo de casos sería necesaria una optimización previa del factor de dilución de la muestra en ensayo, con el objetivo de minimizar los efectos matriz y a la vez conseguir una concentración comprendida en el intervalo de medida y además superior al límite de detección.

### **3.8.3. Análisis de muestras fortificadas**

Una vez evaluado el efecto matriz de los extractos de fruta, mostos y vinos sobre los ensayos, se procedió a su validación analítica, en primer lugar mediante el análisis de muestras dopadas con cantidades conocidas de fluopyram o penthiopyrad. Para ello, las muestras de frutas no tratadas fueron suplementadas con distintas concentraciones del analito de estudio en cada caso, todas ellas intencionadamente inferiores a los correspondientes LMR y de forma que se cubrieran dos órdenes de magnitud (5, 10, 50, 100, 200 y 500 ng/mL). En este sentido, dado que la Comisión Europea no establece LMR para alimentos procesados, como es el caso de los mostos y vinos, se tomó como referencia el valor en uva (1500 ng/g para fluopyram y el valor

genérico de 10 ng/g para penthiopyrad). Posteriormente, las muestras dopadas obtenidas se diluyeron en agua MilliQ 25, 50 y 150 veces, se analizaron mediante los inmunoensayos desarrollados, y se evaluó la similitud de las concentraciones halladas respecto a las reales mediante el cálculo de los coeficientes de recuperación (R). Aunque en algunos casos las diluciones de muestra no darían lugar a una corrección total del efecto matriz, este diseño experimental se consideró oportuno para evaluar la capacidad analítica de los inmunoensayos propuestos en muestras con una concentración de analito realmente reducida, y por tanto con poco margen de dilución. Se consideró como límite de cuantificación la concentración más baja ensayada con la que se obtuvo una recuperación en el intervalo de 80% a 120% y a su vez con un coeficiente de variación inferior al 20%. Las recuperaciones halladas en extractos de ciruela dopados con ambos analitos se recopilan en la Tabla 3.28.

**Tabla 3.28.** Coeficientes de recuperación obtenidos mediante ELISA competitivo con extractos de ciruela fortificados con fluopyram o con penthiopyrad.<sup>a</sup>

[Analito] (ng/mL)	Inmunoensayos para fluopyram				Inmunoensayos para penthiopyrad			
	Directo		Indirecto		Directo		Indirecto	
	f <sup>b</sup>	R (%) <sup>c</sup>	f	R (%)	f	R (%)	f	R (%)
5	50	115 ± 11	25	94 ± 9	25	- <sup>d</sup>	50	-
10	50	96 ± 8	25	83 ± 6	25	112 ± 16	50	98 ± 6
50	50	97 ± 8	25	91 ± 5	25	107 ± 15	150	99 ± 8
100	150	104 ± 17	25	105 ± 6	25	101 ± 18	150	103 ± 15
200	150	105 ± 7	25	101 ± 12	50	90 ± 13	150	112 ± 12
500	150	-	25	-	50	98 ± 11	150	93 ± 13

<sup>a</sup> Los valores corresponden a la media de cinco réplicas independientes. <sup>b</sup> Factor de dilución de la muestra. <sup>c</sup> Coeficiente de recuperación y desviación estándar. <sup>d</sup> Valor fuera del intervalo de recuperación 80–120%.

Los cuatro inmunoensayos desarrollados dieron lugar a recuperaciones excelentes con todas las muestras dopadas de ciruela. Así, los ensayos para fluopyram alcanzaron límites de cuantificación de tan solo 5 ng/mL de fungicida, mientras que la muestra a 500 ng/mL pareció requerir una mayor dilución para su correcto análisis. Por su parte, los ensayos desarrollados para penthiopyrad permitieron medir de manera exacta y precisa concentraciones de hasta 10 ng/mL de analito. Estos límites de cuantificación están muy por debajo de los LMR europeos en ciruela para fluopyram y penthiopyrad (500 y 1500 ng/g, respectivamente).

**Tabla 3.29.** Recuperaciones obtenidas mediante ELISA competitivo con extractos de cuatro variedades de uva y sus correspondientes mostos y vinos fortificados con fluopyram.<sup>a</sup>

Ensayo	Matriz	[FP] <sup>b</sup>	Bobal		Garnacha		Macabeo		Tempranillo		
			f <sup>c</sup>	R (%) <sup>d</sup>	f	R (%)	f	R (%)	f	R (%)	
Directo	Extracto de uva	5	50	96±5	25	107±9	25	107±16	25	112±13	
		10	50	102±8	25	99±3	25	101±7	25	104±3	
		50	50	97±8	50	103±4	50	104±6	25	99±13	
		100	150	115±2	50	101±4	50	102±14	25	85±12	
		200	150	110±5	50	100±5	50	95±15	150	115±9	
		500	150	97±8	50	102±10	50	96±15	150	107±7	
	Mosto	5	50	- <sup>e</sup>	25	112±12	50	-	25	-	
		10	50	115±13	25	121±15	50	126±21	25	109±8	
		50	50	104±8	150	115±9	50	112±9	25	116±14	
		100	50	103±4	150	107±4	50	97±5	150	104±18	
		200	150	101±6	150	98±14	150	108±9	150	115±16	
		500	150	99±5	150	98±17	150	100±9	150	104±17	
	Vino	5	25	111±20	25	-	25	118±12	25	-	
		10	25	110±18	25	-	25	122±3	25	104±16	
		50	25	93±6	25	105±15	25	102±10	25	112±13	
		100	150	106±8	25	110±22	150	101±4	150	110±13	
		200	150	89±9	25	114±16	150	104±4	150	107±9	
		500	150	98±15	25	105±15	150	102±7	150	99±17	
	Indirecto	Extracto de uva	5	50	93±3	50	84±16	50	77±10	50	81±17
			10	150	104±13	150	101±13	150	102±10	150	114±10
			50	150	98±11	150	98±6	150	95±3	150	100±5
			100	150	103±6	150	103±1	150	97±4	150	107±5
			200	150	103±3	150	101±4	150	100±9	150	103±6
			500	150	100±4	150	98±8	150	105±7	150	109±9
Mosto		5	50	-	50	-	25	103±7	50	-	
		10	150	88±11	150	75±11	25	92±8	150	-	
		50	150	75±9	150	-	150	97±2	150	-	
		100	150	71±7	150	73±8	150	98±7	150	-	
		200	150	71±11	150	78±7	150	101±9	150	-	
		500	150	-	150	88±12	150	101±19	150	-	
Vino		5	25	79±12	50	-	25	99±5	25	-	
		10	150	103±15	150	92±15	150	107±18	25	83±11	
		50	150	93±19	150	87±15	150	98±12	25	96±12	
		100	150	89±13	150	87±12	150	97±10	25	100±9	
		200	150	103±21	150	86±8	150	99±12	150	94±8	
		500	150	101±18	150	83±8	150	102±17	150	95±13	

<sup>a</sup> Los valores corresponden a la media de cinco réplicas independientes. <sup>b</sup> Concentración fortificada de fluopyram expresada en ng/mL. <sup>c</sup> Factor de dilución de la muestra. <sup>d</sup> Coeficiente de recuperación y desviación estándar. <sup>e</sup> Valor fuera del intervalo de recuperación 70–130%.

La Tabla 3.29 recoge los resultados obtenidos a partir de los extractos de las cuatro variedades de uva, así como sus correspondientes mostos y vinos derivados, dopados con fluopyram. A la vista de los resultados, el ensayo directo (FPb#12/HRP-FPb) mostró igualmente una elevada capacidad para cuantificar correctamente todos los extractos de uva dopados, independientemente de su variedad y sin necesidad de diluir excesivamente las muestras. La determinación fue especialmente exacta y precisa en extractos de uva garnacha, con recuperaciones en el rango 90–110% y desviaciones estándar inferiores a 10% en todos los casos. El ensayo también mostró un muy buen comportamiento en el análisis de mostos, con ciertas desviaciones en algunos casos pero dentro de límites aceptables, siendo posible el análisis de hasta 10 ng/mL de fluopyram con todos ellos y de 5 ng/mL en mostos de tipo garnacha. En el caso de los vinos, todas las muestras con valores de fortificación entre 50 y 500 ng/mL pudieron ser correctamente cuantificadas, aunque la capacidad de determinar concentraciones inferiores varió según el tipo de uva de partida, observándose los mejores resultados con los de variedades bobal y macabeo.

Por su parte, el análisis de extractos de uva con el ensayo indirecto de fluopyram (FPb#12/OVA-FPhb) proporcionó recuperaciones excelentes en el rango de fortificación a una dilución 1/150. Para este tipo de muestras pudieron cuantificarse de forma exacta y precisa hasta 5 ng/mL de fluopyram, un valor superior al del correspondiente ensayo directo pero igualmente muy por debajo del LMR para este alimento (1500 ng/g). Para la determinación de fluopyram en muestras de mosto, este ensayo no parece ser tan adecuado como el directo. Tan solo el mosto de variedad blanca macabeo pudo analizarse correctamente, alcanzando un límite de cuantificación de 5 ng/mL. Por el contrario, los mostos de variedades bobal y garnacha proporcionaron, con un límite de cuantificación superior, recuperaciones inferiores a las deseables pero en el límite de lo aceptable, aunque una dilución 1/150 no fue suficiente para cuantificar adecuadamente fluopyram en las muestras de mosto tempranillo. En cambio, las recuperaciones obtenidas en las mismas condiciones con muestras dopadas de vino fueron excelentes con las cuatro variedades, lográndose nuevamente límites de cuantificación de 10 ng/mL e incluso de 5 ng/mL en el caso de la variedad blanca macabeo.

**Tabla 3.30.** Recuperaciones obtenidas mediante ELISA competitivo con extractos de cuatro variedades de uva y sus correspondientes mostos y vinos fortificados con penthiopyrad.<sup>a</sup>

Ensayo	Matriz	[PP] <sup>b</sup>	Bobal		Garnacha		Macabeo		Tempranillo		
			f <sup>c</sup>	R (%) <sup>d</sup>	f	R (%)	f	R (%)	f	R (%)	
Directo	Extracto de uva	5	25	- <sup>e</sup>	50	-	50	-	25	121 ± 21	
		10	25	-	50	-	150	114 ± 28	25	125 ± 8	
		50	25	110 ± 9	150	118 ± 9	150	100 ± 12	25	108 ± 10	
		100	25	100 ± 10	150	113 ± 19	150	106 ± 15	25	100 ± 6	
		200	150	99 ± 13	150	113 ± 7	150	91 ± 11	150	102 ± 7	
		500	150	88 ± 4	150	104 ± 11	150	89 ± 4	150	99 ± 4	
	Mosto	5	25	-	25	109 ± 11	25	-	25	114 ± 6	
		10	25	122 ± 9	25	108 ± 11	25	-	25	106 ± 6	
		50	25	108 ± 9	25	94 ± 11	25	109 ± 19	25	87 ± 11	
		100	150	97 ± 12	25	90 ± 11	25	99 ± 10	150	94 ± 14	
		200	150	97 ± 3	150	87 ± 7	150	102 ± 15	150	91 ± 11	
		500	150	104 ± 12	150	100 ± 8	150	91 ± 12	150	111 ± 17	
	Vino	5	25	120 ± 13	50	109 ± 4	50	-	50	121 ± 5	
		10	25	117 ± 13	50	106 ± 19	50	110 ± 6	50	104 ± 7	
		50	25	102 ± 13	150	108 ± 11	50	112 ± 22	50	106 ± 14	
		100	25	106 ± 14	150	107 ± 20	150	102 ± 10	50	96 ± 13	
		200	150	107 ± 19	150	105 ± 21	150	97 ± 13	150	96 ± 5	
		500	150	80 ± 24	150	99 ± 20	150	86 ± 17	150	97 ± 16	
	Indirecto	Extracto de uva	5	25	106 ± 9	25	96 ± 7	50	-	25	96 ± 9
			10	25	108 ± 10	25	101 ± 6	50	111 ± 7	25	98 ± 9
			50	150	98 ± 7	150	100 ± 9	50	107 ± 7	150	93 ± 11
100			150	107 ± 10	150	110 ± 5	150	100 ± 12	150	103 ± 16	
200			150	106 ± 13	150	112 ± 15	150	107 ± 17	150	113 ± 12	
500			150	97 ± 7	150	101 ± 6	150	89 ± 10	150	96 ± 6	
Mosto		5	50	-	50	-	50	-	50	-	
		10	50	-	50	-	50	99 ± 6	50	-	
		50	150	-	150	-	50	93 ± 10	150	-	
		100	150	-	150	-	50	91 ± 12	150	-	
		200	150	75 ± 9	150	-	150	101 ± 11	150	-	
		500	150	-	150	72 ± 16	150	86 ± 10	150	-	
Vino		5	50	104 ± 13	25	-	50	-	25	-	
		10	50	-	25	-	50	101 ± 4	25	-	
		50	50	84 ± 19	25	91 ± 17	50	100 ± 12	25	80 ± 5	
		100	50	91 ± 21	25	91 ± 19	50	110 ± 12	25	112 ± 12	
		200	50	94 ± 17	150	85 ± 9	150	99 ± 13	150	95 ± 20	
		500	50	-	150	89 ± 14	150	103 ± 17	150	102 ± 8	

<sup>a</sup> Los valores corresponden a la media de cinco réplicas independientes. <sup>b</sup> Concentración fortificada de penthiopyrad expresada en ng/mL. <sup>c</sup> Factor de dilución de la muestra. <sup>d</sup> Coeficiente de recuperación y desviación estándar. <sup>e</sup> Valor fuera del intervalo de recuperación 70–130%.

Las recuperaciones obtenidas para extractos de uva, mostos y vinos fortificados con penthiopyrad se muestran en la Tabla 3.30. Para el ensayo directo (PPm#410/HRP-PPm), las recuperaciones en extractos de uva dopados a concentraciones desde 50 hasta 500 ng/mL fueron por lo general excelentes (recuperaciones entre 80% y 120% y coeficientes de variación inferiores al 20%), si bien fue necesario en muchos casos emplear la mayor dilución para corregir los efectos matriz. Con mostos de las variedades garnacha y tempranillo se alcanzaron límites de cuantificación de penthiopyrad de 5 ng/mL, mientras que en los casos del mosto blanco de variedad macabeo y del mosto tinto de uva bobal el dicho límite fue 50 ng/mL. Finalmente, el inmunoensayo dio muy buenos resultados con prácticamente todas las muestras fortificadas de vino, alcanzando nuevamente excelentes límites de cuantificación de 5 ng/mL con las variedades bobal y garnacha y de 10 ng/mL con los vinos de tipos macabeo y tempranillo. Mientras que para el análisis de mostos una dilución de muestra 1/25 fue generalmente suficiente, en el caso de los vinos lo habitual fue diluir al menos 50 veces.

Las recuperaciones obtenidas en el análisis de extractos de uva empleando el ensayo indirecto de penthiopyrad (PPm#410/OVA-PPd') resultaron ser también excelentes, tanto en lo que se refiere a exactitud como a precisión. La concentración de analito pudo ser correctamente determinada en todos los extractos a 5 ng/mL, excepto en los de uva blanca macabeo, para los que el límite de cuantificación fue de 10 ng/mL. Teniendo en cuenta que la Comisión Europea todavía no ha fijado un LMR en uva para penthiopyrad, aplicándose por ello el valor genérico de 10 ng/g,<sup>54</sup> este ensayo podría emplearse para la cuantificación del fungicida incluso por debajo del reducido límite legal establecido. En contraposición, y tal como era de esperar a la vista de los resultados del estudio de efectos matriz, el ensayo no proporcionó buenos resultados con ninguna de las muestras de mostos tintos, si bien penthiopyrad se pudo cuantificar de manera exacta y precisa en el mosto blanco de la variedad macabeo, con un límite de cuantificación de 10 ng/mL. Para el análisis de vinos, el ensayo arrojó buenos resultados generalmente con fortificaciones superiores a 50 ng/mL, siendo posible obtener recuperaciones aceptables incluso analizando las muestras diluidas 50 veces y por tanto sin corregir completamente algunos efectos matriz.

En resumen, se puede afirmar que los inmunoensayos desarrollados fueron capaces de cuantificar concentraciones extremadamente bajas de los dos analitos de estudio (en su mayoría de 5 o 10 ng/mL) en un conjunto diverso de muestras, siendo

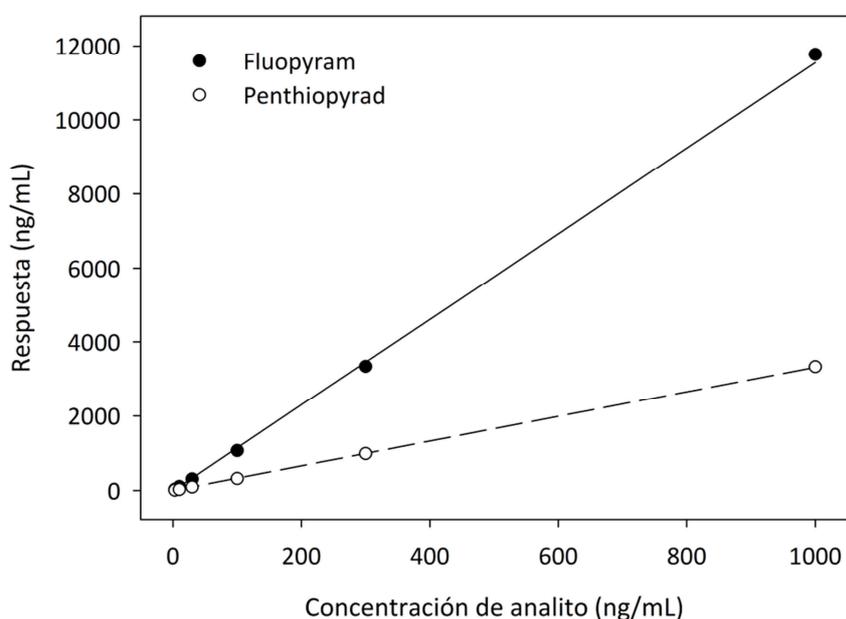
cada uno de ellos más o menos adecuado para cada tipo de matriz. Así, los dos inmunoensayos desarrollados para fluopyram tuvieron una capacidad similar para analizar vinos y extractos de ciruela y de uva, mientras que las muestras de mostos deberían poderse analizar correctamente con el ensayo directo (FPb#12/HRP–FPb). Por otra parte, el ensayo indirecto propuesto para penthiopyrad (PPm#410/OVA–PPd') proporcionó muy buenos resultados con los extractos de ambas frutas, al igual que lo hizo en menor medida el ensayo directo (PPm#410/HRP–PPm), con el que además las muestras de mosto y vino fueron aparentemente mejor analizadas. Teniendo en cuenta la dependencia de los parámetros analíticos de este ensayo con el pH (Figura 3.25, sección 3.7.2), una causa probable para las interferencias observadas en la cuantificación de penthiopyrad en mostos y vinos con el ensayo indirecto podría ser la naturaleza moderadamente ácida de este tipo de muestras, y en el caso de los mostos, también podrían deberse a su elevado contenido en azúcares (ver Tabla 3.27, sección 3.8.1). En cualquier caso, los resultados prueban la validez de los inmunoensayos propuestos, capaces además de medir concentraciones de analito muy inferiores a los LMR y en muchos casos sin necesidad de corregir completamente los efectos matriz.

#### **3.8.4. Validación frente a un método analítico de referencia**

Tras verificar la exactitud y precisión de los inmunoensayos desarrollados utilizando muestras dopadas, se llevó a cabo su validación estadística frente a un método analítico de referencia. Dicho método se basa en cromatografía líquida de eficacia ultraelevada con detección por espectrometría de masas en tándem (UPLC–MS/MS), y emplea condiciones previamente optimizadas en nuestro grupo para un grupo de analitos entre los que se incluían fluopyram y penthiopyrad.<sup>77</sup> Dadas las características de la técnica de referencia escogida, se emplearon las muestras de cultivos de ciruela y uva tratadas en campo con los fungicidas de estudio, concretamente los correspondientes extractos de frutas obtenidos mediante el procedimiento QuEChERS (sección 3.8.1).

En primer lugar, se llevó a cabo el análisis de los extractos de muestras de campo mediante el método de referencia. Con el objetivo de corregir la posible variabilidad entre muestras debida a diferencias en la extracción y/o en la propia inyección en el cromatógrafo, a todas ellas se añadió una cantidad fija de un patrón interno (fosfato de trifenilo, TPP), y se utilizó como respuesta el cociente entre el área cromatográfica del pico del analito y la del patrón interno multiplicada por la concentración de éste.

Además de las muestras, se preparó un calibrado multicomponente de seis patrones de ambos analitos (3, 10, 30, 100, 300 y 1000 ng/mL) y un blanco, todos ellos con la misma cantidad de patrón interno que las muestras (500 ng/mL). Por otra parte, con el fin de hallar la ecuación de la recta de calibrado mediante regresión lineal, se aplicó un factor de ponderación de tipo  $1/x$  para dar un menor peso a los puntos de mayor concentración, ya que su varianza suele ser mayor. De este modo, las rectas de calibrado finalmente empleadas para la cuantificación mediante UPLC–MS/MS se muestran en la Figura 3.32.



**Figura 3.32.** Rectas de calibrado obtenidas mediante el método de referencia(UPLC–MS/MS) para la cuantificación de fluopyram y penthiopyrad en los extractos obtenidos con el procedimiento QuEChERS a partir de las muestras de campo de ciruela y uva.

Paralelamente, los mismos extractos fueron analizados mediante los inmunoensayos desarrollados para fluopyram y penthiopyrad. Dado que las concentraciones de analito no eran conocidas, se analizaron diversas diluciones de cada muestra (1/25, 1/50, 1/150, 1/250, 1/500 y 1/1000) con el objetivo de entrar en los intervalos de medida, y se seleccionó la más adecuada en cada caso. Las concentraciones de fluopyram y penthiopyrad halladas mediante los inmunoensayos desarrollados y el método de referencia se recogen en el Anexo III de esta memoria, y se representan gráficamente en la Figura 3.33 (muestras que contienen fluopyram) y en la Figura 3.34 (muestras que contienen penthiopyrad). Completada la etapa de

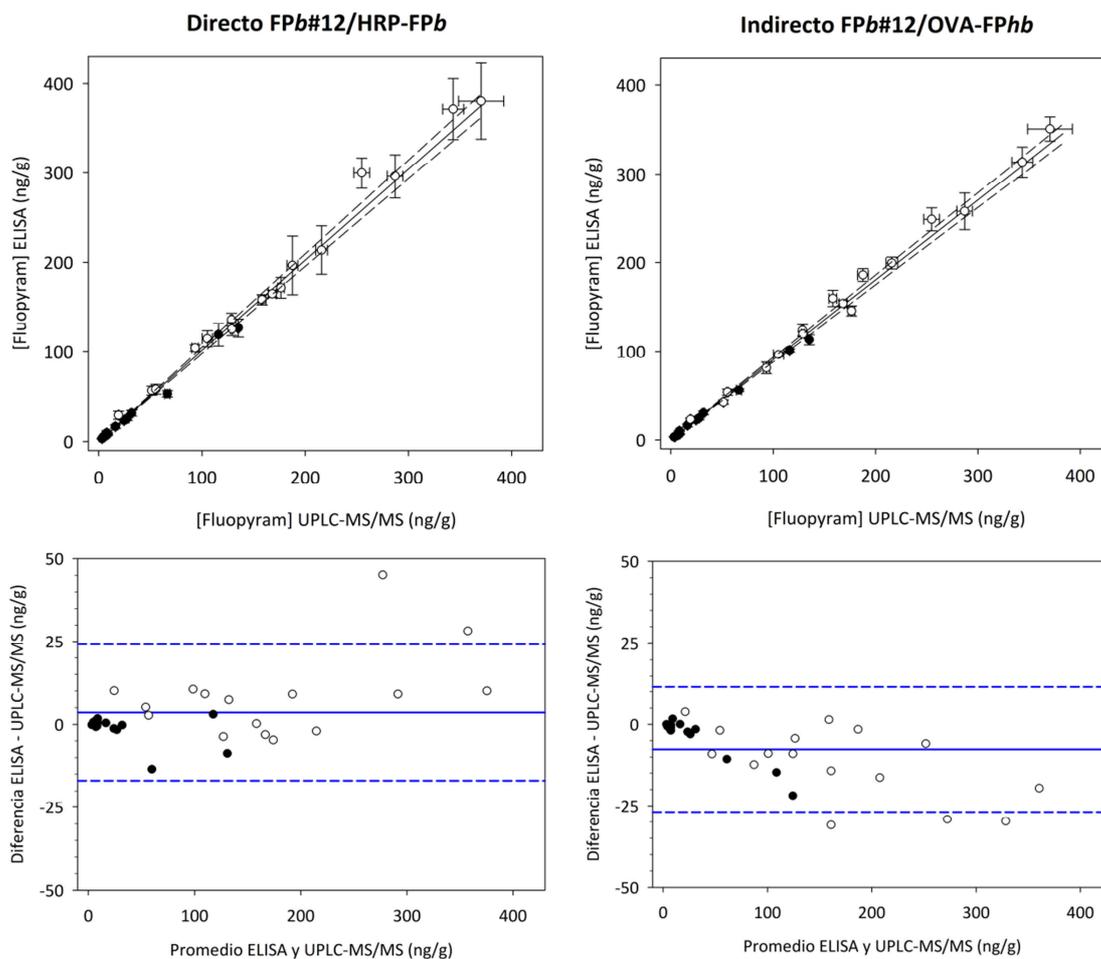
análisis, se compararon estadísticamente los resultados obtenidos con cada uno de los inmunoensayos con los hallados mediante el método de referencia.

La comparación estadística de dos métodos analíticos puede llevarse a cabo de diferentes formas. Una de ellas consiste en calcular el promedio de la diferencia en valor absoluto entre la concentración hallada por el método a validar y la obtenida con el método de referencia, y comprobar posteriormente mediante un ensayo de hipótesis si el promedio obtenido es estadísticamente igual a cero, en cuyo caso los métodos son comparables. También es posible la comparación mediante gráficos de dispersión como los de tipo Bland–Altman,<sup>232</sup> en los que se representa la diferencia de las concentraciones obtenidas con ambos métodos frente a su media aritmética, y se considera que los métodos son comparables si los puntos se distribuyen aleatoriamente por encima y por debajo de la diferencia promedio, que debe ser próxima a cero.

Uno de los métodos más empleados para la comparación de dos métodos analíticos es el test de la regresión lineal. Para ello, los puntos obtenidos por representación gráfica de los valores obtenidos con el método ensayado frente a los determinados con el método de referencia se ajustan a la ecuación de una recta y se calculan los intervalos de confianza de la pendiente y la ordenada. Si los métodos fuesen equivalentes se obtendría una recta cuya pendiente sería la unidad y cuya ordenada en el origen sería cero, por lo que si dichos valores están contenidos en los intervalos de confianza calculados, los métodos se consideran comparables. Aunque lo más sencillo y habitual es realizar el ajuste matemático mediante mínimos cuadrados simples, este procedimiento no contempla las posibles desviaciones del método de referencia (eje de abscisas). Teniendo en cuenta que el método de referencia no es perfecto, para un cálculo más realista de la ecuación de la recta es más conveniente emplear regresión Deming, que tiene en cuenta las desviaciones de los dos métodos a comparar. Por ello, este último procedimiento fue el escogido para llevar a cabo la validación de los inmunoensayos propuestos para fluopyram y penthiopyrad frente al método UPLC–MS/MS de referencia. Adicionalmente, se complementaron los resultados con los correspondientes gráficos de dispersión Bland–Altman.

La Figura 3.33 muestra gráficamente las concentraciones de fluopyram halladas en las muestras mediante UPLC–MS/MS y los dos inmunoensayos propuestos, así como las rectas de regresión Deming obtenidas en cada caso, cuyos parámetros y sus intervalos al 95% de confianza se recogen en la Tabla 3.31. Las concentraciones de

fluopyram halladas en ciruela fueron generalmente más bajas que las encontradas en uva, lo que es coherente con la mayor relación superficie/volumen de este último tipo de muestras. Para muestras de concentración superior a 200 ng/mL, el ensayo directo (FPb#12/HRP-FPb) mostró una cierta imprecisión, cosa que no sucedió con el ensayo indirecto (FPb#12/OVA-FPhb).



**Figura 3.33.** Arriba: Rectas de regresión Deming (líneas continuas) obtenidas en la comparación de los resultados del análisis de muestras de campo de uva (○) y de ciruela (●) que contienen fluopyram mediante los inmunoensayos propuestos para este analito y el método cromatográfico de referencia (en línea discontinua se muestran los límites del intervalo al 95% de confianza para la recta de regresión). Abajo: Gráficos de dispersión Bland–Altman obtenidos a partir de los mismos resultados (la línea continua corresponde a la diferencia promedio, y las líneas discontinuas son los límites del intervalo  $\pm 1.96 \times$  desviación estándar). Los valores obtenidos mediante ELISA corresponden a la media de cinco determinaciones independientes, mientras que los hallados mediante el método de referencia son la media de dos réplicas.

**Tabla 3.31.** Parámetros de las rectas obtenidas por regresión Deming en la validación de los inmunoensayos desarrollados para fluopyram con extractos de ciruela y de uva.<sup>a</sup>

Inmunoensayo	R <sup>2</sup>	Pendiente		Ordenada <sup>b</sup>	
		Media	Int. Conf. 95% <sup>c</sup>	Media	Int. Conf. 95%
Directo	0.993	1.014	(0.978, 1.050)	-0.142	(-0.633, 0.349)
Indirecto	0.996	0.902	(0.873, 0.930)	0.227	(-0.275, 0.730)

<sup>a</sup> Se incluyen los coeficientes de determinación (R<sup>2</sup>). <sup>b</sup> Valores expresados en ng/g.

<sup>c</sup> Intervalo de confianza para la media poblacional del parámetro con una probabilidad del 95%.

En general se observó una buena concordancia de los resultados obtenidos con ambos inmunoensayos respecto a los hallados mediante el método de referencia. De hecho, los parámetros de las rectas de regresión demuestran la validez de los dos ensayos propuestos, con valores muy próximos a los esperados y coeficientes de determinación muy cercanos a la unidad. Así, se puede afirmar que el ensayo directo cumple los criterios de validez con un 95% de probabilidad, ya que los intervalos de confianza de la pendiente y la ordenada en el origen contienen respectivamente los valores 1 y 0. Por su parte, el ensayo indirecto cumple dicho criterio para la ordenada pero no para la pendiente, cuyo valor medio de 0.902 refleja una leve desviación proporcional entre ambas medidas. Las representaciones Bland–Altman son consistentes con los resultados anteriores, ya que en ambos ensayos se puede observar una distribución aleatoria de los datos y diferencias en promedio cercanas a cero, especialmente en el caso del ensayo directo.

**Tabla 3.32.** Parámetros de las rectas obtenidas por regresión Deming en la validación de los inmunoensayos desarrollados para penthiopyrad con extractos de ciruela y de uva.<sup>a</sup>

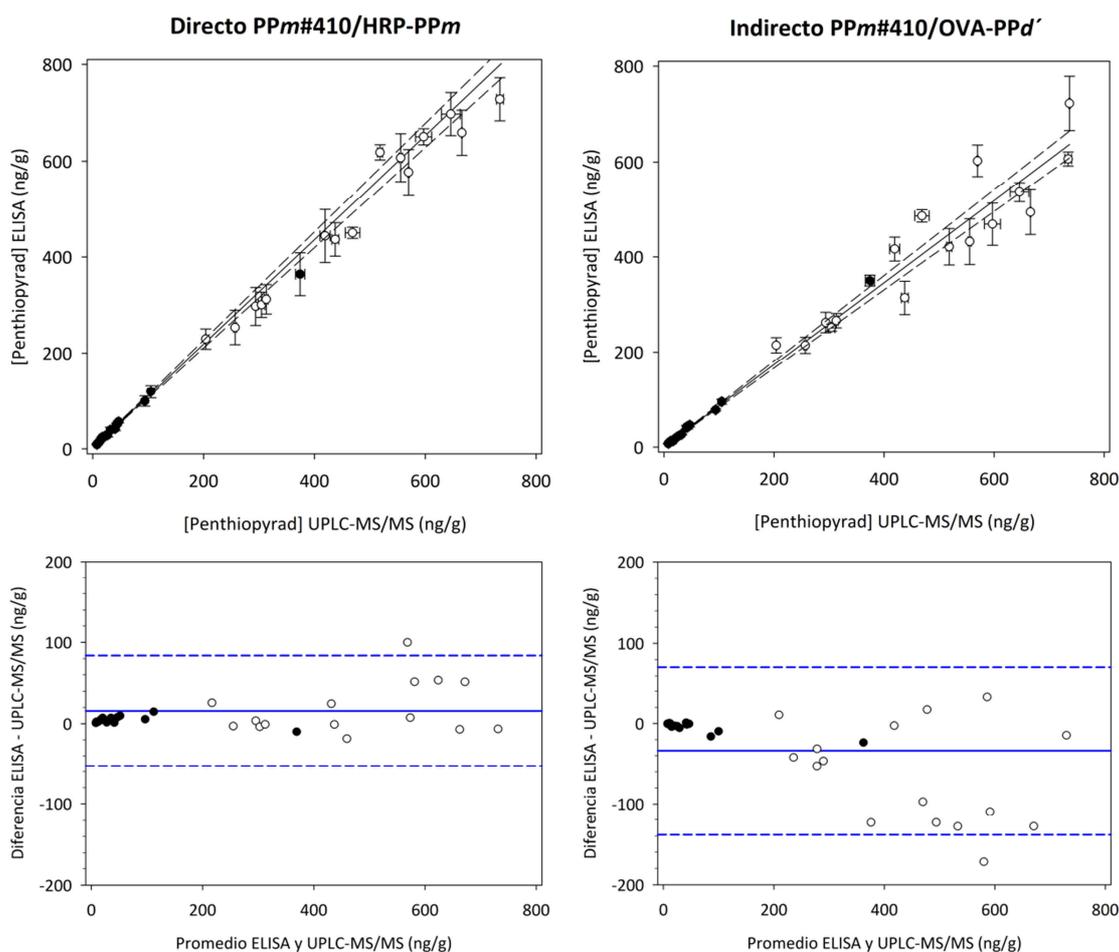
Inmunoensayo	R <sup>2</sup>	Pendiente		Ordenada <sup>b</sup>	
		Media	Int. Conf. 95% <sup>c</sup>	Media	Int. Conf. 95%
Directo	0.987	1.085	(1.043, 1.128)	2.040	(0.820, 3.261)
Indirecto	0.969	0.863	(0.825, 0.902)	0.570	(-0.123, 1.263)

<sup>a</sup> Se incluyen los coeficientes de determinación (R<sup>2</sup>). <sup>b</sup> Valores expresados en ng/g. <sup>c</sup>

Intervalo de confianza para la media poblacional del parámetro con una probabilidad del 95%.

Los resultados de validación de los inmunoensayos para el fungicida penthiopyrad se muestran en la Tabla 3.32 y en la Figura 3.34. De forma similar a lo observado con fluopyram, la concentración hallada en muestras de uva resultó ser superior a la de las

muestras de ciruela, lo que vuelve a poner de manifiesto la influencia del tamaño del fruto en la cantidad residual de plaguicidas. Destaca que las muestras a las que se aplicó penthiopyrad presentaron concentraciones en general superiores a las tratadas con fluopyram, lo que puede deberse muy probablemente al hecho de que la dosis recomendada del primero es casi 4 veces superior a la del segundo (ver Tabla 5.3, sección 5.11.1.1).



**Figura 3.34.** Arriba: Rectas de regresión Deming (líneas continuas) obtenidas en la comparación de los resultados del análisis de muestras de campo de uva (○) y de ciruela (●) que contienen penthiopyrad, en forma de sus respectivos extractos, mediante los inmunoensayos propuestos para este analito y el método cromatográfico de referencia (en línea discontinua se muestran los límites del intervalo al 95% de confianza para la recta de regresión). Abajo: Gráficos de dispersión Bland–Altman obtenidos a partir de los mismos resultados (la línea continua corresponde a la diferencia promedio, y las líneas discontinuas son los límites del intervalo  $\pm 1.96 \times$  desviación estándar). Los valores obtenidos mediante ELISA corresponden a la media de cinco determinaciones independientes, mientras que los hallados mediante el método de referencia son la media de dos réplicas.

Aunque la correlación entre los resultados de UPLC–MS/MS y los del ensayo directo de penthiopyrad (PPm#410/HRP–PPm) fue satisfactoria, con un coeficiente de determinación de 0.987 para la regresión Deming, se observó una ligera tendencia a sobreestimar la concentración de penthiopyrad reflejada en valores de 1.085 y 2.040 para la pendiente y la ordenada de la recta calculada, respectivamente. No obstante, el gráfico Bland–Altman para este ensayo indica una comparabilidad aceptable entre el inmunoensayo y el método de referencia, distribuyéndose los datos aleatoriamente por encima y por debajo de la diferencia promedio entre métodos en un intervalo no excesivamente amplio y con un solo valor fuera de éste. Por ello, aunque parezca existir una cierta desviación, en la práctica este ensayo podría utilizarse para determinar la concentración de penthiopyrad tras la aplicación de un factor de corrección.

A diferencia del inmunoensayo en formato directo propuesto para penthiopyrad, el ensayo indirecto (PPm#410/OVA–PPd') mostró una considerable variabilidad en los resultados, con un coeficiente de determinación de 0.969. En este caso, la ordenada en el origen hallada mediante regresión Deming cumplió sin problemas el criterio estadístico, mientras que la pendiente resultó tener un valor de 0.863, algo alejado del valor esperado de 1. Es decir, este método parece subestimar la concentración de penthiopyrad, obteniéndose un 14% menos aproximadamente respecto al valor real. En consonancia, el gráfico Bland–Altman refleja una dispersión creciente con la concentración y una diferencia promedio considerablemente inferior a cero. Estos resultados contrastan con lo observado en el análisis de muestras fortificadas, con las que se obtuvieron recuperaciones excelentes con los cinco tipos de extractos analizados en la mayor parte del intervalo de fortificación.

En resumen, el análisis de las muestras de campo de ciruela y uva que contienen fluopyram y penthiopyrad mediante los inmunoensayos propuestos y su comparación con un método de referencia basado en UPLC–MS/MS permitió estimar la validez de dichos inmunoensayos. Así, fluopyram podría ser cuantificado en muestras de ciruela y uva con cualquiera de los dos inmunoensayos propuestos, especialmente con el ensayo directo, mientras que la determinación de la concentración de penthiopyrad sería posible con el ensayo directo.

### 3.8.5. Estudio de transferencia de fungicidas de la uva al vino

Con el objetivo de demostrar la utilidad práctica de los inmunoensayos propuestos, se planteó llevar a cabo un pequeño estudio para determinar la capacidad de los fungicidas fluopyram y penthiopyrad de permanecer presentes en alimentos procesados procedentes de muestras contaminadas. En concreto, y dado el gran número de precedentes descritos en la bibliografía para otros plaguicidas,<sup>233-235</sup> se deseaba evaluar el porcentaje de fluopyram y penthiopyrad transferidos a vinos obtenidos a partir de las muestras de campo de uva empleadas en los estudios de validación, así como comprobar si la tasa de transferencia era dependiente o no de la variedad de uva.

Para llevar a cabo el estudio deseado, en primer lugar se obtuvieron los mostos de las muestras de campo de uva, los cuales fueron convenientemente vinificados tal y como se ha descrito en la sección 3.8.1 para dar lugar a un total de 16 vinos para cada analito, tres cuartas partes de variedades tintas (bobal, garnacha y tempranillo) y el resto de una variedad blanca (macabeo). Para la cuantificación de los analitos se procedió como con los extractos de fruta, es decir, se analizaron mediante los inmunoensayos desarrollados diversas diluciones de cada muestra de vino (1/150, 1/250, 1/500 y 1/1000) para entrar en los intervalos de medida, y se seleccionó el resultado más adecuado en cada caso. Las concentraciones así halladas se incluyen en el Anexo III, y a partir de ellas se obtuvieron los porcentajes medios de los fungicidas de estudio transferidos al vino, clasificados según la variedad de uva de partida. Dichos resultados se recogen en la Tabla 3.33.

**Tabla 3.33.** Tasas promedio de transferencia de fluopyram y penthiopyrad desde las muestras de campo de uva de cuatro variedades hasta sus correspondientes vinos.

Analito	Inmunoensayo	Tasa de transferencia (%) <sup>a</sup>			
		Bobal	Garnacha	Macabeo	Tempranillo
Fluopyram	Directo	103 ± 13	104 ± 15	111 ± 13	103 ± 20
	Indirecto	88 ± 11	84 ± 13	105 ± 19	99 ± 17
Penthiopyrad	Directo	55 ± 5	55 ± 11	60 ± 13	62 ± 4
	Indirecto	45 ± 6	43 ± 11	54 ± 13	55 ± 5

<sup>a</sup> Los valores se expresan como media y desviación estándar de cuatro muestras, cada una de las cuales se cuantificó mediante cinco réplicas independientes (n = 20).

Según los resultados hallados con el ensayo directo de fluopyram, las concentraciones de analito halladas en los vinos analizados oscilaron entre 25 y 450

ng/g, la mayor parte de ellos en el intervalo  $175 \pm 75$  ng/g. En cuanto a los vinos contaminados con penthiopyrad, empleando el correspondiente ensayo directo se determinaron concentraciones de analito situadas en su mayoría en el rango de 200 a 400 ng/g, observándose en algunas muestras contenidos superiores de hasta 650 ng/g e inferiores de hasta aproximadamente 100 ng/g. Por ello, el primer resultado destacable es que en todos los vinos se detectaron residuos del correspondiente fungicida de tratamiento, lo que indica que ambos analitos son capaces de superar la etapa de fermentación sin disiparse o degradarse completamente.

Por otra parte, en el caso de fluopyram, los porcentajes de transferencia rondaron el 100% en las cuatro variedades según el ensayo directo, mientras que según el ensayo indirecto habría una ligera disminución de la concentración en vinos de las variedades bobal y garnacha. En cambio, las tasas de transferencia de penthiopyrad al vino fueron mucho menores que las de fluopyram, independientemente de la variedad de uva, y estuvieron en torno al 60% según los resultados obtenidos mediante el ensayo directo y alrededor del 50% según el ensayo indirecto. Estos resultados sugieren que fluopyram permanece prácticamente inalterado a lo largo del proceso de vinificación, mientras que aproximadamente la mitad de la concentración de penthiopyrad se pierde durante el procedimiento. Teniendo en cuenta las operaciones realizadas para la obtención de las muestras de vino, dichas pérdidas podrían deberse a la retención del analito tras el triturado de la uva en la fase sólida conformada por piel, pulpa y pepita, a una degradación parcial por parte de la levadura, o a una combinación de ambas. Además, en el caso de las variedades tintas la fermentación se produce con maceración, es decir, añadiendo al mosto parte de dicha fase sólida, lo que podría suponer un foco adicional de disipación. No obstante, esta última posibilidad es poco probable, ya que los porcentajes de transferencia no parecen depender de la variedad.

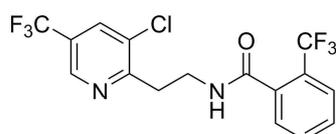
En resumen, los inmunoensayos desarrollados han servido para efectuar un breve estudio sobre la transferencia de fluopyram y penthiopyrad desde la uva al vino. Dicho estudio ha permitido concluir que ambos analitos son capaces de llegar inalterados al vino en cantidades importantes, quedando prácticamente el 100% de fluopyram y aproximadamente la mitad de penthiopyrad. En cualquier caso, el estudio ha puesto también de manifiesto la aplicabilidad de los inmunoensayos desarrollados a situaciones reales y por tanto su potencial interés fuera del ámbito puramente científico.



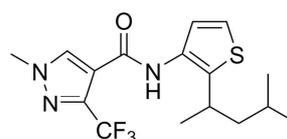
## 4. CONCLUSIONES

Los resultados expuestos en el bloque anterior ponen de manifiesto que el principal objetivo de esta Tesis Doctoral se ha cumplido, ya que se han desarrollado inmunoensayos de tipo ELISA competitivo para el análisis de fluopyram y penthiopyrad en muestras de origen vegetal con elevada sensibilidad y selectividad, y en algunos casos con exactitud y precisión comparables a la de los bien establecidos métodos cromatográficos. Las conclusiones particulares que pueden extraerse de todo el trabajo realizado son las siguientes:

- ❖ Se han sintetizado un total de cuatro haptenos funcionalizados para fluopyram (FPa, FPb, FPha' y FPhb) y cinco para penthiopyrad (PPa, PPb, PPM, PPD' y PPO), preservando lo máximo posible las características estructurales y estereoelectrónicas originales de los analitos. El brazo espaciador carboxilado, que permite la unión covalente a las proteínas transportadoras, se ha incorporado en dichos haptenos por posiciones complementarias del esqueleto de cada analito, posibilitando de este modo diferentes modos de exposición del mismo durante la respuesta inmunitaria.

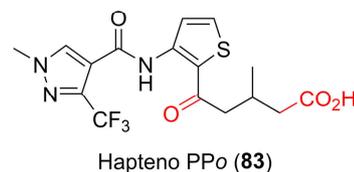
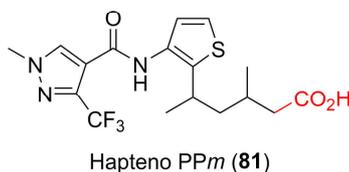
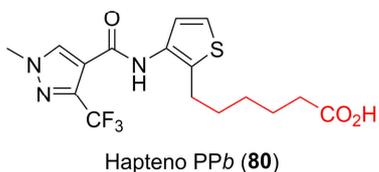
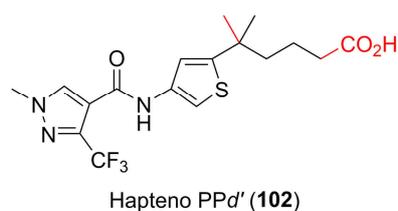
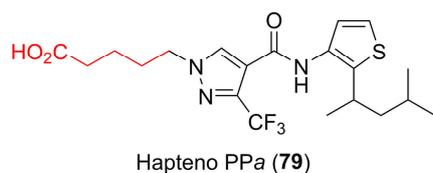
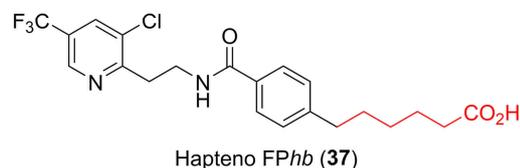
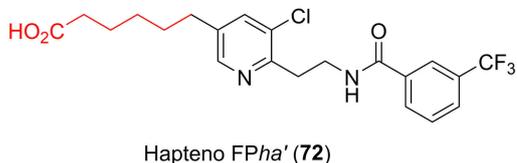
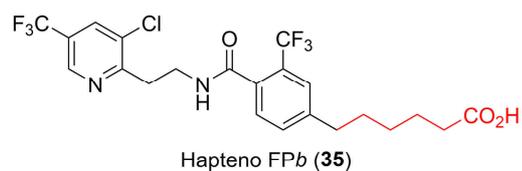
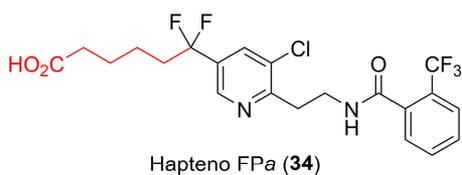


Fluopyram (1)



Penthiopyrad (16)

## Conclusiones



- ❖ Se ha generado una colección de anticuerpos policlonales de conejo y otra de anticuerpos monoclonales de ratón. La gran mayoría han presentado una muy elevada afinidad y especificidad hacia fluopyram y penthiopyrad, habiendo sido posible llevar a cabo inmunoensayos con capacidad para detectar concentraciones de hasta 24 pg/g de fluopyram y 33 pg/g de penthiopyrad.
- ❖ En el caso de fluopyram se ha observado una capacidad similar de los dos inmunógenos empleados para generar anticuerpos de elevada afinidad, aun teniendo cada uno de los correspondientes haptenos el brazo espaciador en un anillo distinto del analito. En cuanto a penthiopyrad, el mejor inmunógeno ha resultado ser el basado en el hapteno PPM, que presenta una gran similitud con el analito al aprovechar su fragmento alifático ramificado característico como brazo espaciador.
- ❖ El ligero reconocimiento del fungicida fluopicolide por parte de los anticuerpos derivados del hapteno FPa, pero no por parte de los derivados del hapteno FPb, junto con la similar idoneidad observada de ambos haptenos en la generación de anticuerpos, ha sugerido la posibilidad de que durante la inmunización ambos

adquieran una conformación plegada similar a la del fungicida, exponiendo así los mismos elementos al sistema inmunitario.

- ❖ Los anticuerpos generados fueron capaces de reconocer conjugados heterólogos. En el caso de los anticuerpos para fluopyram, las variaciones estereoelectrónicas asociadas al cambio de posición o a la eliminación de grupos fluorados en los haptenos *FPha'* y *FPhb* fueron muy influyentes en el grado de reconocimiento molecular, tanto de anticuerpos policlonales como monoclonales. Para los anticuerpos de penthiopyrad, las alteraciones estéricas y/o electrónicas inducidas por el brazo espaciador tuvieron una mayor influencia en el reconocimiento de haptenos heterólogos que la introducción del brazo espaciador en una posición opuesta respecto a la homóloga.
- ❖ Usando constructos basados en nanotubos de carbono se ha comprobado que es posible desencadenar el proceso de maduración de la respuesta inmunitaria (respuesta inmunitaria secundaria) hacia el hapteno *PPm* sin mediación proteica, siempre y cuando en la respuesta primaria sí exista participación de proteína transportadora y se incluya adyuvante de Freund en todo el proceso. En segundo lugar, los nanotubos de carbono presentan carácter autoadyuvante únicamente cuando se inoculan con proteína transportadora.
- ❖ Se han desarrollado cuatro inmunoensayos de tipo ELISA competitivo, dos por cada analito estudiado. Los ensayos han sido optimizados y caracterizados, y de este modo ha sido posible cuantificar concentraciones de fluopyram y penthiopyrad de hasta 5 ng/mL en las muestras de fruta, mientras que en mostos y vinos se han logrado límites de cuantificación de hasta 10 ng/mL. Estos excelentes límites analíticos han resultado ser muy inferiores a los LMR establecidos para dichas frutas en la Unión Europea.
- ❖ Por último, se ha llevado a cabo un estudio de transferencia de los fungicidas fluopyram y penthiopyrad de la uva al vino empleando los inmunoensayos desarrollados. Los resultados del estudio sugieren que fluopyram se transfiere completamente al vino, mientras que en el caso de penthiopyrad la tasa de transferencia rondaría el 50%. Este estudio ha servido para demostrar la aplicabilidad real de los inmunoensayos propuestos a una situación para la que los métodos inmunoquímicos constituyen una alternativa a los métodos tradicionales.



## 5. SECCIÓN EXPERIMENTAL

### 5.1. Reactivos, instrumentos y técnicas generales

#### 5.1.1. Síntesis de haptenos

Los disolventes orgánicos se secaron y destilaron antes de su uso empleando técnicas estándar.<sup>190</sup> El CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> y el CH<sub>3</sub>CN se destilaron sobre CaH<sub>2</sub> bajo atmósfera inerte justo antes de ser usados. Del mismo modo, el éter etílico, el THF y el tolueno fueron destilados sobre Na y benzofenona. La DMF fue destilada sobre CaH<sub>2</sub> a presión reducida (7 mmHg) y se almacenó a 4 °C. El metanol (MeOH) se secó y almacenó sobre tamiz molecular de 3 Å. El resto de disolventes se emplearon sin purificación previa. Los disolventes deuterados para los experimentos de resonancia magnética nuclear fueron suministrados por Sigma-Aldrich (Madrid).

Los reactivos comerciales se utilizaron en su mayoría sin ningún tratamiento previo, mientras que los que lo requirieron fueron previamente purificados o activados.<sup>190</sup> La activación del Zn en polvo se efectuó por inmersión con agitación en HCl 1 M durante 1 min, seguida de filtración a vacío, lavado secuencial con HCl 1 M, etanol (EtOH) absoluto y éter etílico anhidro, y secado a vacío durante toda una noche. El isobuteno se obtuvo mediante destilación de una mezcla a reflujo de *terc*-butanol y ácido fosfórico concentrado, y se almacenó en forma líquida sobre MgSO<sub>4</sub> anhidro a -20 °C. La lipasa B de *Candida antarctica* expresada en *Aspergillus niger* e inmovilizada

en resina acrílica macroporosa (en adelante, lipasa inmovilizada) fue proporcionada por Sigma-Aldrich (L4777,  $\geq 5000$  unidades/g).

Las operaciones con reactivos sensibles al aire y/o a la humedad se realizaron bajo atmósfera inerte de  $N_2$  seco o de Ar, empleando para ello jeringas o cánulas, material de vidrio secado en estufa a  $130\text{ }^\circ\text{C}$  y disolventes recién destilados y secados según las técnicas anteriormente descritas.

Las reacciones de hidrogenación a presión de  $H_2$  superior a la atmosférica se llevaron a cabo en un reactor Tiny Clave de Büchi Labortechnik (Flawil, Suiza). Tras introducir la mezcla inicial de reacción y una barra agitadora magnética, se selló el reactor y se purgó 5 veces con una presión de  $H_2$  ligeramente superior a la deseada. Por último, se ajustó la presión de  $H_2$  al valor buscado, manteniéndose constante hasta la finalización de la reacción.

Las reacciones asistidas por microondas (MW) se efectuaron en un reactor Discover SP de CEM (Matthews, NC, EE. UU.) equipado con agitación magnética, sensor de infrarrojos para el control de la temperatura, sistema de control de presión Activent® y una opción de enfriamiento simultáneo con aire comprimido (PowerMax) para mantener constantes la temperatura y la presión durante las reacciones. Tras introducir la mezcla de reacción en un tubo de vidrio de borosilicato con tapón suministrado junto con el instrumento, se programó el reactor en las condiciones de potencia, temperatura, tiempo y presión (por defecto, 1 bar) especificadas.

El seguimiento de las reacciones se llevó a cabo mediante cromatografía en capa fina (CCF) sobre placas de gel de sílice Merck 60 F254 de 0.25 mm con indicador fluorescente. La visualización de las placas se realizó con luz ultravioleta (UV) de 254 nm y también mediante el uso de reveladores: molibdato cérico amónico acuoso, ácido fosfomolibdico etanólico y ninhidridina. En estos casos, se introdujo la placa en la disolución reveladora escogida y se calentó con un secador industrial hasta observarse coloración adecuada.

Exceptuando los casos en los que el producto crudo mostró una pureza suficientemente elevada (superior al 95% según RMN- $^1\text{H}$ ), los compuestos sintetizados se purificaron mediante cromatografía flash en columna sobre gel de sílice Merck 60 (230–400 *mesh*). En cada caso se empleó como eluyente la mezcla de disolventes especificada. La composición de las fracciones cromatográficas se determinó mediante CCF siguiendo la metodología descrita en el párrafo anterior. Una vez obtenido el

producto puro, se calculó el rendimiento porcentual de la reacción como el cociente entre la cantidad obtenida y la cantidad máxima esperada de producto de acuerdo a la estequiometría de la reacción.

Los puntos de fusión (Pf) de los productos sólidos se determinaron en tubos capilares empleando un aparato de punto de fusión M-560 de Büchi y se proporcionan sin corrección.

Los espectros de infrarrojo (IR) se midieron sin preparación previa empleando la técnica de reflectancia total atenuada (ATR) en un espectrómetro FTIR Thermo Scientific Nicolet i510, o bien en forma de pastilla de KBr en un espectrómetro Nicolet Avatar 320 FT-IR, ambos de ThermoFisher Scientific (Waltham, MA, EE. UU.). La posición de las señales se expresa como número de ondas ( $\text{cm}^{-1}$ ) y su intensidad como fuerte (f), media (m) o débil (d).

Los espectros de resonancia magnética nuclear (RMN) fueron registrados a 25 °C en un espectrómetro Avance DRX-300MHz de Bruker (Billerica, MA, EE. UU.), empleando en cada caso el disolvente deuterado indicado. Los espectros de RMN- $^1\text{H}$  se registraron a 300 MHz, los de RMN- $^{13}\text{C}$  a 75 MHz con desacoplamiento de protón, y los de RMN- $^{19}\text{F}$  a 282 MHz con desacoplamiento de protón a alta potencia. Los desplazamientos químicos ( $\delta$ ) de RMN- $^1\text{H}$  y RMN- $^{13}\text{C}$  se expresan en partes por millón (ppm) relativas a tetrametilsilano (TMS), utilizando como referencia interna la señal residual del disolvente (RMN- $^1\text{H}$ : 7.26 ppm para  $\text{CDCl}_3$ , 3.31 ppm para  $\text{CD}_3\text{OD}$  y 2.50 ppm para  $\text{DMSO}-d_6$ ; RMN- $^{13}\text{C}$ : 77.16 ppm para  $\text{CDCl}_3$ , 49.00 ppm para  $\text{CD}_3\text{OD}$  y 39.52 ppm para  $\text{DMSO}-d_6$ ). Los desplazamientos químicos de RMN- $^{19}\text{F}$  se expresan en ppm relativas a  $\text{CFCl}_3$ , cuya señal se utilizó como referencia interna (0.00 ppm). El grado de sustitución de los átomos de carbono se determinó mediante secuencias de pulsos 135° DEPT. La asignación completa de las señales de RMN- $^1\text{H}$  y RMN- $^{13}\text{C}$  se realizó con ayuda de experimentos COSY y HSQC. En los casos en que se obtuvo una mezcla no resuelta de diastereoisómeros o un compuesto con formas tautoméricas, sólo se indican las señales del componente mayoritario de la mezcla.

Los espectros de masas de alta resolución (EMAR) se obtuvieron mediante electrospray (ES) empleando un espectrómetro de masas Q-TOF premier equipado con una fuente de electrospray, y en algunos casos mediante impacto electrónico a 70 eV (IE) en un espectrómetro de masas de tiempo de vuelo de aceleración ortogonal

Micromass GCT Premier TM, ambos de Waters (Milford, MA, EE. UU.). Los datos obtenidos están expresados como relación masa/carga ( $m/z$ , Da).

Los espectros de absorción ultravioleta–visible (UV/vis) se registraron con un lector PowerWave HT de BioTek Instruments (Winooski, VT, EE. UU.) para microplacas de 96 o 384 pocillos. Los coeficientes de extinción molar ( $\epsilon$ ) se expresan en  $\text{mM}^{-1} \text{cm}^{-1}$  acompañados de la longitud de onda (nm) y el disolvente en el que se obtuvieron.

### 5.1.2. Modelización molecular

La búsqueda de conformeros de mínima energía de los analitos se efectuó en dos pasos. En primer lugar, empleando Mecánica Molecular (MM3) con el software *CAChe WorkSystem Pro* versión 7.5.0.85, de Fujitsu Ltd (Tokyo, Japón), se procedió a una búsqueda sistemática del conformero de menor energía, de manera que en cada enlace con capacidad de rotación libre se efectuaron iteraciones de  $24^\circ$  hasta dar con el ángulo diedro óptimo. En segundo lugar, la geometría se refinó con MOPAC empleando el método semiempírico PM3.

### 5.1.3. Preparación de conjugados proteína–hapteno

El carbonato de *N,N'*-disuccinimidilo (DSC), la ovoalbúmina (OVA, grado V, Mw 44.3 kDa) y la peroxidasa de rábano picante (HRP, tipo VI-A; actividad específica  $\approx 1000$  unidades/mg, Mw 44.0 kDa) fueron adquiridos en Sigma-Aldrich (Madrid). La seroalbúmina bovina (BSA, fracción V, Mw 66.0 kDa) se obtuvo de Roche Applied Science (Mannheim, Alemania).

La purificación de los conjugados proteína–hapteno se efectuó mediante cromatografía de filtración en gel (exclusión molecular) en un equipo ÄKTA Purifier con detector UV, empleando columnas Sephadex G-25 HiTrap Desalting de 5 mL cada una, todo adquirido de GE Healthcare (Uppsala, Suecia). Se emplearon tres columnas dispuestas en serie para los conjugados de BSA y OVA, y dos columnas para los conjugados de HRP. Los espectros de absorción UV/vis de los conjugados purificados se registraron con un lector PowerWave HT de BioTek Instruments (Winooski, VT, EE. UU.).

Los espectros de masas de los conjugados proteína–hapteno se obtuvieron en un equipo TOF/TOF™ 5800 de ABSciex (Framingham, MA, EE. UU.) mediante desorción-

ionización láser asistida por matriz con detector de tiempo de vuelo (MALDI-TOF). La matriz se obtuvo a partir de una disolución de ácido sinapínico (Bruker, Billerica, MA, EE. UU.) a 5 mg/mL y ácido 2,2,2-trifluoroacético (TFA) al 0.1% (v/v) en CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O 7:3 (v/v). La mezcla de calibración TOF/TOF™ fue proporcionada también por ABSciex. La diálisis de los conjugados se llevó a cabo en mini casetes de diálisis Slide-A-Lyzer® de 300 µL de capacidad equipadas con membranas permeables a moléculas de peso molecular inferior a 30 kDa, que fueron adquiridas de Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, EE. UU.).

#### **5.1.4. Producción de anticuerpos y cultivos celulares**

Los animales de laboratorio empleados para la producción de anticuerpos se obtuvieron de Granja San Bernardo (Navarra). Se adquirieron tanto hembras de conejo New Zealand [CrI:KBL(NWZ)] como hembras de ratón BALB/c (BALB/cAnNCrI), que se estabularon en la Sección de Producción Animal del Servicio Central de Apoyo a la Investigación Experimental (SCSIE) de la Universitat de València durante el período de inmunización. La manipulación de los animales se llevó a cabo cumpliendo con las leyes y directrices españolas (RD 1201/2005 y Ley 32/2007) y de acuerdo a la Directiva Europea 2010/63/EU sobre la protección de animales empleados para fines científicos. Todos los inyectables para las inmunizaciones se prepararon en material estéril estándar desechable (jeringas de plástico y agujas metálicas).

La línea celular de plasmacitoma de ratón P3-X63-Ag 8.653 se obtuvo de la Colección Europea de Cultivos Celulares (ECACC, Salisbury, Reino Unido). Los cultivos celulares se desarrollaron a 37 °C en un incubador ThermoElectron (Waltham, MA, EE. UU.), con un ambiente de un 90% de humedad y un 5% de CO<sub>2</sub>. Para manejar los cultivos se utilizó material estéril de plástico desechable suministrado por Corning (Corning, NY, EE. UU.). El conteo de células se realizó con hematocitómetros Neubauer. Las mallas estériles EASYstrainer™ de 70 µm de diámetro de poro para la filtración de medio de cultivo se obtuvieron de Greiner Bio-One (Kremsmünster, Austria). Los criotubos Nunc para la conservación en N<sub>2</sub> líquido de las líneas celulares fueron proporcionados por Sigma-Aldrich (Madrid).

Los adyuvantes completo e incompleto de Freund, el medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM, alto contenido en glucosa), el suero bovino fetal (SBF), la disolución de L-alanil-L-glutamina (L-Ala-L-Gln, 200 mM), la disolución de aminoácidos no

esenciales (NEAA, 100×), el tampón de lisis de eritrocitos Hybri-Max y el polietilenglicol (PEG 1500) se obtuvieron de Sigma-Aldrich (Madrid). La gentamicina (50 mg/mL), el suplemento HT (hipoxantina 5 mM y timidina 0.8 mM) y el suplemento HAT (HT con aminopterina 20  $\mu$ M) fueron proporcionados por Gibco BRL (Paisley, Reino Unido). El suplemento de fusión y clonaje para hibridomas (HFCS, 50×) se adquirió en Roche Applied Science (Mannheim, Alemania). El dimetilsulfóxido (DMSO) fue suministrado por Scharlau (Barcelona). Todos los medios y suplementos empleados en cultivos celulares se adquirieron estériles.

Los medios de cultivo preparados a partir las disoluciones de medios y suplementos comerciales se prepararon también estériles y fueron los siguientes:

- Medio incompleto: DMEM comercial suplementado con L-Ala-L-Gln 2 mM, NEAA y gentamicina a 25  $\mu$ g/mL.
- Medio completo: Medio incompleto con un 10% (v/v) de SBF.
- Medio post-fusión: Medio incompleto con un 15% (v/v) de SBF.
- Medio HT: Medio incompleto con hipoxantina 100  $\mu$ M, timidina 16  $\mu$ M y 20% (v/v) de SBF.
- Medio HT-HFCS: Medio HT con un 1% (v/v) de HFCS.
- Medio HAT: Medio HT-HFCS con aminopterina 0.4  $\mu$ M.
- Medio de congelación: SBF con un 10% (v/v) de DMSO como crioprotector.

La purificación de los anticuerpos monoclonales se efectuó mediante cromatografía de afinidad en un equipo ÄKTA Purifier con detector UV, empleando una columna HiTrap Protein G HP de 5 mL precedida de una columna Sephadex G-25 HiTrap Desalting de 5 mL, todos adquiridos de GE Healthcare (Uppsala, Suecia). La filtración por centrifugación de las disoluciones de anticuerpos monoclonales purificados se realizó en tubos Amicon® Ultra-4 de Merck-Millipore (Billerica, MA, EE. UU.) con membranas de celulosa regenerada permeables a moléculas de peso molecular inferior a 30 kDa.

La isotipación de las cadenas pesadas de los anticuerpos monoclonales se efectuó con el kit de isotipación Calbiochem® Hybridoma Subisotyping Kit, Mouse de Merck-Millipore (Cat. nº 386445). Para la isotipación de las cadenas ligeras se emplearon anticuerpos de conejo anti-inmunoglobulinas de ratón (RAM) de Rockland Immunochemicals Inc (Limerick, PA, EE. UU.).

### 5.1.5. Disoluciones y tampones

Todas las disoluciones acuosas y tampones empleados en este trabajo se prepararon en agua ultrapura MilliQ® recién generada en un equipo de Merck-Millipore (Billerica, MA, EE. UU.). Los reactivos empleados para su preparación fueron utilizados sin purificación previa. Los nombres y composiciones de dichas disoluciones se describen a continuación:

- Tampón de tapizado: Tampón carbonato-bicarbonato sódico 50 mM, pH 9.6.
- Disolución de lavado: NaCl 150 mM y Tween-20 al 0.05% (v/v).
- PB: Tampón fosfato sódico 100 mM, pH 7.4.
- PB10: Tampón fosfato sódico 10 mM, pH 7.4.
- PB20: Tampón fosfato sódico 20 mM, pH 7.4.
- PBS: Tampón fosfato sódico 10 mM, pH 7.4, con NaCl 140 mM.
- PBS-T: PBS con Tween-20 al 0.05% (v/v).
- PBS(2x)-T: PBS doblemente concentrado, pH 7.4, con Tween-20 al 0.05% (v/v).
- PBS-T(10x): PBS con Tween-20 al 0.5% (v/v).
- PBS-BSA-timerosal: BSA al 1% (m/v) y timerosal al 0.01% (m/v) en PBS.
- Tampón de revelado: Citrato sódico 25 mM y fosfato sódico 62 mM, pH 5.4.
- Disolución de revelado: OPD a 2 mg/mL y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 0.012% (v/v) en tampón de revelado.
- Disolución de parada: H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1 M.
- HBS-EP+: Tampón 2-(4-(2-Hidroxietil)piperazin-1-il)etano-1-sulfonato sódico (HEPES) 10 mM, pH 7.4, con NaCl 150 mM, EDTA 3 mM y surfactante P20 al 0.05% (v/v).
- SAS: Disolución saturada de sulfato de amonio.

### 5.1.6. Inmunoensayos

Los estándares, grado Pestanal, de fluopyram (CAS nº 658066-35-4, Mw 396.71 Da), azoxystrobin (CAS nº 131860-33-8, Mw 403.39 Da), boscalid (CAS nº 188425-85-6, Mw 343.21 Da), cyprodinil (CAS nº 121552-61-2, Mw 225.29 Da), fluopicolide (CAS nº

239110-15-7, Mw 383.58 Da), fluodioxonil (CAS nº 131341-86-1, Mw 248.19 Da), fenhexamid (CAS nº 126833-17-8, Mw 302.20 Da), fluxapyroxad (CAS nº 907204-31-3, Mw 381.30 Da), tebuconazole (CAS nº 107534-96-3, Mw 307.82 Da), trifloxystrobin (CAS nº 141517-21-7, Mw 408.37 Da), pyrimethanil (CAS nº 53112-28-0, Mw 199.25 Da) y pyraclostrobin (CAS nº 175013-18-0, Mw 387.82 Da), así como el estándar de 2-(trifluorometil)benzamida, fueron suministrados por Sigma-Aldrich (Madrid). El estándar, grado Pestanal, de penthiopyrad (CAS nº 131341-86-1, Mw 359.41 Da) fue proporcionado por DuPont (Nambshiem, Francia). Para cada estándar se preparó una disolución stock concentrada (100 mM) en DMF anhidra, que se almacenó en un vial de color ámbar a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

El Tween-20, la *o*-fenilenodiamina (OPD), el  $\text{H}_2\text{O}_2$  (30% v/v) y el suero bovino de adulto (SBA) se adquirieron en Sigma-Aldrich. El anticuerpo policlonal de cabra anti-inmunoglobulinas de conejo conjugado a HRP (GAR-HRP) se adquirió en BioRad (Madrid). El anticuerpo policlonal de conejo anti-inmunoglobulinas de ratón conjugado a HRP (RAM-HRP) fue obtenido de Dako (Glostrup, Dinamarca). El anticuerpo policlonal de cabra anti-inmunoglobulinas G de ratón (GAM) se adquirió en Jackson Immunoresearch Laboratories Inc (West Grove, PA, EE. UU.)

Las microplacas Costar® de poliestireno *high-binding* de 96 pocillos de fondo plano para los análisis mediante ELISA fueron obtenidas de Corning (Corning, NY, EE. UU.). Las placas se lavaron empleando un lavador automático de microplacas modelo ELx405 de BioTek Instruments (Winooski, VT, EE. UU.). La absorbancia obtenida en los ensayos se midió con un lector de microplacas PowerWave HT también de BioTek Instruments. El tratamiento matemático y la representación gráfica de los resultados se llevaron a cabo mediante el uso del software *SigmaPlot* 12.5 de SPSS Inc (Chicago, IL, EE. UU.).

### **5.1.7. Resonancia de plasmones superficiales**

Los análisis de interacción en tiempo real mediante SPR se realizaron en un equipo Biacore T100 de GE Healthcare (Uppsala, Suecia). Los materiales y reactivos para el equipo Biacore, que incluyen los chips CM5 de oro Serie S, el kit de inmovilización llamado Amine Coupling Kit, el tampón HBS-EP+ concentrado (tampón HEPES 100 mM con NaCl 1.5 M, EDTA 30 mM y surfactante P20 al 0.5% v/v), las disoluciones de regeneración y los viales de plástico y vidrio con tapón, fueron proporcionados

igualmente por GE Healthcare. Los análisis se efectuaron a 25 °C. Como tampón de ensayo se empleó en todos los casos HBS-EP+ recién preparado y filtrado a través de membranas de nitrocelulosa de 0.45 µm de diámetro de poro. Las muestras se prepararon también en dicho tampón para minimizar la diferencia de respuesta entre muestras y tampón (efecto *bulk*).

### 5.1.8. Cromatografía de líquidos

El análisis de los extractos de las muestras mediante UPLC–MS/MS se llevó a cabo en un cromatógrafo Acquity de Waters (Milford, MA, EE. UU.) equipado con un sistema binario de suministro de disolvente, acoplado a un detector de espectrometría de masas de triple cuadrupolo TQD equipado con una fuente de electrospray Z-spray. Se empleó una columna Bridged Ethylene Hybrid C18 (50×2.1 mm, tamaño de partícula 1.7 µm) también de Waters como fase estacionaria. La ionización por electrospray se llevó a cabo en modo positivo a 120 °C aplicando al capilar un voltaje de 3.5 kV, con un flujo de gas en el cono de 50 L/h y utilizando nitrógeno a 300 °C como gas de desolvatación a un flujo de 800 L/h. Los resultados se analizaron con el software *MassLynx* 4.1 (Waters). El estándar de fosfato de trifenilo (TPP) empleado como patrón interno fue proporcionado por Sigma-Aldrich (Madrid), y con él se preparó un stock concentrado (100 µg/mL) en acetonitrilo y se almacenó en un vial ámbar a –20 °C. El gel adsorbente de amina primaria/secundaria (PSA) para la limpieza de extractos mediante extracción en fase sólida se obtuvo de Varian (Palo Alto, CA, EE. UU.).

El análisis de mostos y vinos mediante HPLC se realizó en un cromatógrafo Surveyor Plus de Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, EE. UU.) con detectores de índice de refracción y UV/vis. Se empleó como fase estacionaria una columna HyperREZ XP Carbohydrate H+8 µm también de Thermo Fischer Scientific, que se mantuvo a 50 °C durante todo el ensayo. Las muestras se filtraron antes de su análisis con filtros de nylon de 0.2 µm de diámetro de poro.

### 5.1.9. Muestras de campo

Las muestras de campo de ciruela amarilla y uva (variedades bobal, garnacha, macabeo y tempranillo) procedieron de cultivos de la Plana de Utiel (Valencia). Para la trituración y la homogeneización de muestras se utilizaron una picadora americana De'Longhi KF8140G (Treviso, Italia) y un aparato homogeneizador UltraTurrax T-25-

S25N-18G de IKA Works Inc (Staufen, Alemania). Tras su tratamiento, las muestras se almacenaron a  $-20^{\circ}\text{C}$  en tubos de plástico Corning de 50 mL.

Los formulados comerciales Luna<sup>®</sup> Experience (fluopyram) y Fontelis<sup>®</sup> (penthiopyrad) fueron amablemente proporcionados por Bayer Cropscience (Frankfurt, Alemania) y DuPont (Nambesheim, Francia), respectivamente. Los tratamientos se realizaron con pulverizadores de presión previa de 1.5 L. Las muestras se recogieron en bolsas de plástico comerciales con cierre hermético para congelación de alimentos.

La filtración de mostos se llevó a cabo con bolsas Stomacher<sup>®</sup> con filtro de polietileno de 0.5 mm de diámetro de poro suministradas por Seward (Worthing, Reino Unido). Para la preparación de vinos se empleó la cepa de levadura Lalvin QA23 (*Saccharomyces cerevisiae*), que fue proporcionada por Lallemand Inc (Montreal, Quebec, Canadá). La levadura se rehidrató antes de su utilización por inmersión a  $37^{\circ}\text{C}$  en agua MilliQ estéril, siguiendo las instrucciones del fabricante. Las medidas de densidad se efectuaron con un densímetro Densito 30 PX de Mettler-Toledo GmbH (Greifensee, Suiza). La fermentación se llevó a cabo en un incubador Selecta (Barcelona) con un agitador orbital de 16 mm de radio de órbita.

El tratamiento matemático y la representación gráfica de los resultados obtenidos con las muestras de campo se llevaron a cabo mediante el uso del software *SigmaPlot* 12.5 de SPSS Inc (Chicago, IL, EE. UU.).

### **5.1.10. Inmunógenos basados en nanotubos de carbono**

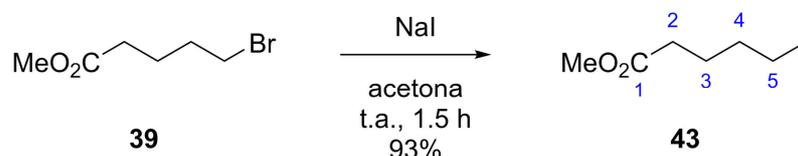
Los nanotubos de carbono de pared múltiple sin funcionalizar (MWNT, 95% m/m, 50–80 nm de diámetro y 10–20  $\mu\text{m}$  de longitud) se adquirieron de Cheap Tubes Inc (Brattleboro, VT, EE. UU.). Los disolventes y reactivos para la funcionalización de los nanotubos se obtuvieron de Sigma-Aldrich (Madrid) y se utilizaron sin purificación previa.

Las reacciones asistidas por microondas se realizaron empleando tanto el instrumental como la metodología descritas en la sección 5.1.1. Para la filtración a vacío de las muestras de nanotubos se emplearon membranas de Nylon Albet<sup>®</sup> de 0.45  $\mu\text{m}$  de diámetro de poro adquiridas de Levantina Lab (Valencia).

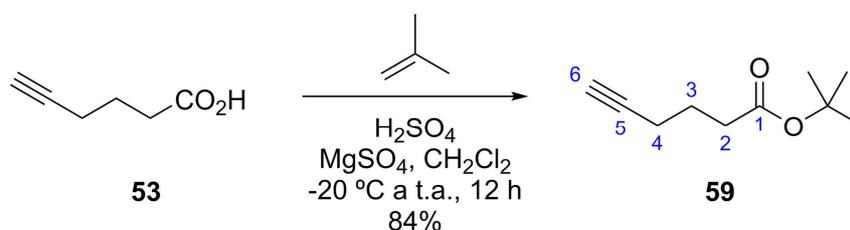
Las medidas de potencial zeta ( $\zeta$ ) para la monitorización de las reacciones se registraron a temperatura ambiente con un aparato Zetasizer Nano ZS de Malvern Instruments Ltd (Worcestershire, Reino Unido). Las muestras se introdujeron en celdas capilares plegadas Size & Zeta potential propias del instrumento, con una capacidad de 750  $\mu$ L. Cada muestra se diluyó convenientemente en agua desionizada hasta entrar en el rango de medida del instrumento. Los resultados fueron procesados con el software del instrumento (Malvern).

Las imágenes de microscopía electrónica de transmisión (TEM) se obtuvieron en un microscopio electrónico JEM-1010 de 100 kV de JEOL (Tokyo, Japón) equipado con una cámara digital AMT RX80 (8 Mpx). La adquisición de imágenes digitales se realizó con el software *Analysis*. Las muestras se depositaron en rejillas de níquel (400 *mesh*) recubiertas con resina de poliformal de vinilo (formvar). El anticuerpo policlonal de cabra anti-inmunoglobulina G de conejo marcado con oro coloidal de 5 nm (GAR–Au) fue proporcionado por Sigma-Aldrich.

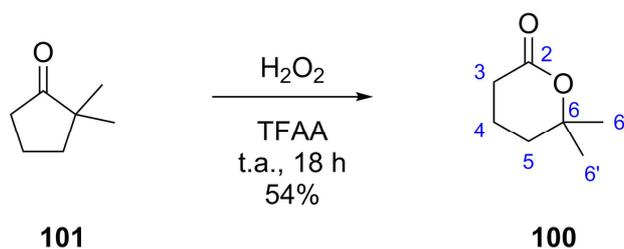
## 5.2. Síntesis de precursores de brazos espaciadores



**5-Yodopentanoato de metilo (43).** A una disolución de NaI (15.37 g, 152.54 mmol) en acetona anhidra (40 mL) se añadió bajo atmósfera de  $N_2$  una disolución de 5-bromopentanoato de metilo (**39**, 5 g, 25.63 mmol) en acetona anhidra (40 mL). La suspensión resultante, de color amarillo pálido, se agitó a temperatura ambiente durante 1.5 h (reacción monitorizada mediante CCF, hexano/AcOEt 4:1). Transcurrido dicho tiempo, la mezcla se diluyó en agua y se extrajo con hexano. Las fases orgánicas reunidas se lavaron con  $Na_2S_2O_3$  acuoso al 5%, con  $Na_2CO_3$  acuoso al 5% y con salmuera, se secaron sobre  $MgSO_4$  anhidro, se filtraron y se evaporaron a vacío. Se obtuvo así el yoduro de alquilo **43** (5.75 g, 93%) como un aceite amarillo pálido [lit.,<sup>188</sup> aceite rojizo] que no requirió purificación adicional. Este compuesto se ha descrito previamente (CAS nº 14273-88-2), coincidiendo las propiedades espectroscópicas observadas con las ya descritas.<sup>187,188</sup>



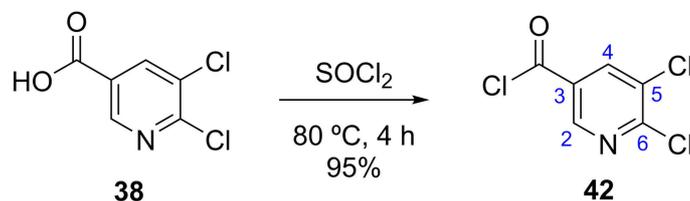
**Hex-5-inoato de *tert*-butilo (59).** A una suspensión agitada de ácido hex-5-inoico (**53**, 2.49 g, 22 mmol),  $\text{MgSO}_4$  anhidro (2.72 g, 22.6 mmol) y  $\text{H}_2\text{SO}_4$  concentrado (310  $\mu\text{L}$ , 5.5 mmol) en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  anhidro (14 mL) a  $-20\text{ }^\circ\text{C}$  se añadió bajo atmósfera de  $\text{N}_2$  isobuteno líquido (6.17 mL, 68.2 mmol). La mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante 12 h. Transcurrido dicho tiempo, la mezcla se enfrió a  $-15\text{ }^\circ\text{C}$  para evaporar el isobuteno remanente, y después se filtró a vacío, enjuagando el  $\text{MgSO}_4$  no filtrado con AcOEt. La fase orgánica filtrada se lavó con  $\text{NaHCO}_3$  acuoso al 5 % y con salmuera, se secó sobre  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anhidro, se filtró y se evaporó a vacío. Se obtuvo así el éster *tert*-butílico **59** (3.09 g, 84%) como un aceite incoloro. Este compuesto se ha descrito previamente (CAS nº 73448-14-3), coincidiendo las propiedades espectroscópicas observadas con las ya descritas.<sup>236</sup>



**6,6-Dimetiltetrahidro-2H-piran-2-ona (100).** A una mezcla de TFAA (905  $\mu\text{L}$ , 6.50 mmol) y  $\text{H}_2\text{O}_2$  acuoso al 35% (m/v, 671  $\mu\text{L}$ , 7.80 mmol) agitada a  $0\text{ }^\circ\text{C}$  durante 90 min se añadió gota a gota 2,2-dimetilciclopentan-1-ona (**101**, 850  $\mu\text{L}$ , 6.50 mmol) durante 2 min. La disolución resultante se agitó a temperatura ambiente durante 18 h (reacción monitorizada mediante CCF,  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$  19:1). Transcurrido dicho tiempo, la mezcla se diluyó en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  y un exceso de disolución acuosa fría de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , y se extrajo con  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ . Las fases orgánicas reunidas se lavaron con salmuera, se secaron sobre  $\text{MgSO}_4$  anhidro, se filtraron y se evaporaron a vacío. Se obtuvo así la lactona **100** (451.7 mg, 54%) como un aceite amarillo pálido que no requirió purificación adicional. Este compuesto se ha descrito previamente (CAS nº 2610-95-9), coincidiendo las propiedades espectroscópicas observadas con las ya descritas.<sup>221,237,238</sup>

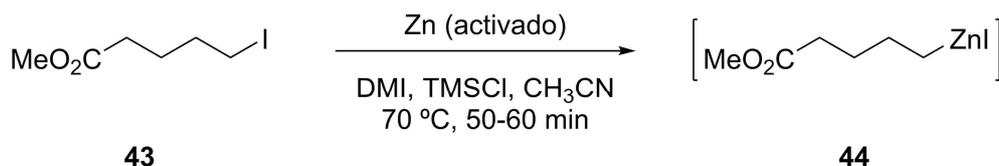
### 5.3. Síntesis de haptenos para fluopyram

#### 5.3.1. Síntesis del hapteno FP $\alpha$

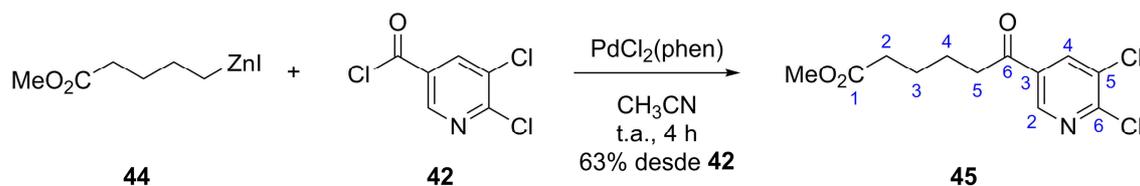


**Cloruro de 5,6-dicloronicotinoilo (42).** Una disolución de ácido 5,6-dicloronicotínico (**38**, 1.00 g, 5.21 mmol) y  $\text{SOCl}_2$  (3.8 mL, 52.08 mmol) se calentó a reflujo (80 °C) hasta que mediante CCF ( $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$  19:1 como eluyente) se observó la desaparición de todo el producto de partida (aproximadamente 4 h). Posteriormente se atemperó la mezcla, se diluyó con tolueno y el disolvente se evaporó a vacío, lo que dio lugar al cloruro de acilo **42** (1.04 g, 95%) como un sólido marrón oscuro [lit.,<sup>186</sup> aceite beige] que se utilizó en la siguiente etapa sin purificación adicional.

Datos físicos y espectroscópicos:<sup>186</sup> **Pf.** 45.6–47.0 °C (tolueno); **IR** (puro)  $\nu_{\text{máx}}$  ( $\text{cm}^{-1}$ ) 3030m, 1750m, 1706m, 1562m, 1545m, 1416f, 1372f, 1198f, 1155f, 1043m, 929f; **RMN- $^1\text{H}$**  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  8.97 (d,  $J = 2.0$  Hz, 1H,  $H_2$  Py), 8.42 (d,  $J = 2.0$  Hz, 1H,  $H_4$  Py); **RMN- $^{13}\text{C}$**  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  165.2 (s, COCl), 155.9 (s,  $C_6$  Py), 149.2 (s,  $C_2$  Py), 140.2 (s,  $C_4$  Py), 131.7 (s,  $C_5$  Py), 129.3 (s,  $C_3$  Py).

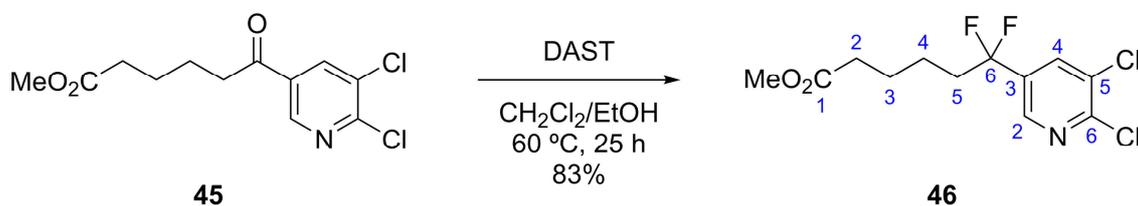


**Yoduro de (5-metoxi-5-oxopentil)zinc(II) (44).** Una suspensión de zinc en polvo activado (139.8 mg, 2.14 mmol) y DMI (308  $\mu\text{L}$ , 2.85 mmol) en  $\text{CH}_3\text{CN}$  anhidro (3 mL) se sonicó en baño de ultrasonidos durante 5 min a temperatura ambiente y bajo atmósfera de Ar. La mezcla se calentó a 60 °C con agitación y se añadieron dos gotas de TMSCl. Pasados 5 min, se añadió gota a gota una disolución del yoduro de alquilo **43** (690.1 mg, 2.85 mmol) en  $\text{CH}_3\text{CN}$  anhidro (3 mL), y la mezcla resultante se agitó bajo atmósfera de Ar a 70 °C durante 50-60 min, lo que dio lugar a una disolución amarilla de yoduro de (5-metoxi-5-oxopentil)zinc(II) (**44**) que se dejó atemperar antes de su utilización.



**6-(5,6-Dicloropiridin-3-il)-6-oxohexanoato de metilo (45).** Una disolución del cloruro de acilo **42** (300 mg, 1.43 mmol) y  $\text{PdCl}_2(\text{phen})$  (15.3 mg, 43  $\mu\text{mol}$ ) en  $\text{CH}_3\text{CN}$  anhidro (3 mL) se añadió gota a gota sobre una disolución recién preparada del organozinc **44** en  $\text{CH}_3\text{CN}$  anhidro (6 mL), bajo atmósfera de Ar a temperatura ambiente. La mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante 4 h (reacción monitorizada mediante CCF, hexano/AcOEt 7:3). Transcurrido dicho tiempo, la mezcla se diluyó en una disolución acuosa saturada de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  y se extrajo con AcOEt. Las fases orgánicas reunidas se lavaron con disolución acuosa saturada de  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , con  $\text{NaHCO}_3$  acuoso al 5% y con salmuera, y posteriormente se secaron sobre  $\text{MgSO}_4$  anhidro, se filtraron y se evaporaron a vacío. El producto crudo se purificó mediante cromatografía flash en columna (gel de sílice, hexano/AcOEt 9:1), obteniéndose el cetoéster **45** (262.6 mg, 63%) como un sólido blanco.

Datos físicos y espectroscópicos: **Pf.** 71.9–72.9 °C (AcOEt); **IR** (puro)  $\nu_{\text{máx}}$  ( $\text{cm}^{-1}$ ) 2953d, 1735f, 1684f, 1576m, 1431m, 1360f, 1282f, 1253m, 1153f, 1040f; **RMN-<sup>1</sup>H** (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  8.80 (d,  $J = 2.1$  Hz, 1H,  $H_2$  Py), 8.27 (d,  $J = 2.1$  Hz, 1H,  $H_4$  Py), 3.66 (s, 3H,  $\text{CO}_2\text{CH}_3$ ), 2.98 (t,  $J = 6.9$  Hz, 2H,  $H_5$ ), 2.37 (t,  $J = 7.0$  Hz, 2H,  $H_2$ ), 1.84–1.65 (m, 4H,  $H_3$  y  $H_4$ ); **RMN-<sup>13</sup>C** (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  196.4 (s,  $C_6$ ), 173.8 (s,  $C_1$ ), 153.3 (s,  $C_6$  Py), 146.9 (s,  $C_2$  Py), 137.9 (s,  $C_4$  Py), 132.1 (s,  $C_3$  Py), 131.5 (s,  $C_5$  Py), 51.8 (s,  $\text{CO}_2\text{CH}_3$ ), 38.8 (s,  $C_5$ ), 33.8 (s,  $C_2$ ), 24.4 (s,  $C_4$ ), 23.2 (s,  $C_3$ ); **EMAR** (TOF, ES+)  $m/z$  calculada para  $\text{C}_{12}\text{H}_{14}^{35}\text{Cl}_2\text{NO}_3$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  290.0345, encontrada 290.0342.



**6-(5,6-Dicloropiridin-3-il)-6,6-difluorohexanoato de metilo (46).** Bajo atmósfera de argón se añadió DAST (1.6 mL, 12.06 mmol) a una disolución del cetoéster **45** (350 mg, 1.21 mmol) en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  anhidro (5.2 mL) y EtOH absoluto (0.1 mL) contenida en una ampolla enfriada a  $-40$  °C. Dicha ampolla se selló a vacío y se calentó a 60 °C durante 25 h. Transcurrido dicho tiempo se abrió la ampolla, la mezcla se diluyó en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  y

agua y se extrajo con  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ . Las fases orgánicas reunidas se lavaron con  $\text{NaHCO}_3$  acuoso al 5% y con salmuera, se secaron sobre  $\text{MgSO}_4$  anhidro, se filtraron y se evaporaron a vacío. El producto crudo se purificó mediante cromatografía flash en columna (gel de sílice, hexano/ $\text{Et}_2\text{O}$  17:3), obteniéndose el compuesto *gem*-difluorado **46** (315.8 mg, 83%) como un aceite amarillo pálido.

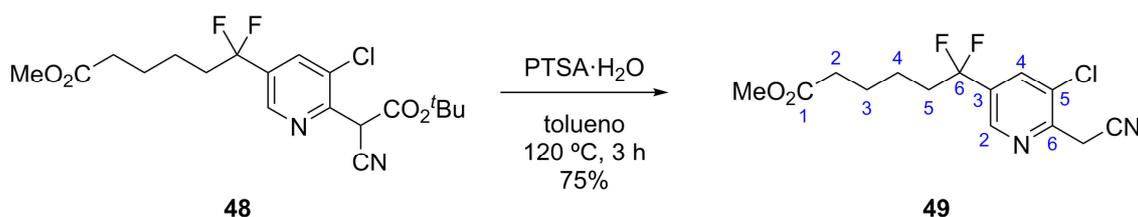
Datos físicos y espectroscópicos: IR (puro)  $\nu_{\text{máx}}$  ( $\text{cm}^{-1}$ ) 2954d, 1735m, 1426d, 1372m, 1217m, 1155f, 998m, 838d, 752f; **RMN-<sup>1</sup>H** (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  8.40 (d,  $J = 2.2$  Hz, 1H,  $H_2$  Py), 7.85 (d,  $J = 2.2$  Hz, 1H,  $H_4$  Py), 3.67 (s, 3H,  $\text{CO}_2\text{CH}_3$ ), 2.32 (t,  $J = 7.3$  Hz, 2H,  $H_2$ ), 2.24–2.04 (m, 2H,  $H_5$ ), 1.69 (tt,  $J = 7.3, 7.3$  Hz, 2H,  $H_3$ ), 1.55–1.42 (m, 2H,  $H_4$ ); **RMN-<sup>13</sup>C** (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  173.6 (s,  $C_1$ ), 150.9 (s,  $C_6$  Py), 144.3 (t,  $^3J_{\text{CF}} = 6.6$  Hz,  $C_2$  Py), 135.8 (t,  $^3J_{\text{CF}} = 6.0$  Hz,  $C_4$  Py), 133.5 (t,  $^2J_{\text{CF}} = 28.2$  Hz,  $C_3$  Py), 130.9 (s,  $C_5$  Py), 121.0 (t,  $^1J_{\text{CF}} = 243.9$  Hz,  $C_6$ ), 51.8 (s,  $\text{CO}_2\text{CH}_3$ ), 38.7 (t,  $^2J_{\text{CF}} = 26.6$  Hz,  $C_5$ ), 33.7 (s,  $C_2$ ), 24.4 (s,  $C_3$ ), 21.9 (t,  $^3J_{\text{CF}} = 3.9$  Hz,  $C_4$ ); **RMN-<sup>19</sup>F** (282 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  -96.19 (s,  $\text{CF}_2$ ); **EMAR** (TOF, ES+)  $m/z$  calculada para  $\text{C}_{12}\text{H}_{14}^{35}\text{Cl}_2\text{F}_2\text{NO}_2$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  312.0364, encontrada 312.0365.



**6-(6-(2-(*tert*-Butoxi)-1-ciano-2-oxoetil)-5-cloropiridin-3-il)-6,6-difluorohexanoato de metilo (48).** Una mezcla de la cloropiridina **46** (100 mg, 0.32 mmol), 2-cianoacetato de *tert*-butilo (**41**, 69  $\mu\text{L}$ , 0.48 mmol) y  $\text{Cs}_2\text{CO}_3$  (261 mg, 0.80 mmol) en THF anhidro (1.5 mL) se introdujo en un tubo de microondas bajo atmósfera de  $\text{N}_2$ . Dicha mezcla se agitó y calentó en horno microondas a 90 °C (300 W) durante 5 h (reacción monitorizada mediante CCF, hexano/ $\text{AcOEt}$  7:3). Transcurrido dicho tiempo, la mezcla se diluyó en agua y se extrajo con  $\text{AcOEt}$ . Las fases orgánicas reunidas se lavaron con salmuera, se secaron sobre  $\text{MgSO}_4$  anhidro, se filtraron y se evaporaron a vacío. El producto crudo se purificó mediante cromatografía flash en columna (gel de sílice, hexano/ $\text{AcOEt}$  9:1), obteniéndose el compuesto **48** (82.7 mg, 62%) como un aceite amarillo intenso, cuyo espectro de  $\text{RMN-}^1\text{H}$  mostró ser una mezcla 2:1 de tautómeros *ceto/enol*.

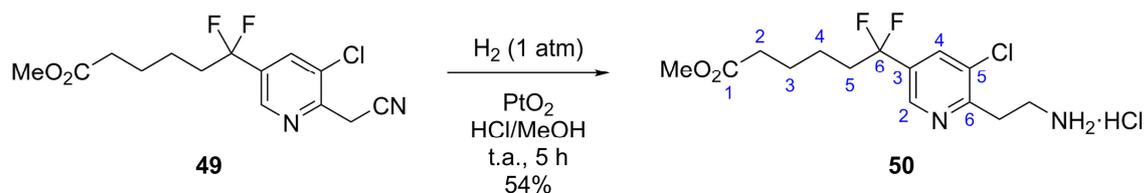
Datos físicos y espectroscópicos: IR (puro)  $\nu_{\text{máx}}$  ( $\text{cm}^{-1}$ ) 2976d, 2962d, 2931d, 2201m, 1736f, 1636m, 1579m, 1369m, 1309m, 1244f, 1148f, 1005m; **RMN-<sup>1</sup>H** (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  8.62 (d,  $J = 1.9$  Hz, 1H,  $H_2$  Py), 7.85 (d,  $J = 1.9$  Hz, 1H,  $H_4$  Py), 5.29 (s, 1H,

CH(CN)), 3.66 (s, 3H, CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 2.33 (t,  $J = 7.3$  Hz, 2H,  $H_2$ ), 2.25–1.99 (m, 2H,  $H_5$ ), 1.69 (tt,  $J = 7.3$ , 7.3 Hz, 2H,  $H_3$ ), 1.50 (s, 9H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 1.56–1.43 (m, 2H,  $H_4$ ); **RMN-<sup>13</sup>C** (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  173.6 (s,  $C_1$ ), 161.8 (s, CO<sub>2</sub>tBu), 149.9 (s,  $C_6$  Py), 144.8 (t,  $^3J_{CF} = 6.4$  Hz,  $C_2$  Py), 135.4 (t,  $^2J_{CF} = 28.1$  Hz,  $C_3$  Py), 134.9 (t,  $^3J_{CF} = 6.1$  Hz,  $C_4$  Py), 131.5 (s,  $C_5$  Py), 121.0 (t,  $^1J_{CF} = 244.1$  Hz,  $C_6$ ), 113.9 (s, CN), 85.8 (s, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 51.8 (s, CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 45.0 (s, CH(CN)), 38.7 (t,  $^2J_{CF} = 26.6$  Hz,  $C_5$ ), 33.7 (s,  $C_2$ ), 27.9 (s, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 24.4 (s,  $C_3$ ), 21.9 (t,  $^3J_{CF} = 4.1$  Hz,  $C_4$ ); **RMN-<sup>19</sup>F** (282 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  -96.61 (s,  $CF_2$ ); **EMAR** (TOF, ES+)  $m/z$  calculada para C<sub>19</sub>H<sub>24</sub><sup>35</sup>ClF<sub>2</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub> [M+H]<sup>+</sup> 417.1387, encontrada 417.1385.



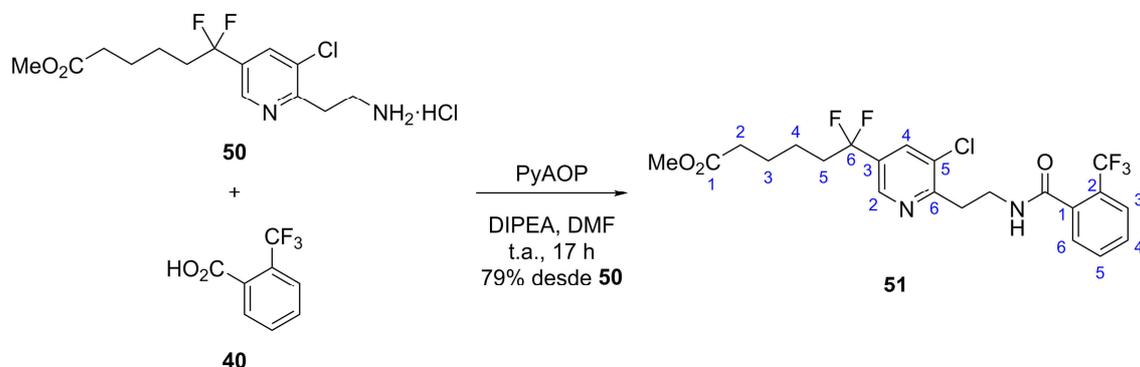
**6-(5-Cloro-6-(cianometil)piridin-3-il)-6,6-difluorohexanoato de metilo (49).** Una disolución del éster *terc*-butílico **48** (150 mg, 0.36 mmol) y monohidrato de PTSA (4.6 mg, 24  $\mu$ mol) en tolueno anhidro (1.1 mL) se agitó a reflujo (120 °C) con agitación bajo atmósfera de N<sub>2</sub> durante 3 h (reacción monitorizada mediante CCF, hexano/AcOEt 7:3). Transcurrido dicho tiempo, la mezcla atemperada se diluyó en tolueno y agua y se extrajo con tolueno. Las fases orgánicas reunidas se lavaron con disolución acuosa de NaHCO<sub>3</sub> al 5% y con salmuera, se secaron sobre MgSO<sub>4</sub> anhidro, se filtraron y se evaporaron a vacío. El producto crudo se purificó mediante cromatografía flash en columna (gel de sílice, hexano/AcOEt 4:1), obteniéndose el nitrilo **49** (85.1 mg, 75%) como un sólido amarillo pálido.

**Datos físicos y espectroscópicos:** **Pf.** 44.2–46.3 °C (hexano/AcOEt); **IR** (puro)  $\nu_{\text{máx}}$  (cm<sup>-1</sup>) 3005d, 2931d, 2874d, 2251d, 1725f, 1598d, 1389f, 1289m, 1167f, 1055m, 995f; **RMN-<sup>1</sup>H** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  8.61 (d,  $J = 1.9$  Hz, 1H,  $H_2$  Py), 7.82 (d,  $J = 1.9$  Hz, 1H,  $H_4$  Py), 4.09 (s, 2H, CH<sub>2</sub>CN), 3.66 (s, 3H, CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 2.32 (t,  $J = 7.3$  Hz, 2H,  $H_2$ ), 2.24–2.06 (m, 2H,  $H_5$ ), 1.68 (tt,  $J = 7.3$ , 7.3 Hz, 2H,  $H_3$ ), 1.56–1.45 (m, 2H,  $H_4$ ); **RMN-<sup>13</sup>C** (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  173.6 (s,  $C_1$ ), 149.7 (s,  $C_6$  Py), 144.8 (t,  $^3J_{CF} = 6.4$  Hz,  $C_2$  Py), 134.7 (t,  $^2J_{CF} = 27.9$  Hz,  $C_3$  Py), 134.5 (t,  $^3J_{CF} = 6.0$  Hz,  $C_4$  Py), 131.0 (s,  $C_5$  Py), 121.0 (t,  $^1J_{CF} = 243.8$  Hz,  $C_6$ ), 115.4 (s, CH<sub>2</sub>CN), 51.8 (s, CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 38.7 (t,  $^2J_{CF} = 26.6$  Hz,  $C_5$ ), 33.7 (s,  $C_2$ ), 25.2 (s,  $C_3$ ), 24.4 (s, CH<sub>2</sub>CN), 21.9 (t,  $^3J_{CF} = 3.9$  Hz,  $C_4$ ); **RMN-<sup>19</sup>F** (282 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  -96.40 (s,  $CF_2$ ); **EMAR** (TOF, ES+)  $m/z$  calculada para C<sub>14</sub>H<sub>16</sub><sup>35</sup>ClF<sub>2</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub> [M+H]<sup>+</sup> 317.0863, encontrada 317.0859.



**Hidrocloruro de 6-(6-(2-aminoetil)-5-cloropiridin-3-il)-6,6-difluorohexanoato de metilo (50).** Una suspensión del nitrilo **49** (82.2 mg, 0.26 mmol) y PtO<sub>2</sub> (17.7 mg, 78 μmol) en una disolución de HCl 0.35 M en MeOH (5.3 mL) se agitó a temperatura ambiente bajo atmósfera de H<sub>2</sub> (1 atm) durante 5 h (reacción monitorizada mediante CCF, CHCl<sub>3</sub>/MeOH 4:1). Transcurrido dicho tiempo, la mezcla se filtró a vacío a través de celite, lavando con MeOH abundante, y el filtrado se evaporó a vacío. El producto crudo se purificó mediante cromatografía flash en columna (gel de sílice, CHCl<sub>3</sub>/MeOH 17:3), obteniéndose el hidrocloruro de amina **50** (54 mg, 58%) como un sólido naranja.

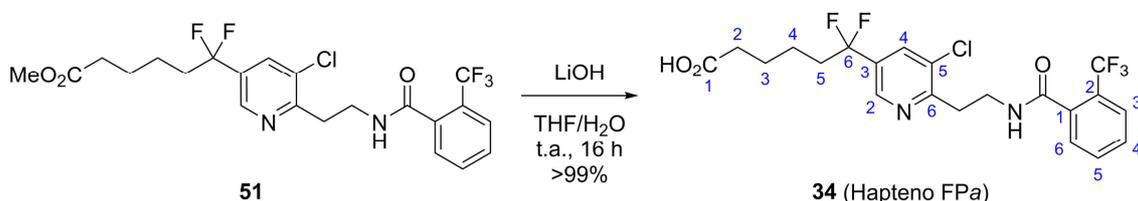
**Datos físicos y espectroscópicos:** **Pf.** 99.5–100.7 °C (CHCl<sub>3</sub>/MeOH); **IR** (puro)  $\nu_{\text{máx}}$  (cm<sup>-1</sup>) 3392m (ancha), 3070m, 2950m, 2915m, 1732f, 1594m, 1497m, 1380m, 1245m, 1165f, 985f; **RMN-<sup>1</sup>H** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  8.53 (d,  $J$  = 1.6 Hz, 1H,  $H_2$  Py), 7.75 (d,  $J$  = 1.9 Hz, 1H,  $H_4$  Py), 7.25 (br s, 3H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH<sub>3</sub>Cl), 3.65 (s, 3H, CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 3.53 (t,  $J$  = 5.6 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 3.40 (t,  $J$  = 5.5 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 2.31 (t,  $J$  = 7.3 Hz, 2H,  $H_2$ ), 2.23–2.03 (m, 2H,  $H_5$ ), 1.67 (t,  $J$  = 7.3 Hz, 2H,  $H_3$ ), 1.55–1.42 (m, 2H,  $H_4$ ); **RMN-<sup>13</sup>C** (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  173.7 (s,  $C_1$ ), 157.0 (s,  $C_6$  Py), 143.9 (t,  $^3J_{\text{CF}}$  = 6.4 Hz,  $C_2$  Py), 134.2 (t,  $^3J_{\text{CF}}$  = 6.0 Hz,  $C_4$  Py), 133.2 (t,  $^2J_{\text{CF}}$  = 28.1 Hz,  $C_3$  Py), 131.5 (s,  $C_5$  Py), 121.2 (t,  $^1J_{\text{CF}}$  = 243.6 Hz,  $C_6$ ), 51.7 (s, CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 38.6 (t,  $^2J_{\text{CF}}$  = 26.7 Hz,  $C_5$ ), 38.0 (s, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 33.7 (s,  $C_2$ ), 31.0 (s, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 24.5 (s,  $C_3$ ), 21.9 (t,  $^3J_{\text{CF}}$  = 3.9 Hz,  $C_4$ ); **RMN-<sup>19</sup>F** (282 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  -96.25 (s, CF<sub>2</sub>); **EMAR** (TOF, ES+)  $m/z$  calculada para C<sub>14</sub>H<sub>20</sub><sup>35</sup>ClF<sub>2</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub> [M-Cl]<sup>+</sup> 321.1176, encontrada 321.1191.



**6-(5-Cloro-6-(2-(2-(trifluorometil)benzamido)etil)piridin-3-il)-6,6-difluorohexanoato de metilo (51).** Una disolución de PyAOP (189.7 mg, 0.36 mmol) en DMF anhidra

(1.5 mL) se añadió gota a gota bajo atmósfera de N<sub>2</sub> sobre una disolución del hidrocloreuro **50** (100 mg, 0.28 mmol), ácido 2-(trifluorometil)benzoico (**40**, 63.9 mg, 0.34 mmol) y DIPEA (146 µL, 0.84 mmol) en DMF anhidra (1.5 mL). La disolución resultante se agitó a temperatura ambiente durante 17 h (reacción monitorizada mediante CCF, hexano/AcOEt 3:7). Transcurrido dicho tiempo, la mezcla se diluyó en agua y se extrajo con AcOEt. Las fases orgánicas reunidas se lavaron con LiCl acuoso al 1.5% y con salmuera, se secaron sobre MgSO<sub>4</sub> anhidro, se filtraron y se evaporaron a vacío. El producto crudo se purificó mediante cromatografía flash en columna (gel de sílice, hexano/AcOEt 3:2), obteniéndose la amida **51** (109.2 mg, 79%) como un sólido amarillo pálido.

Datos físicos y espectroscópicos: **Pf.** 44.5–47.2 °C (Et<sub>2</sub>O); **IR** (puro)  $\nu_{\text{máx}}$  (cm<sup>-1</sup>) 3268m (ancha), 2946d, 2872d, 1725f, 1640f, 1543m, 1314f, 1169f, 1127f, 1059m, 985m; **RMN-<sup>1</sup>H** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  8.47 (d,  $J$  = 2.0 Hz, 1H,  $H_2$  Py), 7.75 (d,  $J$  = 2.0 Hz, 1H,  $H_4$  Py), 7.65 (dd,  $J$  = 6.8, 2.2 Hz, 1H,  $H_6$  Ph), 7.61–7.47 (m, 3H,  $H_3$ ,  $H_4$  y  $H_5$  Ph), 6.74 (br t,  $J$  = 4.6 Hz, 1H, CONH), 3.99 (dt,  $J$  = 6.0 Hz, 2H, NHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 3.65 (s, 3H, CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 3.26 (t,  $J$  = 5.9 Hz, 2H, NHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 2.30 (t,  $J$  = 7.3 Hz, 2H,  $H_2$ ), 2.22–2.05 (m, 2H,  $H_5$ ), 1.67 (dt,  $J$  = 7.4 Hz, 2H,  $H_3$ ), 1.53–1.41 (m, 2H,  $H_4$ ); **RMN-<sup>13</sup>C** (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  173.7 (s,  $C_1$ ), 167.8 (s, CONH), 158.4 (t,  $^5J_{\text{CF}}$  = 1.5 Hz,  $C_6$  Py), 143.8 (t,  $^3J_{\text{CF}}$  = 6.5 Hz,  $C_2$  Py), 136.3 (q,  $^3J_{\text{CF}}$  = 1.8 Hz,  $C_1$  Ph), 133.8 (t,  $^3J_{\text{CF}}$  = 6.1 Hz,  $C_4$  Py), 132.6 (t,  $^2J_{\text{CF}}$  = 28.0 Hz,  $C_3$  Py), 132.2 (s,  $C_5$  Ph), 131.8 (s,  $C_5$  Py), 129.8 (s,  $C_4$  Ph), 128.8 (s,  $C_6$  Ph), 127.2 (q,  $^2J_{\text{CF}}$  = 32.3 Hz,  $C_2$  Ph), 126.4 (q,  $^3J_{\text{CF}}$  = 5.0 Hz,  $C_3$  Ph), 123.7 (q,  $^1J_{\text{CF}}$  = 273.6 Hz, CF<sub>3</sub>), 121.3 (t,  $^1J_{\text{CF}}$  = 243.4 Hz,  $C_6$ ), 51.7 (s, CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 38.7 (t,  $^2J_{\text{CF}}$  = 26.9 Hz,  $C_5$ ), 37.2 (s, NHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 33.9 (s, NHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 33.7 (s,  $C_2$ ), 24.5 (s,  $C_3$ ), 22.0 (t,  $^3J_{\text{CF}}$  = 5.7 Hz,  $C_4$ ); **RMN-<sup>19</sup>F** (282 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  -59.47 (s, CF<sub>3</sub>), -96.17 (s, CF<sub>2</sub>); **EMAR** (TOF, ES+)  $m/z$  calculada para C<sub>22</sub>H<sub>23</sub><sup>35</sup>ClF<sub>5</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub> [M+H]<sup>+</sup> 493.1312, encontrada 493.1318.



**Ácido 6-(5-cloro-6-(2-(2-(trifluorometil)benzamido)etil)piridin-3-il)-6,6-difluoro-hexanoico (hapteno FP $\alpha$ , **34**).** Una disolución acuosa de LiOH 2.5 M (1.1 mL, 2.74 mmol) se añadió gota a gota y con agitación vigorosa sobre una disolución del éster metílico **51** (82.2 mg, 0.17 mmol) en THF anhidro (1.7 mL). La mezcla resultante se

agitó a temperatura ambiente durante 16 h (reacción monitorizada mediante CCF, CHCl<sub>3</sub>/MeOH 19:1). Transcurrido dicho tiempo se evaporó a vacío el THF y el residuo se diluyó en agua, se acidificó con ácido cítrico hasta pH 2-3 y se extrajo con AcOEt. Las fases orgánicas reunidas se lavaron con salmuera, se secaron sobre MgSO<sub>4</sub> anhidro, se filtraron y se evaporaron a vacío. Se obtuvo así el hapteno FP*a* (**34**, 79.9 mg, >99%) como un sólido amarillo pálido que no requirió purificación adicional.

**Datos físicos y espectroscópicos:** **Pf.** 140.1–141.4 °C (CHCl<sub>3</sub>); **IR** (puro)  $\nu_{\text{máx}}$  (cm<sup>-1</sup>) 3289m (ancha), 2950d, 1710m, 1652m, 1541m, 1315f, 1174m, 1133m, 1065d, 1032d, 770m; **RMN-<sup>1</sup>H** (300 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$  8.59 (d,  $J = 1.8$  Hz, 1H,  $H_2$  Py), 7.96 (d,  $J = 1.9$  Hz, 1H,  $H_4$  Py), 7.72 (dd,  $J = 7.4, 0.8$  Hz, 1H,  $H_3$  Ph), 7.70–7.63 (m, 1H,  $H_5$  Ph), 7.63–7.57 (m, 1H,  $H_4$  Ph), 7.48 (dd,  $J = 7.5, 0.6$  Hz, 1H,  $H_6$  Ph), 3.84 (t,  $J = 6.9$  Hz, 2H, NHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 3.30 (t,  $J = 6.9$  Hz, 2H, NHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 2.27 (t,  $J = 7.2$  Hz, 2H,  $H_2$ ), 2.33–2.14 (m, 2H,  $H_5$ ), 1.64 (tt,  $J = 7.2, 7.2$  Hz, 2H,  $H_3$ ), 1.53–1.42 (m, 2H,  $H_4$ ); **RMN-<sup>13</sup>C** (75 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$  177.2 (s,  $C_1$ ), 170.7 (s, CONH), 159.2 (s,  $C_6$  Py), 145.1 (t,  $^3J_{\text{CF}} = 6.6$  Hz,  $C_2$  Py), 137.2 (q,  $^3J_{\text{CF}} = 2.4$  Hz,  $C_1$  Ph), 135.3 (t,  $^3J_{\text{CF}} = 6.1$  Hz,  $C_4$  Py), 134.2 (t,  $^2J_{\text{CF}} = 28.1$  Hz,  $C_3$  Py), 133.3 (s,  $C_5$  Ph), 132.8 (s,  $C_5$  Py), 131.0 (s,  $C_4$  Ph), 129.6 (s,  $C_6$  Ph), 128.2 (q,  $^2J_{\text{CF}} = 32.0$  Hz,  $C_2$  Ph), 127.4 (q,  $^3J_{\text{CF}} = 5.0$  Hz,  $C_3$  Ph), 125.1 (q,  $^1J_{\text{CF}} = 272.9$  Hz, CF<sub>3</sub>), 122.9 (t,  $^1J_{\text{CF}} = 242.3$  Hz,  $C_6$ ), 39.1 (t,  $^2J_{\text{CF}} = 26.7$  Hz,  $C_5$ ), 38.9 (s, NHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 35.3 (s,  $C_2$ ), 34.5 (s, NHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 25.5 (s,  $C_3$ ), 23.0 (t,  $^3J_{\text{CF}} = 4.0$  Hz,  $C_4$ ); **RMN-<sup>19</sup>F** (282 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$  -60.94 (s, CF<sub>3</sub>), -96.99 (s, CF<sub>2</sub>); **EMAR** (TOF, ES+)  $m/z$  calculada para C<sub>21</sub>H<sub>21</sub><sup>35</sup>ClF<sub>5</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub> [M+H]<sup>+</sup> 479.1155, encontrada 479.1157; **UV** (PB)  $\epsilon$  (290 nm) = 0.15 mM<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>,  $\epsilon$  (280 nm) = 1.97 mM<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>,  $\epsilon$  (270 nm) = 3.60 mM<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>,  $\epsilon$  (260 nm) = 2.67 mM<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>,  $\epsilon$  (250 nm) = 1.71 mM<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>.

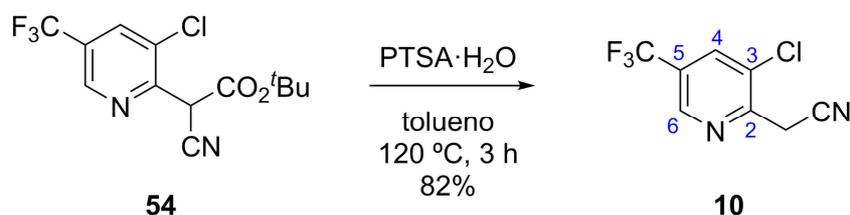
### 5.3.2. Síntesis del hapteno FP*b*



**2-(3-Cloro-5-(trifluorometil)piridin-2-il)-2-cianoacetato de *terc*-butilo (54).** Una mezcla de la dicloropiridina **8** (1 g, 4.63 mmol), 2-cianoacetato de *terc*-butilo (**41**, 992  $\mu$ L, 6.94 mmol) y Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (3.77 g, 11.57 mmol) en THF anhidro (17 mL) se introdujo en un tubo de microondas bajo atmósfera de N<sub>2</sub>. Dicha mezcla se calentó con agitación usando un horno microondas a 90 °C (300 W) durante 2 h (reacción monitorizada

mediante CCF, hexano/AcOEt 4:1). Transcurrido dicho tiempo, la mezcla se diluyó en agua y se extrajo con AcOEt. Las fases orgánicas reunidas se lavaron con salmuera, se secaron sobre  $\text{MgSO}_4$  anhidro, se filtraron y se evaporaron a vacío. El producto crudo se purificó mediante cromatografía flash en columna (gel de sílice, hexano/AcOEt 9:1), obteniéndose el compuesto **54** (1.39 g, 94%) como un sólido amarillo intenso, cuyo espectro de RMN- $^1\text{H}$  mostró ser una mezcla 2:1 de tautómeros *ceto/enol*.

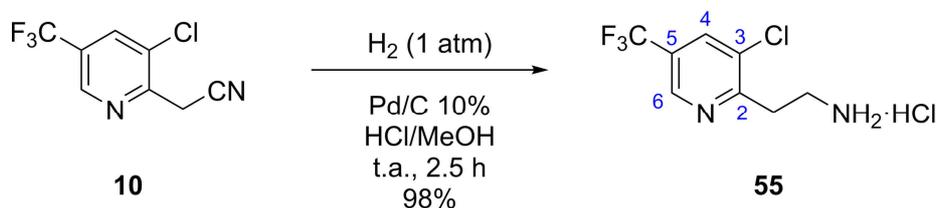
**Datos físicos y espectroscópicos:** Pf. 119.7–121.8 °C (hexano/AcOEt); IR (puro)  $\nu_{\text{máx}}$  ( $\text{cm}^{-1}$ ) 3084d, 3031d, 2979d, 2202f, 1647f, 1591f, 1308f, 1252f, 1002m, 899m, 772m; RMN- $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  8.81 (dq,  $^4J_{\text{HH}} = 1.9$  Hz,  $^4J_{\text{HF}} = 0.8$  Hz, 1H,  $H_6$  Py), 8.03 (dq,  $^4J_{\text{HH}} = 1.9$  Hz,  $^4J_{\text{HF}} = 0.5$  Hz, 1H,  $H_4$  Py), 5.33 (s, 1H,  $\text{CH}(\text{CN})$ ), 1.51 (s, 9H,  $\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ); RMN- $^{13}\text{C}$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  161.4 (s,  $\text{CO}_2\text{tBu}$ ), 152.2 (s,  $\text{C}_2$  Py), 144.7 (q,  $^3J_{\text{CF}} = 4.0$  Hz,  $\text{C}_6$  Py), 135.2 (q,  $^3J_{\text{CF}} = 3.6$  Hz,  $\text{C}_4$  Py), 131.8 (s,  $\text{C}_3$  Py), 128.5 (q,  $^2J_{\text{CF}} = 34.5$  Hz,  $\text{C}_5$  Py), 122.3 (q,  $^1J_{\text{CF}} = 273.5$  Hz,  $\text{CF}_3$ ), 113.5 (s, CN), 86.1 (s,  $\text{CMe}_3$ ), 45.1 (s,  $\text{CH}(\text{CN})$ ), 27.8 (s,  $\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ); RMN- $^{19}\text{F}$  (282 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  -62.95 (s,  $\text{CF}_3$ ); EMAR (TOF, ES+)  $m/z$  calculada para  $\text{C}_{13}\text{H}_{13}^{35}\text{ClF}_3\text{N}_2\text{O}_2$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  321.0612, encontrada 321.0613.



**2-(3-Cloro-5-(trifluorometil)piridin-2-il)acetonitrilo (10).** Una disolución del éster *terc*-butílico **54** (732.3 mg, 2.28 mmol) y monohidrato de PTSA (89.4 mg, 0.16 mmol) en tolueno anhidro (4.5 mL) se calentó a reflujo (120 °C) con agitación bajo atmósfera de  $\text{N}_2$  durante 3 h (reacción monitorizada mediante CCF, hexano/AcOEt 4:1). Transcurrido dicho tiempo, la mezcla se diluyó en agua y se extrajo con benceno. Las fases orgánicas reunidas se lavaron con  $\text{NaHCO}_3$  acuoso al 5% y con salmuera, se secaron sobre  $\text{MgSO}_4$  anhidro, se filtraron y se evaporaron a vacío. El producto crudo se purificó mediante cromatografía flash en columna (gel de sílice, hexano/AcOEt 19:1), obteniéndose el compuesto **10** (412.4 mg, 82%) como un sólido amarillo.

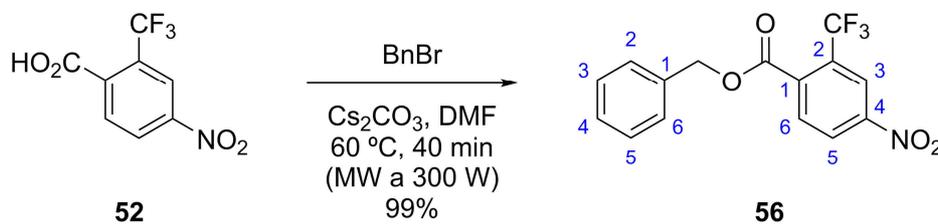
**Datos físicos y espectroscópicos:** Pf. 33.3–34.8 °C (hexano/AcOEt); IR (puro)  $\nu_{\text{máx}}$  ( $\text{cm}^{-1}$ ) 3078d, 2951d, 2923d, 2257m, 1877d, 1846d, 1603m, 1563d, 1396f, 1336f, 1315f, 1134f; RMN- $^1\text{H}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  8.80 (dq,  $^4J_{\text{HH}} = 1.8$  Hz,  $^4J_{\text{HF}} = 0.7$  Hz, 1H,  $H_6$  Py), 7.99 (dq,  $^4J_{\text{HH}} = 1.8$  Hz,  $^4J_{\text{HF}} = 0.5$  Hz, 1H,  $H_4$  Py), 4.14 (s, 2H,  $\text{CH}_2\text{CN}$ ); RMN- $^{13}\text{C}$  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  152.1 (s,  $\text{C}_2$  Py), 144.7 (q,  $^3J_{\text{CF}} = 3.9$  Hz,  $\text{C}_6$  Py), 134.8 (q,  $^3J_{\text{CF}} = 3.6$  Hz,  $\text{C}_4$

Py), 131.3 (s, C<sub>3</sub> Py), 128.0 (q, <sup>2</sup>J<sub>CF</sub> = 31.0 Hz, C<sub>5</sub> Py), 122.4 (q, <sup>1</sup>J<sub>CF</sub> = 273.2 Hz, CF<sub>3</sub>), 114.9 (s, CN), 25.5 (s, CH<sub>2</sub>CN); **RMN**-<sup>19</sup>F (282 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ -62.85 (s, CF<sub>3</sub>); **EMAR** (TOF, ES+) *m/z* calculada para C<sub>8</sub>H<sub>5</sub><sup>35</sup>ClF<sub>3</sub>N<sub>2</sub> [M+H]<sup>+</sup> 221.0088, encontrada 221.0089.



**Hidrocloreto de 2-(3-cloro-5-(trifluorometil)piridin-2-il)etan-1-amina (55).** Una suspensión del nitrilo **10** (37 mg, 0.17 mmol) y Pd/C al 10% (1.4 mg, 1.3 μmol Pd) en una disolución de HCl 0.75 M en MeOH (1.12 mL) se agitó a temperatura ambiente bajo atmósfera de H<sub>2</sub> (1 atm) durante 2.5 h (reacción monitorizada mediante CCF, hexano/AcOEt 4:1). Transcurrido dicho tiempo la mezcla se filtró a través de celite, lavando con abundante MeOH, y se evaporó el disolvente a vacío. Se obtuvo así el hidrocloreto **55** (42.9 mg, 98%) como un sólido anaranjado que no requirió purificación adicional.

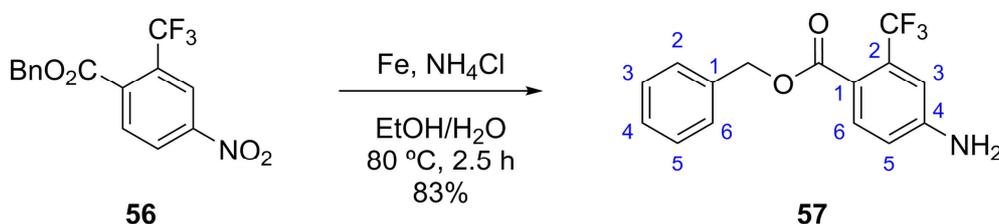
Datos físicos y espectroscópicos:<sup>239</sup> **Pf.** 188.1–190.3 °C (MeOH, descomp.) [lit., pf 188–192 °C]; **IR** (puro) *v*<sub>máx</sub> (cm<sup>-1</sup>) 3398m (ancha), 3112d, 2966m, 2884d, 1604f, 1485m, 1395m, 1328f, 1165m, 1135f, 1056m, 919m; **RMN**-<sup>1</sup>H (300 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ 8.82 (d, *J* = 1.6 Hz, 1H, H<sub>6</sub> Py), 8.26 (d, *J* = 1.6 Hz, 1H, H<sub>4</sub> Py), 3.51 (t, *J* = 6.0 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 3.40 (t, *J* = 6.4 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N); **RMN**-<sup>13</sup>C (75 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 159.1 (s, C<sub>2</sub> Py), 143.9 (q, <sup>3</sup>J<sub>CF</sub> = 4.0 Hz, C<sub>6</sub> Py), 134.3 (q, <sup>3</sup>J<sub>CF</sub> = 3.5 Hz, C<sub>4</sub> Py), 131.0 (s, C<sub>3</sub> Py), 124.8 (q, <sup>2</sup>J<sub>CF</sub> = 32.3 Hz, C<sub>5</sub> Py), 122.9 (q, <sup>1</sup>J<sub>CF</sub> = 273.1 Hz, CF<sub>3</sub>), 36.1 (s, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N), 31.7 (s, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N); **RMN**-<sup>19</sup>F (282 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ -61.07 (s, CF<sub>3</sub>); **EMAR** (TOF, ES+) *m/z* calculada para C<sub>8</sub>H<sub>9</sub><sup>35</sup>ClF<sub>3</sub>N<sub>2</sub> [M-Cl]<sup>+</sup> 225.0401, encontrada 225.0400.



**4-Nitro-2-(trifluorometil)benzoato de bencilo (56).** Una suspensión de ácido 4-nitro-2-(trifluorometil)benzoico (**52**, 1 g, 4.25 mmol), Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (2.07 g, 6.38 mmol) y bromuro de bencilo (0.76 mL, 6.38 mmol) en DMF anhidra (17 mL) se introdujo en un tubo de microondas. Dicha mezcla se calentó con agitación usando un horno

microondas a 60 °C (300 W) durante 40 min (reacción monitorizada mediante CCF, hexano/AcOEt 9:1). Transcurrido dicho tiempo, la mezcla se diluyó en agua y se extrajo con AcOEt. Las fases orgánicas reunidas se lavaron con LiCl acuoso al 1.5% y con salmuera, se secaron sobre MgSO<sub>4</sub> anhidro, se filtraron y se evaporaron a vacío. El producto crudo se purificó mediante cromatografía flash en columna (gel de sílice, hexano/AcOEt 19:1), obteniéndose el éster bencílico **56** (1.37 g, 99%) como un aceite amarillo.

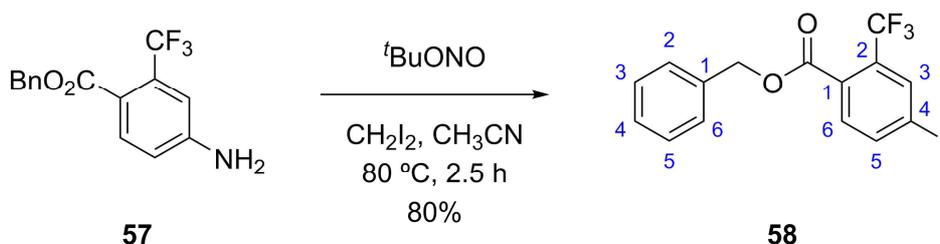
**Datos físicos y espectroscópicos:** IR (puro)  $\nu_{\text{máx}}$  (cm<sup>-1</sup>) 3092d, 3031d, 2951d, 2890d, 1736f, 1617m, 1535m, 1353m, 1289f, 1113f, 1046f, 912m; **RMN-<sup>1</sup>H** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  8.60 (d,  $J$  = 2.2 Hz, 1H,  $H_3$  Ph), 8.44 (dd,  $J$  = 8.5, 2.2 Hz, 1H,  $H_5$  Ph), 7.97 (d,  $J$  = 8.5 Hz, 1H,  $H_6$  Ph), 7.48–7.34 (m, 5H, CH<sub>2</sub>C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>), 5.41 (s, 2H, CH<sub>2</sub>Ph); **RMN-<sup>13</sup>C** (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  164.9 (s, CO<sub>2</sub>Bn), 149.0 (s,  $C_4$  Ph), 136.8 (q,  $^3J_{\text{CF}}$  = 1.7 Hz,  $C_1$  Ph), 134.5 (s,  $C_1$  CH<sub>2</sub>Ph), 131.9 (s,  $C_6$  Ph), 130.7 (q,  $^2J_{\text{CF}}$  = 34.4 Hz,  $C_2$  Ph), 129.0 (s,  $C_4$  CH<sub>2</sub>Ph), 128.9 (s,  $C_3$  y  $C_5$  CH<sub>2</sub>Ph), 128.9 (s,  $C_2$  y  $C_6$  CH<sub>2</sub>Ph), 126.7 (s,  $C_5$  Ph), 122.4 (q,  $^3J_{\text{CF}}$  = 5.5 Hz,  $C_3$  Ph), 122.2 (q,  $^1J_{\text{CF}}$  = 274.2 Hz, CF<sub>3</sub>), 68.9 (s, CH<sub>2</sub>Ph); **RMN-<sup>19</sup>F** (282 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  -60.27 (s, CF<sub>3</sub>); **EMAR** (TOF, ES+)  $m/z$  calculada para NaC<sub>15</sub>H<sub>10</sub>F<sub>3</sub>NO<sub>4</sub> [M+Na]<sup>+</sup> 348.0454, encontrada 348.0445.



**4-Amino-2-(trifluorometil)benzoato de bencilo (57).** Sobre una disolución del nitroderivado **56** (661.7 mg, 2.03 mmol) y NH<sub>4</sub>Cl (54.4 mg, 1.02 mmol) en etanol (13 mL) y agua (2.3 mL) a 80 °C se añadió poco a poco Fe en polvo (363.7 mg, 6.51 mmol). La suspensión resultante se agitó a 80 °C durante 2.5 h (reacción monitorizada mediante CCF, hexano/AcOEt 7:3). Transcurrido dicho tiempo, la mezcla se atemperó, se diluyó en agua y se extrajo con AcOEt. Las fases orgánicas reunidas se lavaron con salmuera, se secaron sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro, se filtraron y se evaporaron a vacío. El producto crudo se purificó mediante cromatografía flash en columna (gel de sílice, hexano/AcOEt 9:1), obteniéndose la anilina **57** (500 mg, 83%) como un aceite amarillo.

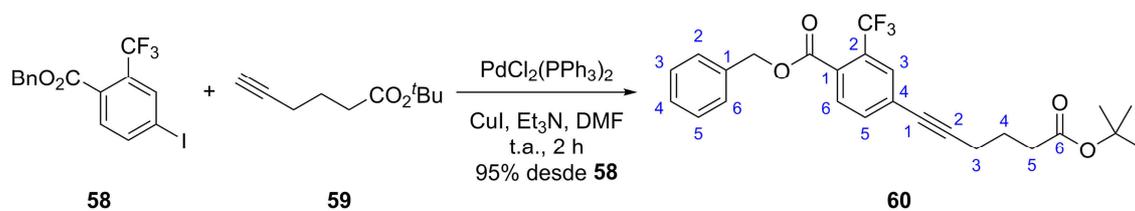
**Datos físicos y espectroscópicos:** IR (puro)  $\nu_{\text{máx}}$  (cm<sup>-1</sup>) 3495m, 3386f, 3227d, 2943d, 1720f, 1632f, 1604f, 1456m, 1352m, 1274f, 1166f, 1041m; **RMN-<sup>1</sup>H** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  7.78 (d,  $J$  = 8.5 Hz, 1H,  $H_6$  Ph), 7.48–7.32 (m, 5H, CH<sub>2</sub>C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>), 6.97 (d,  $J$  = 2.3 Hz, 1H,  $H_3$  Ph), 6.73 (dd,  $J$  = 8.5, 2.3 Hz, 1H,  $H_5$  Ph), 5.32 (s, 2H, CH<sub>2</sub>Ph), 4.18 (br s, 2H, NH<sub>2</sub>);

**RMN-<sup>13</sup>C** (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 165.9 (s, CO<sub>2</sub>Bn), 149.8 (s, C<sub>4</sub> Ph), 135.9 (s, C<sub>1</sub> CH<sub>2</sub>Ph), 133.7 (s, C<sub>6</sub> Ph), 131.4 (q, <sup>2</sup>J<sub>CF</sub> = 32.4 Hz, C<sub>2</sub> Ph), 128.7 (s, C<sub>3</sub> y C<sub>5</sub> CH<sub>2</sub>Ph), 128.5 (s, C<sub>2</sub> y C<sub>6</sub> CH<sub>2</sub>Ph), 128.4 (s, C<sub>4</sub> CH<sub>2</sub>Ph), 123.4 (q, <sup>1</sup>J<sub>CF</sub> = 273.7 Hz, CF<sub>3</sub>), 119.0 (s, C<sub>1</sub> Ph), 115.9 (s, C<sub>5</sub> Ph), 112.9 (q, <sup>3</sup>J<sub>CF</sub> = 6.1 Hz, C<sub>3</sub> Ph), 67.2 (s, CH<sub>2</sub>Ph); **RMN-<sup>19</sup>F** (282 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ -60.22 (s, CF<sub>3</sub>); **EMAR** (TOF, ES+) *m/z* calculada para C<sub>15</sub>H<sub>13</sub>F<sub>3</sub>NO<sub>2</sub> [M+H]<sup>+</sup> 296.0893, encontrada 296.0895.



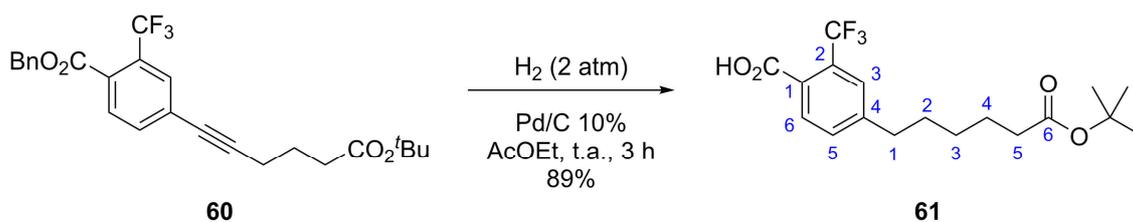
**4-Yodo-2-(trifluorometil)benzoato de bencilo (58)**. A una disolución a temperatura ambiente de la anilina **57** (929 mg, 3.15 mmol) en CH<sub>2</sub>I<sub>2</sub> (9 mL, 111.71 mmol) y CH<sub>3</sub>CN anhidro (3.3 mL) se añadió bajo atmósfera de N<sub>2</sub> nitrito de *terc*-butilo (1.72 mL, 14.47 mmol). La mezcla resultante se calentó a reflujo (80 °C) y se agitó durante 2.5 h (reacción monitorizada mediante CCF, hexano/AcOEt 7:3). Transcurrido dicho tiempo la mezcla se dejó atemperar y el disolvente se evaporó a vacío. El producto crudo se purificó mediante cromatografía flash en columna (gel de sílice, hexano/AcOEt 19:1), obteniéndose el yoduro **58** (1.03 g, 80%) como un sólido amarillo pálido.

**Datos físicos y espectroscópicos:** **Pf.** 38.2–39.0 °C (hexano/AcOEt); **IR** (puro)  $\nu_{\text{máx}}$  (cm<sup>-1</sup>) 2924d, 2852d, 1738f, 1589m, 1564d, 1456m, 1377m, 1302f, 1259f, 1174f, 1046f, 697m; **RMN-<sup>1</sup>H** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 8.08 (d, *J* = 1.4 Hz, 1H, H<sub>3</sub> Ph), 7.95 (dd, *J* = 8.2, 1.4 Hz, 1H, H<sub>5</sub> Ph), 7.53 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H, H<sub>6</sub> Ph), 7.47–7.32 (m, 5H, CH<sub>2</sub>C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>), 5.36 (s, 2H, CH<sub>2</sub>Ph); **RMN-<sup>13</sup>C** (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 166.0 (s, CO<sub>2</sub>Bn), 141.1 (s, C<sub>5</sub> Ph), 135.9 (q, <sup>3</sup>J<sub>CF</sub> = 5.7 Hz, C<sub>3</sub> Ph), 135.1 (s, C<sub>1</sub> CH<sub>2</sub>Ph), 131.9 (s, C<sub>6</sub> Ph), 130.6 (q, <sup>3</sup>J<sub>CF</sub> = 1.9 Hz, C<sub>1</sub> Ph), 130.4 (q, <sup>2</sup>J<sub>CF</sub> = 32.8 Hz, C<sub>2</sub> Ph), 128.8 (s, C<sub>3</sub> y C<sub>5</sub> CH<sub>2</sub>Ph), 128.8 (s, C<sub>2</sub>, C<sub>4</sub> y C<sub>6</sub> CH<sub>2</sub>Ph), 122.3 (q, <sup>1</sup>J<sub>CF</sub> = 274.3 Hz, CF<sub>3</sub>), 97.5 (s, C<sub>4</sub> Ph), 68.2 (s, CH<sub>2</sub>Ph); **RMN-<sup>19</sup>F** (282 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ -60.04 (s, CF<sub>3</sub>); **EMAR** (TOF, ES+) *m/z* calculada para C<sub>15</sub>H<sub>14</sub>F<sub>3</sub>INO<sub>2</sub> [M+NH<sub>4</sub>]<sup>+</sup> 424.0016, encontrada 424.0008.



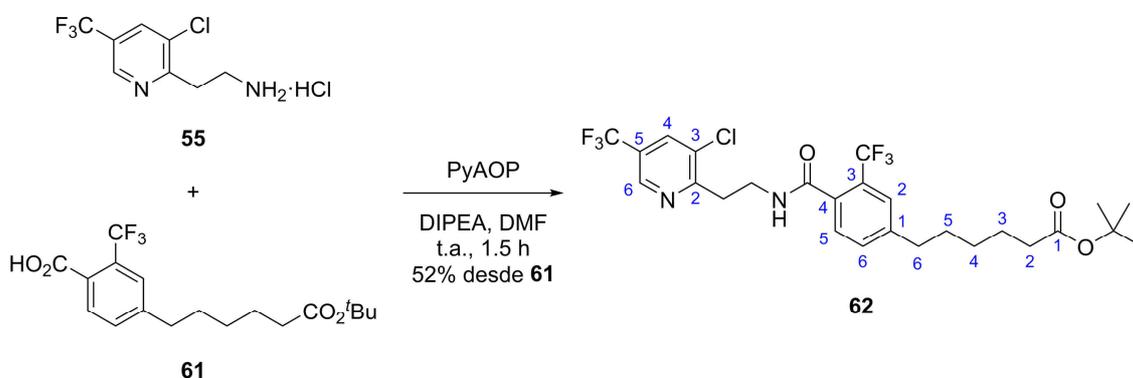
**4-(6-(*tert*-Butoxi)-6-oxohex-1-in-1-il)-2-(trifluorometil)benzoato de bencilo (60).** A una disolución agitada y sonicada bajo atmósfera de  $\text{N}_2$  del yodobenceno **58** (450 mg, 1.11 mmol),  $\text{PdCl}_2(\text{PPh}_3)_2$  (21.1 mg, 33  $\mu\text{mol}$ ),  $\text{CuI}$  (15.2 mg, 78  $\mu\text{mol}$ ) y el alquino **59** (279.3 mg, 1.66 mmol) en DMF anhidra (887  $\mu\text{L}$ ) a temperatura ambiente se añadió trietilamina (887  $\mu\text{L}$ , 6.36 mmol). La mezcla resultante se agitó durante 2 h a temperatura ambiente (reacción monitorizada mediante CCF, hexano/AcOEt 4:1). Transcurrido dicho tiempo, la mezcla se diluyó en agua y se extrajo con AcOEt. Las fases orgánicas reunidas se lavaron con  $\text{LiCl}$  acuoso al 1.5% y con salmuera, se secaron sobre  $\text{MgSO}_4$  anhidro, se filtraron y se evaporaron a vacío. El producto crudo se purificó mediante cromatografía flash en columna (gel de sílice, hexano/AcOEt 19:1), obteniéndose el producto de acoplamiento cruzado **60** (472.2 mg, 95%) como un aceite amarillo pálido.

**Datos físicos y espectroscópicos:** IR (puro)  $\nu_{\text{máx}}$  ( $\text{cm}^{-1}$ ) 2977d, 2935d, 2230d, 1725f, 1610m, 1456m, 1367m, 1286m, 1258f, 1141f, 1047f; **RMN- $^1\text{H}$**  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7.74 (d,  $J = 1.3$  Hz, 1H,  $H_3$  Ph), 7.74 (d,  $J = 8.0$  Hz, 1H,  $H_6$  Ph), 7.57 (dd,  $J = 8.0, 1.3$  Hz, 1H,  $H_5$  Ph), 7.46–7.31 (m, 5H,  $\text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_5$ ), 5.36 (s, 2H,  $\text{CH}_2\text{Ph}$ ), 2.49 (t,  $J = 7.2$  Hz, 2H,  $H_3$ ), 2.40 (t,  $J = 7.2$  Hz, 2H,  $H_5$ ), 1.90 (tt,  $J = 7.2, 7.2$  Hz, 2H,  $H_4$ ), 1.46 (s, 9H,  $\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ); **RMN- $^{13}\text{C}$**  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  172.4 (s,  $\text{C}_6$ ), 166.1 (s,  $\text{CO}_2\text{Bn}$ ), 135.2 (s,  $\text{C}_1$   $\text{CH}_2\text{Ph}$ ), 134.5 (s,  $\text{C}_5$  Ph), 130.7 (s,  $\text{C}_6$  Ph), 130.0 (q,  $^3J_{\text{CF}} = 5.5$  Hz,  $\text{C}_3$  Ph), 129.6 (q,  $^3J_{\text{CF}} = 1.9$  Hz,  $\text{C}_1$  Ph), 129.3 (q,  $^2J_{\text{CF}} = 32.8$  Hz,  $\text{C}_2$  Ph), 128.8 (s,  $\text{C}_3$  y  $\text{C}_5$   $\text{CH}_2\text{Ph}$ ), 128.7 (s,  $\text{C}_2$  y  $\text{C}_6$   $\text{CH}_2\text{Ph}$ ), 128.7 (s,  $\text{C}_4$   $\text{CH}_2\text{Ph}$ ), 127.7 (s,  $\text{C}_4$  Ph), 123.1 (q,  $^1J_{\text{CF}} = 273.7$  Hz,  $\text{CF}_3$ ), 93.9 (s,  $\text{C}_2$ ), 80.6 (s,  $\text{CMe}_3$ ), 79.6 (s,  $\text{C}_1$ ), 68.0 (s,  $\text{CH}_2\text{Ph}$ ), 34.5 (s,  $\text{C}_5$ ), 28.3 (s,  $\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ), 23.9 (s,  $\text{C}_4$ ), 19.0 (s,  $\text{C}_3$ ); **RMN- $^{19}\text{F}$**  (282 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  -60.09 (s,  $\text{CF}_3$ ); **EMAR** (TOF, ES+)  $m/z$  calculada para  $\text{C}_{25}\text{H}_{29}\text{F}_3\text{NO}_4$   $[\text{M}+\text{NH}_4]^+$  464.2043, encontrada 464.2044.



**Ácido 4-(6-(*terc*-butoxi)-6-oxohexil)-2-(trifluorometil)benzoico (61).** Una suspensión del alquino **60** (420 mg, 0.94 mmol) y Pd/C al 10% (217.3 mg, 0.20 mmol Pd) en AcOEt anhidro (11.2 mL) se introdujo en un reactor equipado con agitación magnética y se hidrogenó a temperatura ambiente durante 3 h bajo una presión de  $\text{H}_2$  de 2 atm. Transcurrido dicho tiempo el reactor se despresurizó y la suspensión negra se filtró a través de celite, lavando con EtOAc. Tras evaporar el disolvente a vacío, se obtuvo el ácido **61** (303 mg, 89%) como un aceite naranja que se utilizó en la siguiente etapa sin purificación adicional.

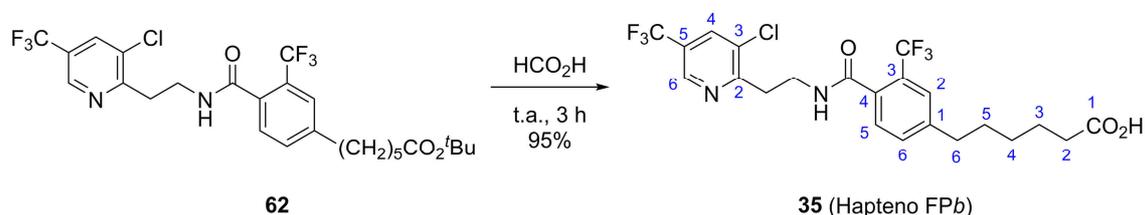
**Datos físicos y espectroscópicos:** IR (puro)  $\nu_{\text{máx}}$  ( $\text{cm}^{-1}$ ) 3000d (ancha), 2932m, 2860d, 1726f, 1710f, 1368m, 1312m, 1138f, 1048m; **RMN- $^1\text{H}$**  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  8.14 (br s, 1H,  $\text{CO}_2\text{H}$ ), 7.90 (d,  $J = 7.9$  Hz, 1H,  $H_6$  Ph), 7.58 (d,  $J = 1.2$  Hz, 1H,  $H_3$  Ph), 7.43 (dd,  $J = 7.9, 1.2$  Hz, 1H,  $H_5$  Ph), 2.72 (t,  $J = 7.7$  Hz, 2H,  $H_1$ ), 2.22 (t,  $J = 7.4$  Hz, 2H,  $H_5$ ), 1.67 (tt,  $J = 7.6, 7.6$  Hz, 2H,  $H_2$ ), 1.63 (tt,  $J = 7.5, 7.5$  Hz, 2H,  $H_4$ ), 1.43 (s, 9H,  $\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ), 1.41–1.31 (m, 2H,  $H_3$ ); **RMN- $^{13}\text{C}$**  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  173.5 (s,  $\text{C}_6$ ), 171.3 (s,  $\text{CO}_2\text{H}$ ), 147.9 (s,  $\text{C}_4$  Ph), 131.7 (s,  $\text{C}_6$  Ph), 131.7 (s,  $\text{C}_5$  Ph), 129.7 (q,  $^2J_{\text{CF}} = 32.5$  Hz,  $\text{C}_2$  Ph), 127.2 (q,  $^3J_{\text{CF}} = 5.8$  Hz,  $\text{C}_1$  y  $\text{C}_3$  Ph), 123.4 (q,  $^1J_{\text{CF}} = 273.5$  Hz,  $\text{CF}_3$ ), 80.4 (s,  $\text{CMe}_3$ ), 35.7 (s,  $\text{C}_1$ ), 35.5 (s,  $\text{C}_5$ ), 30.7 (s,  $\text{C}_2$ ), 28.7 (s,  $\text{C}_3$ ), 28.2 (s,  $\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ), 24.9 (s,  $\text{C}_4$ ); **RMN- $^{19}\text{F}$**  (282 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  -59.77 (s,  $\text{CF}_3$ ); **EMAR** (TOF, ES+)  $m/z$  calculada para  $\text{C}_{18}\text{H}_{27}\text{F}_3\text{NO}_4$   $[\text{M}+\text{NH}_4]^+$  378.1887, encontrada 378.1883.



**6-(4-((2-(3-Cloro-5-(trifluorometil)piridin-2-il)etil)carbamoilo)-3-(trifluorometil)fenil)hexanoato de *terc*-butilo (62).** Una disolución de PyAOP (64.9 mg, 0.13 mmol) en DMF anhidra (0.5 mL) se añadió gota a gota bajo atmósfera de  $\text{N}_2$  sobre una disolución

del hidrocloreto **55** (25 mg, 96  $\mu\text{mol}$ ), el ácido **61** (34.5 mg, 96  $\mu\text{mol}$ ) y DIPEA (50  $\mu\text{L}$ , 0.29 mmol) en DMF anhidra (0.5 mL). La disolución roja resultante se agitó a temperatura ambiente durante 1.5 h (reacción monitorizada mediante CCF, hexano/AcOEt 3:2). Transcurrido dicho tiempo, la mezcla se diluyó en agua y se extrajo con AcOEt. Las fases orgánicas reunidas se lavaron con LiCl acuoso al 1.5% y con salmuera, se secaron sobre  $\text{MgSO}_4$  anhidro, se filtraron y se evaporaron a vacío. El producto crudo se purificó mediante cromatografía flash en columna (gel de sílice, hexano/AcOEt 4:1), obteniéndose la amida **62** (28.2 mg, 52%) como un aceite amarillo pálido.

**Datos físicos y espectroscópicos:** IR (puro)  $\nu_{\text{máx}}$  ( $\text{cm}^{-1}$ ) 3301d (ancha), 2973d, 2929d, 2859d, 1724f, 1655m, 1538d, 1319f, 1136f, 1063m, 911d, 847d; **RMN- $^1\text{H}$**  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  8.65 (d,  $J = 1.3$  Hz, 1H,  $H_6$  Py), 7.91 (d,  $J = 1.3$  Hz, 1H,  $H_4$  Py), 7.43 (d,  $J = 1.1$  Hz, 1H,  $H_2$  Ph), 7.41 (d,  $J = 8.1$  Hz, 1H,  $H_5$  Ph), 7.35 (dd,  $J = 8.1, 1.1$  Hz, 1H,  $H_6$  Ph), 6.66 (t,  $J = 5.8$  Hz, 1H, CONH), 3.98 (dt,  $J = 5.8, 5.8$  Hz, 2H,  $\text{NHCH}_2\text{CH}_2$ ), 3.29 (t,  $J = 5.8$  Hz, 2H,  $\text{NHCH}_2\text{CH}_2$ ), 2.65 (t,  $J = 7.7$  Hz, 2H,  $H_6$ ), 2.20 (t,  $J = 7.4$  Hz, 2H,  $H_2$ ), 1.62 (tt,  $J = 7.3, 6.3$  Hz, 2H,  $H_5$ ), 1.59 (tt,  $J = 7.3, 5.7$  Hz, 2H,  $H_3$ ), 1.42 (s, 9H,  $\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ), 1.38–1.28 (m, 2H,  $H_4$ ); **RMN- $^{13}\text{C}$**  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  173.2 (s,  $\text{C}_1$ ), 168.0 (s, CONH), 160.9 (s,  $\text{C}_2$  Py), 144.9 (s,  $\text{C}_1$  Ph), 143.7 (q,  $^3J_{\text{CF}} = 4.0$  Hz,  $\text{C}_6$  Py), 133.9 (q,  $^3J_{\text{CF}} = 3.5$  Hz,  $\text{C}_4$  Py), 133.6 (q,  $^3J_{\text{CF}} = 1.9$  Hz,  $\text{C}_4$  Ph), 132.0 (s,  $\text{C}_3$  Py), 132.0 (s,  $\text{C}_6$  Ph), 128.8 (s,  $\text{C}_5$  Ph), 127.1 (q,  $^2J_{\text{CF}} = 31.4$  Hz,  $\text{C}_3$  Ph), 126.2 (q,  $^3J_{\text{CF}} = 4.9$  Hz,  $\text{C}_2$  Ph), 125.9 (q,  $^2J_{\text{CF}} = 33.6$  Hz,  $\text{C}_5$  Py), 123.7 (q,  $^1J_{\text{CF}} = 273.8$  Hz,  $\text{CF}_3$  Ph), 122.8 (q,  $^1J_{\text{CF}} = 272.8$  Hz,  $\text{CF}_3$  Py), 80.2 (s,  $\text{CMe}_3$ ), 36.9 (s,  $\text{NHCH}_2\text{CH}_2$ ), 35.5 (s,  $\text{C}_2$  y  $\text{C}_6$ ), 34.2 (s,  $\text{NHCH}_2\text{CH}_2$ ), 30.9 (s,  $\text{C}_5$ ), 28.6 (s,  $\text{C}_4$ ), 28.2 (s,  $\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ), 24.9 (s,  $\text{C}_3$ ); **RMN- $^{19}\text{F}$**  (282 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  -59.37 (s,  $\text{CF}_3$  Ph), -62.74 (s,  $\text{CF}_3$  Py); **EMAR** (TOF, ES+)  $m/z$  calculada para  $\text{C}_{26}\text{H}_{30}^{35}\text{ClF}_6\text{N}_2\text{O}_3$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  567.1844, encontrada 567.1815.

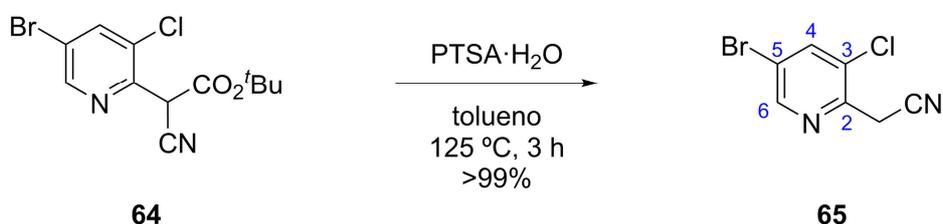


**Ácido 6-(4-((2-(3-cloro-5-(trifluorometil)piridin-2-il)etil)carbamoil)-3-(trifluorometil)fenil)hexanoico (hapteno FPb, 35).** Una disolución del éster *terc*-butílico **62** (56 mg, 0.11 mmol) en ácido fórmico (2.3 mL) se agitó a temperatura ambiente durante 3 h (reacción monitorizada mediante CCF,  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$  19:1). Transcurrido dicho tiempo, la mezcla se diluyó en  $\text{CHCl}_3$  y se evaporó el disolvente a vacío, repitiendo hasta



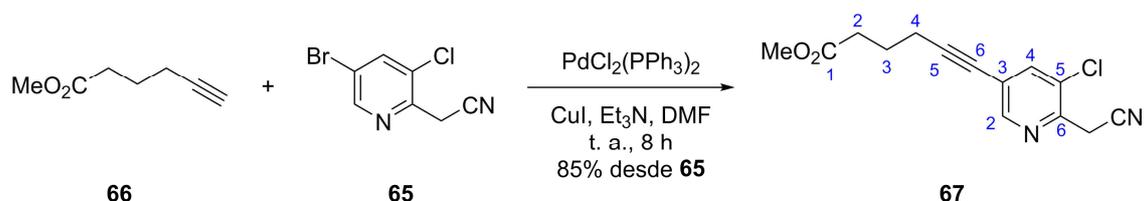
MgSO<sub>4</sub> anhidro, se filtraron y se evaporaron a vacío. El producto crudo se purificó mediante cromatografía flash en columna (gel de sílice, hexano/AcOEt 19:1), obteniéndose el compuesto **64** (552.3 mg, 76%) como un sólido amarillo intenso.

Datos físicos y espectroscópicos: **Pf.** 101.1–102.6 °C (hexano/AcOEt); **IR** (puro)  $\nu_{\text{máx}}$  (cm<sup>-1</sup>) 2983d, 2947d, 2251m, 1732f, 1555d, 1428m, 1370m, 1283m, 1149f, 1055m, 825f; **RMN-<sup>1</sup>H** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  8.60 (d,  $J = 2.0$  Hz, 1H,  $H_6$  Py), 7.95 (d,  $J = 2.0$  Hz, 1H,  $H_4$  Py), 5.21 (s, 1H, CH(CN)), 1.49 (s, 9H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>); **RMN-<sup>13</sup>C** (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  161.7 (s, CO<sub>2</sub>tBu), 149.2 (s,  $C_6$  Py), 147.1 (s,  $C_2$  Py), 140.1 (s,  $C_4$  Py), 131.8 (s,  $C_3$  Py), 121.3 (s,  $C_5$  Py), 113.8 (s, CN), 85.7 (s, CMe<sub>3</sub>), 44.7 (s, CH(CN)), 27.8 (s, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>); **EMAR** (TOF, ES+)  $m/z$  calculada para C<sub>8</sub>H<sub>5</sub><sup>79</sup>Br<sup>35</sup>CIN<sub>2</sub>O<sub>2</sub> [M–C<sub>4</sub>H<sub>8</sub>]<sup>+</sup> 274.9217, encontrada 274.9219.



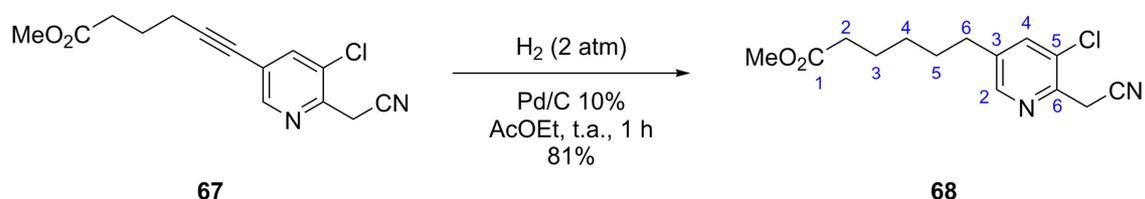
**2-(5-Bromo-3-cloropiridin-2-il)acetonitrilo (65).** Una disolución del éster *tert*-butílico **64** (448.5 mg, 1.35 mmol) y monohidrato de PTSA (17.3 mg, 91  $\mu$ mol) en tolueno anhidro (2.7 mL) se calentó a reflujo (125 °C) con agitación bajo atmósfera de N<sub>2</sub> durante 3 h (reacción monitorizada mediante CCF, hexano/AcOEt 4:1). Transcurrido dicho tiempo, la mezcla se diluyó en éter etílico y agua y se extrajo con éter. Las fases orgánicas reunidas se lavaron con NaHCO<sub>3</sub> acuoso al 5% y salmuera, se secaron sobre MgSO<sub>4</sub> anhidro, se filtraron y se evaporaron a vacío. El producto crudo se purificó mediante cromatografía flash en columna (gel de sílice, hexano/AcOEt 19:1), obteniéndose el nitrilo **65** (325 mg, 75%) como un aceite amarillento.

Datos físicos y espectroscópicos: **IR** (puro)  $\nu_{\text{máx}}$  (cm<sup>-1</sup>) 3060d, 2913d, 2251m, 1559d, 1441m, 1398m, 1371m, 1103m, 1048f, 845m, 700m; **RMN-<sup>1</sup>H** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  8.55 (d,  $J = 2.0$  Hz, 1H,  $H_6$  Py), 7.89 (d,  $J = 2.0$  Hz, 1H,  $H_4$  Py), 4.00 (s, 2H, CH<sub>2</sub>CN); **RMN-<sup>13</sup>C** (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  149.0 (s,  $C_6$  Py), 146.7 (s,  $C_2$  Py), 139.6 (s,  $C_4$  Py), 131.3 (s,  $C_3$  Py), 120.4 (s,  $C_5$  Py), 115.3 (s, CN), 24.8 (s, CH<sub>2</sub>CN); **EMAR** (TOF, ES+)  $m/z$  calculada para C<sub>7</sub>H<sub>5</sub><sup>79</sup>Br<sup>35</sup>CIN<sub>2</sub> [M+H]<sup>+</sup> 230.9319, encontrada 230.9316.



**6-(5-Cloro-6-(cianometil)piridin-3-il)hex-5-inoato de metilo (67).** A una disolución agitada y sonicada bajo atmósfera de  $\text{N}_2$  de la bromopiridina **65** (100 mg, 0.43 mmol),  $\text{PdCl}_2(\text{PPh}_3)_2$  (9.2 mg, 13  $\mu\text{mol}$ ),  $\text{CuI}$  (5.8 mg, 30  $\mu\text{mol}$ ) y hex-5-inoato de metilo (**66**, 82.6 mg, 0.66 mmol) en DMF anhidra (400  $\mu\text{L}$ ) a temperatura ambiente se añadió trietilamina (400  $\mu\text{L}$ , 2.87 mmol). La disolución marrón resultante se agitó durante 8 h a temperatura ambiente (reacción monitorizada mediante CCF, hexano/AcOEt 4:1). Transcurrido dicho tiempo, la mezcla se diluyó en agua y se extrajo con éter etílico. Las fases orgánicas reunidas se lavaron con  $\text{LiCl}$  acuoso al 1.5% y con salmuera, se secaron sobre  $\text{MgSO}_4$  anhidro, se filtraron y se evaporaron a vacío. El producto crudo se purificó mediante cromatografía flash en columna (gel de sílice, hexano/AcOEt 9:1), obteniéndose el producto de acoplamiento cruzado **67** (101.1 mg, 85%) como un sólido marrón.

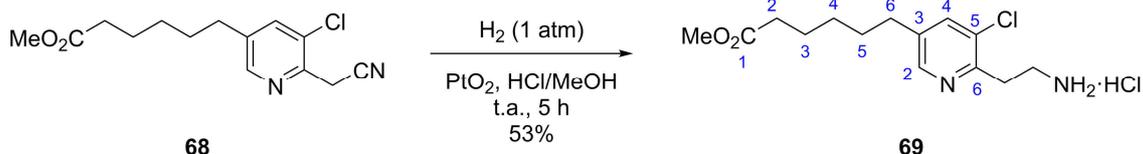
**Datos físicos y espectroscópicos:** **Pf.** 55.1–57.1  $^\circ\text{C}$  (hexano/AcOEt); **IR** (puro)  $\nu_{\text{máx}}$  ( $\text{cm}^{-1}$ ) 2944d, 2254m, 2226m, 1725f, 1437m, 1374m, 1261m, 1195f, 1056f, 885m, 706m; **RMN- $^1\text{H}$**  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  8.46 (d,  $J = 1.8$  Hz, 1H,  $H_2$  Py), 7.68 (d,  $J = 1.8$  Hz, 1H,  $H_4$  Py), 4.01 (s, 2H,  $\text{CH}_2\text{CN}$ ), 3.66 (s, 3H,  $\text{CO}_2\text{CH}_3$ ), 2.51 (t,  $J = 7.2$  Hz, 2H,  $H_4$ ), 2.46 (t,  $J = 7.2$  Hz, 2H,  $H_2$ ), 1.92 (tt,  $J = 7.2, 7.2$  Hz, 2H,  $H_3$ ); **RMN- $^{13}\text{C}$**  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  173.3 (s,  $\text{C}_1$ ), 150.2 (s,  $\text{C}_2$  Py), 146.4 (s,  $\text{C}_6$  Py), 139.5 (s,  $\text{C}_4$  Py), 130.2 (s,  $\text{C}_5$  Py), 122.2 (s,  $\text{C}_3$  Py), 115.6 (s, CN), 95.1 (s,  $\text{C}_5$ ), 76.4 (s,  $\text{C}_6$ ), 51.7 (s,  $\text{CO}_2\text{CH}_3$ ), 32.8 (s,  $\text{C}_2$ ), 25.0 (s,  $\text{CH}_2\text{CN}$ ), 23.5 (s,  $\text{C}_3$ ), 19.0 (s,  $\text{C}_4$ ); **EMAR** (TOF, ES+)  $m/z$  calculada para  $\text{C}_{14}\text{H}_{14}^{35}\text{ClN}_2\text{O}_2$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  277.0738, encontrada 277.0740.



**6-(5-Cloro-6-(cianometil)piridin-3-il)hexanoato de metilo (68).** Una suspensión del alquino **67** (84.6 mg, 0.31 mmol) y  $\text{Pd/C}$  al 10% (65.4 mg, 61  $\mu\text{mol}$   $\text{Pd}$ ) en AcOEt anhidro (2.3 mL) se introdujo en un reactor equipado con agitación magnética y se hidrogenó a temperatura ambiente durante 1 h bajo una presión de  $\text{H}_2$  de 2 atm.

Transcurrido dicho tiempo, el reactor se despresurizó y la suspensión negra se filtró a través de gel de sílice, lavando con AcOEt, y el filtrado se evaporó a sequedad. Se obtuvo así el compuesto hidrogenado **68** (69.4 mg, 81%) como un aceite amarillo que se utilizó en la siguiente etapa sin purificación adicional.

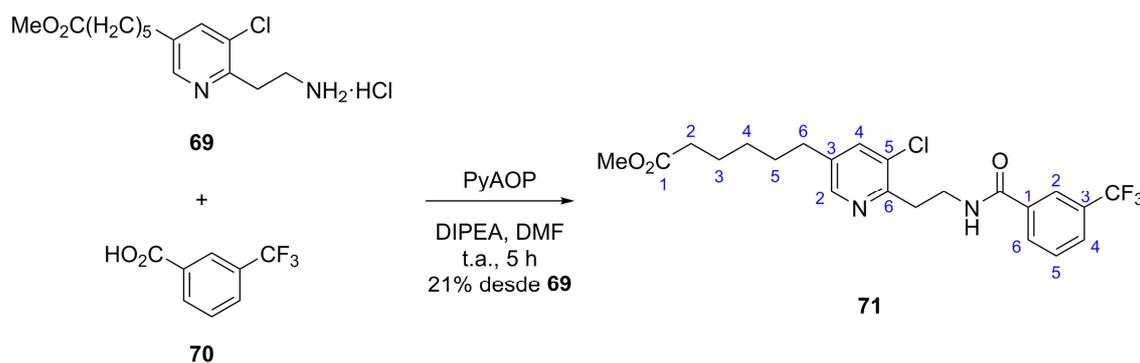
Datos físicos y espectroscópicos: IR (puro)  $\nu_{\text{máx}}$  ( $\text{cm}^{-1}$ ) 2930m, 2859d, 2254m, 1732f, 1457m, 1399m, 1171f, 1057f, 890m, 714m; **RMN-<sup>1</sup>H** (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  8.31 (d,  $J = 1.7$  Hz, 1H,  $H_2$  Py), 7.52 (d,  $J = 1.7$  Hz, 1H,  $H_4$  Py), 4.00 (s, 2H,  $\text{CH}_2\text{CN}$ ), 3.65 (s, 3H,  $\text{CO}_2\text{CH}_3$ ), 2.61 (t,  $J = 7.5$  Hz, 2H,  $H_6$ ), 2.30 (t,  $J = 7.5$  Hz, 2H,  $H_2$ ), 1.65 (tt,  $J = 7.5, 7.5$  Hz, 2H,  $H_3$ ), 1.62 (tt,  $J = 7.5, 7.5$  Hz, 2H,  $H_5$ ), 1.41–1.29 (m, 2H,  $H_4$ ); **RMN-<sup>13</sup>C** (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  174.0 (s,  $C_1$ ), 148.1 (s,  $C_2$  Py), 145.3 (s,  $C_6$  Py), 139.6 (s,  $C_3$  Py), 137.1 (s,  $C_4$  Py), 130.6 (s,  $C_5$  Py), 116.1 (s, CN), 51.6 (s,  $\text{CO}_2\text{CH}_3$ ), 33.9 (s,  $C_2$ ), 32.1 (s,  $C_6$ ), 30.5 (s,  $C_5$ ), 28.6 (s,  $C_4$ ), 24.8 (s,  $\text{CH}_2\text{CN}$ ), 24.6 (s,  $C_3$ ); **EMAR** (TOF, ES+)  $m/z$  calculada para  $\text{C}_{14}\text{H}_{18}^{35}\text{ClN}_2\text{O}_2$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  281.1051, encontrada 281.1055.



**Hidrocloreto de 6-(6-(2-aminoetil)-5-cloropiridin-3-il)hexanoato de metilo (69).**

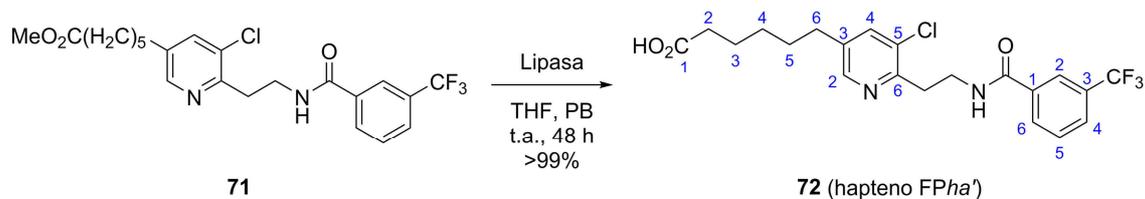
Una suspensión del nitrilo **68** (69.4 mg, 0.25 mmol) y  $\text{PtO}_2$  (0.74 mg, 3.26  $\mu\text{mol}$ ) en una disolución de HCl 0.75 M en MeOH (3.5 mL, 2.63 mmol) se agitó a temperatura ambiente bajo atmósfera de  $\text{H}_2$  (1 atm) durante 5 h (reacción monitorizada mediante CCF,  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$  19:1). Transcurrido dicho tiempo, la mezcla se filtró a vacío a través de celite, lavando con MeOH. Posteriormente se evaporó el disolvente, se diluyó el residuo en agua y se extrajo con AcOEt. Las fases orgánicas reunidas se lavaron con salmuera, se secaron sobre  $\text{MgSO}_4$  anhidro, se filtraron y se evaporaron a vacío. El residuo obtenido, cuyo análisis mediante  $\text{RMN-}^1\text{H}$  confirmó la presencia del hidrocloreto de amina **69**, se utilizó en la siguiente etapa sin purificación adicional.

Datos físicos y espectroscópicos: **RMN-<sup>1</sup>H** (300 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  8.61 (s, 1H,  $H_2$  Py), 8.45 (s, 1H,  $H_4$  Py), 3.65 (s, 3H,  $\text{CO}_2\text{CH}_3$ ), 2.86 (t,  $J = 7.7$  Hz, 2H,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}$ ), 2.73 (t,  $J = 7.7$  Hz, 2H,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}$ ), 2.35 (t,  $J = 7.7$  Hz, 2H,  $H_6$ ), 2.33 (t,  $J = 7.4$  Hz, 2H,  $H_2$ ), 1.68 (tt,  $J = 7.7, 7.7$  Hz, 2H,  $H_5$ ), 1.66 (tt,  $J = 7.4, 7.4$  Hz, 2H,  $H_3$ ), 1.46–1.35 (m, 2H,  $H_4$ ).



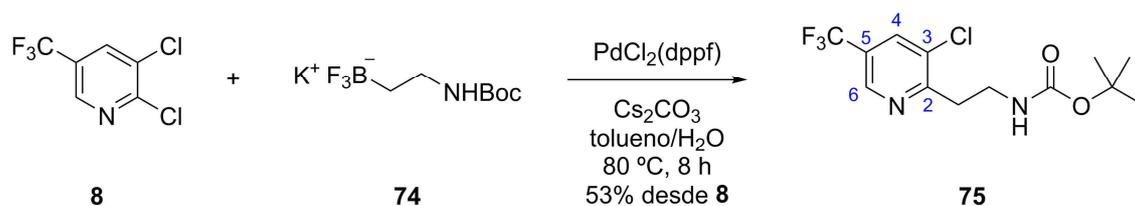
**6-(5-Cloro-6-(2-(3-(trifluorometil)benzamido)etil)piridin-3-il)hexanoato de metilo (71).** Una disolución de PyAOP (88.5 mg, 0.17 mmol) en DMF anhidra (0.75 mL) se añadió gota a gota bajo atmósfera de  $\text{N}_2$  sobre una disolución del hidrocloreuro **69** (41.8 mg, 0.13 mmol), ácido 3-(trifluorometil)benzoico (**70**, 24.8 mg, 0.13 mmol) y DIPEA (68  $\mu\text{L}$ , 0.39 mmol) en DMF anhidra (0.75 mL). La disolución marrón resultante se agitó a temperatura ambiente durante 5 h (reacción monitorizada mediante CCF, hexano/ $\text{AcOEt}$  3:2). Transcurrido dicho tiempo, la mezcla se diluyó en agua y se extrajo con  $\text{AcOEt}$ . Las fases orgánicas reunidas se lavaron con  $\text{LiCl}$  acuoso al 1.5% y con salmuera, se secaron sobre  $\text{MgSO}_4$  anhidro, se filtraron y se evaporaron a vacío. El producto crudo se purificó mediante cromatografía flash en columna (gel de sílice,  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$  99:1), obteniéndose la amida **71** (12.5 mg, 21%) como un aceite amarillo anaranjado.

Datos físicos y espectroscópicos: IR (puro)  $\nu_{\text{máx}}$  ( $\text{cm}^{-1}$ ) 3324m (ancha), 2933m, 2859d, 1735f, 1646f, 1543f, 1335f, 1277f, 1127f, 1074m, 1699m; **RMN- $^1\text{H}$**  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  8.26 (d,  $J = 1.8$  Hz, 1H,  $H_2$  Py), 8.05 (s, 1H,  $H_2$  Ph), 8.01 (d,  $J = 7.9$  Hz, 1H,  $H_6$  Ph), 7.71 (d,  $J = 7.9$  Hz, 1H,  $H_4$  Ph), 7.70 (t,  $J = 6.0$  Hz, 1H, CONH), 7.63 (d,  $J = 1.8$  Hz, 1H,  $H_4$  Py), 7.55 (dd,  $J = 7.9, 7.9$  Hz, 1H,  $H_5$  Ph), 3.94 (dt,  $J = 6.0, 6.0$  Hz, 2H,  $\text{NHCH}_2\text{CH}_2$ ), 3.65 (s, 3H,  $\text{CO}_2\text{CH}_3$ ), 3.32 (t,  $J = 6.0$  Hz, 2H,  $\text{NHCH}_2\text{CH}_2$ ), 2.62 (t,  $J = 7.7$  Hz, 2H,  $H_6$ ), 2.29 (t,  $J = 7.4$  Hz, 2H,  $H_2$ ), 1.70–1.56 (m, 4H,  $H_3$  y  $H_5$ ), 1.42–1.30 (m, 2H,  $H_4$ ); **RMN- $^{13}\text{C}$**  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  174.1 (s,  $C_1$ ), 166.0 (s, CONH), 153.5 (s,  $C_6$  Py), 145.0 (s,  $C_2$  Py), 138.8 (s,  $C_3$  Py), 138.5 (s,  $C_4$  Py), 135.4 (s,  $C_1$  Ph), 132.3 (s,  $C_5$  Py), 131.1 (q,  $^2J_{\text{CF}} = 31.9$  Hz,  $C_3$  Ph), 130.4 (s,  $C_6$  Ph), 129.2 (s,  $C_5$  Ph), 128.0 (q,  $^3J_{\text{CF}} = 3.7$  Hz,  $C_4$  Ph), 124.3 (q,  $^3J_{\text{CF}} = 3.9$  Hz,  $C_2$  Ph), 123.9 (q,  $^1J_{\text{CF}} = 273.3$  Hz,  $\text{CF}_3$ ), 51.6 (s,  $\text{CO}_2\text{CH}_3$ ), 37.8 (s,  $\text{NHCH}_2\text{CH}_2$ ), 33.9 (s,  $C_2$ ), 32.6 (s,  $\text{NHCH}_2\text{CH}_2$ ), 32.1 (s,  $C_6$ ), 30.5 (s,  $C_5$ ), 28.6 (s,  $C_4$ ), 24.6 (s,  $C_3$ ); **RMN- $^{19}\text{F}$**  (282 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  -63.20 (s,  $\text{CF}_3$ ); **EMAR** (TOF, ES+)  $m/z$  calculada para  $\text{C}_{22}\text{H}_{25}^{35}\text{ClF}_3\text{N}_2\text{O}_3$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  457.1500, encontrada 457.1501.



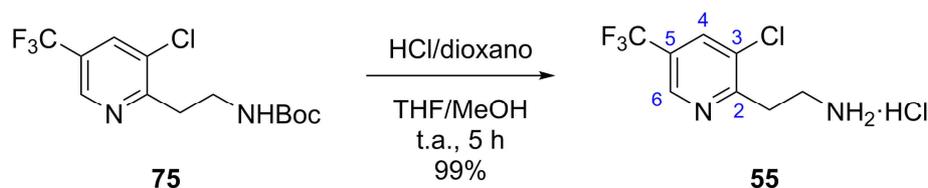
**Ácido 6-(5-cloro-6-(2-(2-(trifluorometil)benzamido)etil)piridin-3-il)hexanoico (hapteno FPha', 72).** A una disolución del éster metílico **71** (11.9 mg, 26  $\mu\text{mol}$ ) en THF (1.5 mL) se añadió una suspensión de lipasa inmovilizada (14.3 mg,  $\geq 71.5$  unidades) en PB (0.38 mL). La mezcla amarilla resultante se agitó a temperatura ambiente durante 48 h (reacción monitorizada mediante CCF,  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$  9:1). Transcurrido dicho tiempo la mezcla se filtró por gravedad, lavando la lipasa separada con agua desionizada, y el filtrado se extrajo con AcOEt. Las fases orgánicas reunidas se lavaron con salmuera, se secaron sobre  $\text{MgSO}_4$  anhidro, se filtraron y se evaporaron a vacío. Se obtuvo así el hapteno FPha' (**72**, 11.5 mg, >99%) como un aceite amarillo que no requirió purificación adicional.

**Datos físicos y espectroscópicos:** IR (puro)  $\nu_{\text{máx}}$  ( $\text{cm}^{-1}$ ) 2927d, 1713f, 1652f, 1540m, 1333m, 1276m, 1168m, 1128f, 1073m, 912d; **RMN- $^1\text{H}$**  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  8.25 (br s, 1H,  $\text{CO}_2\text{H}$ ), 8.25 (d,  $J = 1.2$  Hz, 1H,  $H_2$  Py), 8.01 (s, 1H,  $H_2$  Ph), 7.94 (d,  $J = 7.8$  Hz, 1H,  $H_6$  Ph), 7.71 (d,  $J = 7.8$  Hz, 1H,  $H_4$  Ph), 7.60 (br t,  $J = 5.5$  Hz, 1H, CONH), 7.54 (dd,  $J = 7.8$ , 7.8 Hz, 1H,  $H_5$  Ph), 7.53 (d,  $J = 1.2$  Hz, 1H,  $H_4$  Py), 3.93 (dt,  $J = 5.5$ , 5.5 Hz, 2H,  $\text{NHCH}_2\text{CH}_2$ ), 3.23 (t,  $J = 5.5$  Hz, 2H,  $\text{NHCH}_2\text{CH}_2$ ), 2.60 (t,  $J = 7.5$  Hz, 2H,  $H_6$ ), 2.34 (t,  $J = 7.5$  Hz, 2H,  $H_2$ ), 1.66 (tt,  $J = 7.5$ , 7.5 Hz, 2H,  $H_5$ ), 1.64 (tt,  $J = 7.5$ , 7.5 Hz, 2H,  $H_3$ ), 1.38 (tt,  $J = 7.5$ , 7.5 Hz, 2H,  $H_4$ ); **RMN- $^{13}\text{C}$**  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  178.1 (s,  $C_1$ ), 166.0 (s, CONH), 154.1 (s,  $C_6$  Py), 146.7 (s,  $C_2$  Py), 137.8 (s,  $C_3$  Py), 137.4 (s,  $C_4$  Py), 135.7 (s,  $C_1$  Ph), 131.7 (s,  $C_5$  Py), 131.1 (q,  $^2J_{\text{CF}} = 32.8$  Hz,  $C_3$  Ph), 130.5 (s,  $C_6$  Ph), 129.2 (s,  $C_5$  Ph), 128.0 (q,  $^3J_{\text{CF}} = 3.7$  Hz,  $C_4$  Ph), 124.1 (q,  $^3J_{\text{CF}} = 3.8$  Hz,  $C_2$  Ph), 124.0 (q,  $^1J_{\text{CF}} = 272.6$  Hz,  $\text{CF}_3$ ), 38.0 (s,  $\text{NHCH}_2\text{CH}_2$ ), 33.9 (s,  $C_2$ ), 33.3 (s,  $\text{NHCH}_2\text{CH}_2$ ), 32.0 (s,  $C_6$ ), 30.5 (s,  $C_5$ ), 28.5 (s,  $C_4$ ), 24.5 (s,  $C_3$ ); **RMN- $^{19}\text{F}$**  (282 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  -63.21 (s,  $\text{CF}_3$ ); **EMAR** (TOF, ES+)  $m/z$  calculada para  $\text{C}_{21}\text{H}_{23}^{35}\text{ClF}_3\text{N}_2\text{O}_3$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  443.1344, encontrada 443.1338.

5.3.4. Síntesis del hapteno *FPhb*

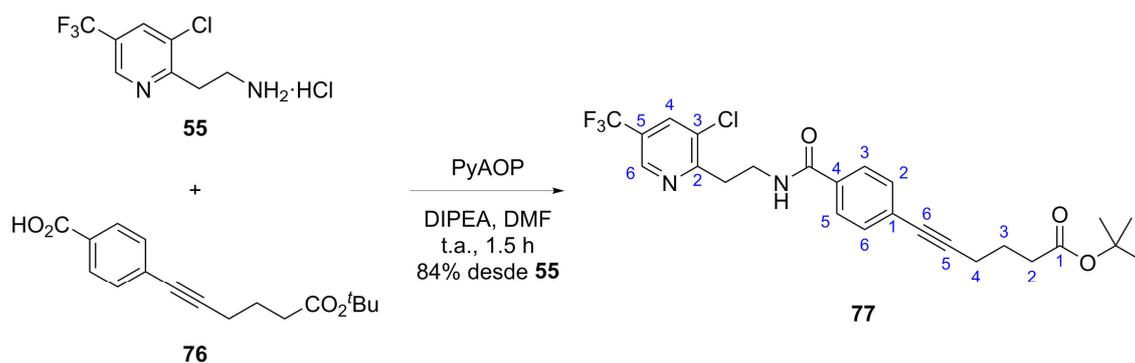
**(2-(3-Cloro-5-(trifluorometil)piridin-2-il)etil)carbamato de *terc*-butilo (75)**. A una disolución de (2-((*terc*-butoxicarbonil)amino)etil)trifluoroborato de potasio (**74**, 55 mg, 0.22 mmol),  $\text{Cs}_2\text{CO}_3$  (195.4 mg, 0.60 mmol) y  $\text{PdCl}_2(\text{dppf})$  (7.3 mg, 10  $\mu\text{mol}$ ) en una mezcla 2:1 de tolueno y agua (1.5 mL) se añadió bajo atmósfera de Ar 2,3-dicloro-5-(trifluorometil)piridina (**8**, 43.2 mg, 0.20 mmol). La mezcla marrón resultante se agitó a 80 °C durante 8 h (reacción monitorizada mediante CCF, hexano/AcOEt 4:1). Transcurrido dicho tiempo, la mezcla se atemperó lentamente, se diluyó en agua y se extrajo con éter etílico. Las fases orgánicas reunidas se lavaron con salmuera, se secaron sobre  $\text{MgSO}_4$  anhidro, se filtraron y se evaporaron a vacío. El producto crudo se purificó mediante cromatografía flash en columna (gel de sílice, hexano/AcOEt 19:1), obteniéndose el producto de acoplamiento cruzado **75** (34.2 mg, 53%) como un sólido naranja.

**Datos físicos y espectroscópicos:** **Pf.** 81.0–81.8 °C (hexano/AcOEt); **IR** (puro)  $\nu_{\text{máx}}$  ( $\text{cm}^{-1}$ ) 3349m, 2982d, 2928d, 1685f, 1603d, 1529f, 1464m, 1324f, 1135f, 1093m, 882m; **RMN-<sup>1</sup>H** (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  8.70 (d,  $^4J_{\text{HH}} = 2.0$  Hz,  $^4J_{\text{HF}} = 0.8$  Hz, 1H,  $H_6$  Py), 7.88 (d,  $^4J_{\text{HH}} = 2.0$  Hz,  $^4J_{\text{HF}} = 0.5$  Hz, 1H,  $H_4$  Py), 5.11 (br s, 1H, *NHBoc*), 3.64 (dt,  $J = 6.0, 6.0$  Hz, 2H,  $\text{NHCH}_2\text{CH}_2$ ), 3.18 (t,  $J = 6.0$  Hz, 2H,  $\text{NHCH}_2\text{CH}_2$ ), 1.41 (s, 9H,  $\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ); **RMN-<sup>13</sup>C** (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  161.2 (s,  $\text{CO}_2\text{tBu}$ ), 156.0 (s,  $\text{C}_2$  Py), 143.9 (q,  $^3J_{\text{CF}} = 3.9$  Hz,  $\text{C}_6$  Py), 133.8 (q,  $^3J_{\text{CF}} = 3.5$  Hz,  $\text{C}_4$  Py), 132.0 (s,  $\text{C}_3$  Py), 125.9 (q,  $^2J_{\text{CF}} = 33.3$  Hz,  $\text{C}_5$  Py), 122.9 (q,  $^1J_{\text{CF}} = 272.5$  Hz,  $\text{CF}_3$ ), 79.4 (s,  $\text{CMe}_3$ ), 37.9 (s,  $\text{NHCH}_2\text{CH}_2$ ), 35.5 (s,  $\text{NHCH}_2\text{CH}_2$ ), 28.5 (s,  $\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ); **RMN-<sup>19</sup>F** (282 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  -62.72 (s,  $\text{CF}_3$ ); **EMAR** (TOF, ES+)  $m/z$  calculada para  $\text{C}_{13}\text{H}_{17}^{35}\text{ClF}_3\text{N}_2\text{O}_2$  [ $\text{M}+\text{H}$ ]<sup>+</sup> 325.0925, encontrada 325.0939.



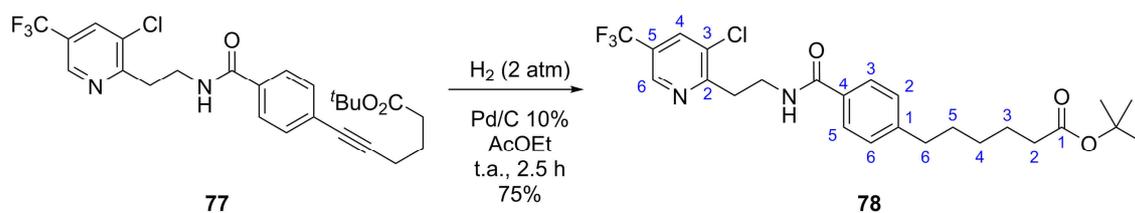
**Hidrocloreuro de 2-(3-cloro-5-(trifluorometil)piridin-2-il)etan-1-amina (55)**. A una disolución del carbamato **75** (34.2 mg, 0.11 mmol) en una mezcla THF/MeOH 5:1 (1.3





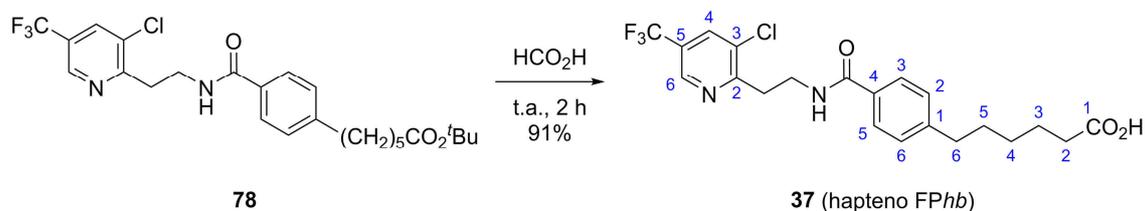
**6-(4-((2-(3-Cloro-5-(trifluorometil)piridin-2-il)etil)carbamoil)fenil)hex-5-inoato de *tert*-butilo (77)**. Una disolución de PyAOP (113.5 mg, 0.22 mmol) en DMF anhidra (0.8 mL) se añadió gota a gota bajo atmósfera de N<sub>2</sub> sobre una disolución del hidrocloreuro **55** (43.7 mg, 0.17 mmol), el ácido **76** (48.3 mg, 0,17 mmol) y DIPEA (87 µL, 0.50 mmol) en DMF anhidra (0.8 mL). La disolución marrón resultante se agitó a temperatura ambiente durante 1.5 h (reacción monitorizada mediante CCF, hexano/AcOEt 3:2). Transcurrido dicho tiempo, la mezcla se diluyó en agua y se extrajo con AcOEt. Las fases orgánicas reunidas se lavaron con LiCl acuoso al 1.5% y con salmuera, se secaron sobre MgSO<sub>4</sub> anhidro, se filtraron y se evaporaron a vacío. El crudo se purificó mediante cromatografía flash en columna (gel de sílice, hexano/AcOEt 9:1), obteniéndose la amida **77** como un sólido blanco (70 mg, 84%).

Datos físicos y espectroscópicos: **Pf.** 102.3–103.1 °C (hexano/AcOEt); **IR** (puro)  $\nu_{\text{máx}}$  (cm<sup>-1</sup>) 3335d (ancha), 2984d, 1718f, 1633m, 1534m, 1326f, 1150f, 1128f, 1094m, 848m; **RMN-<sup>1</sup>H** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  8.72 (dq, <sup>4</sup>J<sub>HH</sub> = 2.0 Hz, <sup>4</sup>J<sub>HF</sub> = 0.8 Hz, 1H, H<sub>6</sub> Py), 7.90 (dq, <sup>4</sup>J<sub>HH</sub> = 2.0 Hz, <sup>4</sup>J<sub>HF</sub> = 0.6 Hz, 1H, H<sub>4</sub> Py), 7.65 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H, H<sub>3</sub> y H<sub>5</sub> Ph), 7.41 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H, H<sub>2</sub> y H<sub>6</sub> Ph), 7.11 (t, *J* = 6.0 Hz, 1H, CONH), 3.96 (dt, *J* = 6.0, 6.0 Hz, 2H, NHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 3.29 (t, *J* = 6.0 Hz, 2H, NHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 2.47 (t, *J* = 7.2 Hz, 2H, H<sub>4</sub>), 2.39 (t, *J* = 7.2 Hz, 2H, H<sub>2</sub>), 1.88 (tt, *J* = 7.2, 7.2 Hz, 2H, H<sub>3</sub>), 1.44 (s, 9H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>); **RMN-<sup>13</sup>C** (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  172.6 (s, C<sub>1</sub>), 166.8 (s, CONH), 161.3 (q, <sup>5</sup>J<sub>CF</sub> = 1.0 Hz, C<sub>2</sub> Py), 143.8 (q, <sup>3</sup>J<sub>CF</sub> = 4.0 Hz, C<sub>6</sub> Py), 134.1 (q, <sup>3</sup>J<sub>CF</sub> = 3.6 Hz, C<sub>4</sub> Py), 133.5 (s, C<sub>4</sub> Ph), 132.1 (s, C<sub>3</sub> Py), 131.8 (s, C<sub>2</sub> y C<sub>6</sub> Ph), 127.3 (s, C<sub>1</sub> Ph), 126.9 (s, C<sub>3</sub> y C<sub>5</sub> Ph), 126.1 (q, <sup>2</sup>J<sub>CF</sub> = 33.8 Hz, C<sub>5</sub> Py), 122.8 (q, <sup>1</sup>J<sub>CF</sub> = 272.9 Hz, CF<sub>3</sub>), 92.0 (s, C<sub>5</sub>), 80.7 (s, CMe<sub>3</sub>), 80.5 (s, C<sub>6</sub>), 37.2 (s, NHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 34.6 (s, C<sub>2</sub>), 34.6 (s, NHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 28.2 (s, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 24.1 (s, C<sub>3</sub>), 19.0 (s, C<sub>4</sub>); **EMAR** (TOF, ES+) *m/z* calculada para C<sub>25</sub>H<sub>27</sub><sup>35</sup>ClF<sub>3</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub> [M+H]<sup>+</sup> 495.1657, encontrada 495.1670.



**6-(4-((2-(3-Cloro-5-(trifluorometil)piridin-2-il)etil)carbamoil)fenil)hexanoato de *terc*-butilo (78).** Una suspensión del alquino **77** (40 mg, 81  $\mu\text{mol}$ ) y Pd/C al 10% (20.6 mg, 19  $\mu\text{mol}$  Pd) en AcOEt anhidro (1.1 mL) se introdujo en un reactor equipado con agitación magnética y se hidrogenó a temperatura ambiente durante 2.5 h bajo una presión de  $\text{H}_2$  de 2 atm. Transcurrido dicho tiempo, el reactor se despresurizó y la suspensión negra se filtró a través de gel de sílice, lavando con AcOEt, y se evaporó el filtrado a vacío. Se obtuvo así el compuesto hidrogenado **78** (30.3 mg, 75%) como un aceite amarillo que se utilizó en la siguiente etapa sin purificación adicional.

**Datos físicos y espectroscópicos:** IR (puro)  $\nu_{\text{máx}}$  ( $\text{cm}^{-1}$ ) 3322d (ancha), 2929d, 1725f, 1629f, 1537m, 1336f, 1234m, 1124f, 1018m, 849m; **RMN- $^1\text{H}$**  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  8.74 (dq,  $^4J_{\text{HH}} = 1.5$  Hz,  $^4J_{\text{HF}} = 0.7$  Hz, 1H,  $H_6$  Py), 7.91 (dq,  $^4J_{\text{HH}} = 1.5$  Hz,  $^4J_{\text{HF}} = 0.5$  Hz, 1H,  $H_4$  Py), 7.65 (d,  $J = 8.2$  Hz, 2H,  $H_3$  y  $H_5$  Ph), 7.21 (d,  $J = 8.2$  Hz, 2H,  $H_2$  y  $H_6$  Ph), 7.02 (t,  $J = 5.9$  Hz, 1H, CONH), 3.98 (dt,  $J = 5.9, 5.9$  Hz, 2H,  $\text{NHCH}_2\text{CH}_2$ ), 3.31 (t,  $J = 5.9$  Hz, 2H,  $\text{NHCH}_2\text{CH}_2$ ), 2.63 (t,  $J = 7.6$  Hz, 2H,  $H_6$ ), 2.19 (t,  $J = 7.5$  Hz, 2H,  $H_2$ ), 1.62 (tt,  $J = 7.6, 7.6$  Hz, 2H,  $H_5$ ), 1.60 (tt,  $J = 7.5, 7.5$  Hz, 2H,  $H_3$ ), 1.42 (s, 9H,  $\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ), 1.39–1.29 (m, 2H,  $H_4$ ); **RMN- $^{13}\text{C}$**  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  173.3 (s,  $\text{C}_1$ ), 167.4 (s, CONH), 161.4 (s,  $\text{C}_2$  Py), 146.6 (s,  $\text{C}_1$  Ph), 143.8 (q,  $^3J_{\text{CF}} = 4.1$  Hz,  $\text{C}_6$  Py), 134.0 (q,  $^3J_{\text{CF}} = 3.3$  Hz,  $\text{C}_4$  Py), 132.2 (s,  $\text{C}_4$  Ph), 132.1 (s,  $\text{C}_3$  Py), 128.7 (s,  $\text{C}_2$  y  $\text{C}_6$  Py), 127.1 (s,  $\text{C}_3$  y  $\text{C}_5$  Py), 126.1 (q,  $^2J_{\text{CF}} = 33.9$  Hz,  $\text{C}_5$  Py), 122.9 (q,  $^1J_{\text{CF}} = 272.3$  Hz,  $\text{CF}_3$ ), 80.2 (s,  $\text{CMe}_3$ ), 37.1 (s,  $\text{NHCH}_2\text{CH}_2$ ), 35.7 (s,  $\text{C}_6$ ), 35.6 (s,  $\text{C}_2$ ), 34.7 (s,  $\text{NHCH}_2\text{CH}_2$ ), 31.0 (s,  $\text{C}_5$ ), 28.7 (s,  $\text{C}_4$ ), 28.2 (s,  $\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ), 25.0 (s,  $\text{C}_3$ ); **RMN- $^{19}\text{F}$**  (282 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  -62.69 (s,  $\text{CF}_3$ ); **EMAR** (TOF, ES+)  $m/z$  calculada para  $\text{C}_{25}\text{H}_{31}^{35}\text{ClF}_3\text{N}_2\text{O}_3$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  499.1970, encontrada 499.1975.



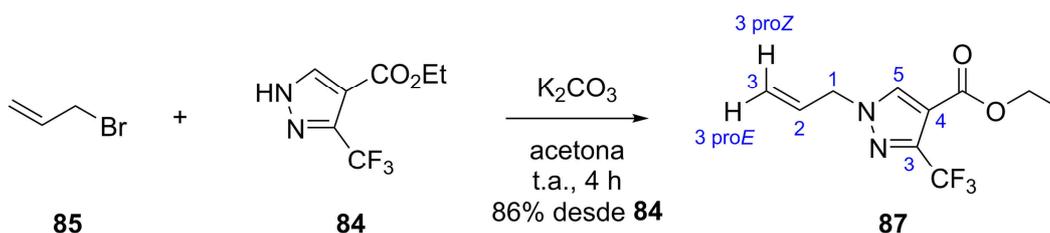
**Ácido 6-(4-((2-(3-cloro-5-(trifluorometil)piridin-2-il)etil)carbamoil)fenil)hexanoico (hapteno FPhb, 37).** Una disolución del éster *terc*-butílico **78** (37.7 mg, 76  $\mu\text{mol}$ ) en ácido fórmico (1.4 mL) se agitó a temperatura ambiente durante 2 h (reacción

monitorizada mediante CCF, CHCl<sub>3</sub>/MeOH 19:1). Transcurrido dicho tiempo, la mezcla se diluyó en CHCl<sub>3</sub> y el disolvente se evaporó a vacío, repitiendo hasta eliminar todo el ácido fórmico. Se obtuvo así el hapteno FPhb (**37**, 30.5 mg, 91%) como un sólido blanco que no requirió purificación adicional.

**Datos físicos y espectroscópicos:** **Pf.** 131.3–132.1 °C (CHCl<sub>3</sub>); **IR** (puro)  $\nu_{\text{máx}}$  (cm<sup>-1</sup>) 3298d (ancha), 2938d, 1698m, 1630f, 1541m, 1320f, 1170m, 1129f, 1054m, 909m; **RMN-<sup>1</sup>H** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  9.62 (br s, 1H, CO<sub>2</sub>H), 8.72 (d,  $J = 1.9$  Hz, 1H, H<sub>6</sub> Py), 7.91 (d,  $J = 1.9$  Hz, 1H, H<sub>4</sub> Py), 7.65 (d,  $J = 8.2$  Hz, 2H, H<sub>3</sub> y H<sub>5</sub> Ph), 7.20 (d,  $J = 8.2$  Hz, 2H, H<sub>2</sub> y H<sub>6</sub> Ph), 7.13 (t,  $J = 6.0$  Hz, 1H, CONH), 3.96 (dt,  $J = 6.0, 6.0$  Hz, 2H, NHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 3.30 (t,  $J = 6.0$  Hz, 2H, NHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 2.63 (t,  $J = 7.5$  Hz, 2H, H<sub>6</sub>), 2.33 (t,  $J = 7.5$  Hz, 2H, H<sub>2</sub>), 1.65 (tt,  $J = 7.5, 7.5$  Hz, 2H, H<sub>3</sub>), 1.62 (tt,  $J = 7.5, 7.5$  Hz, 2H, H<sub>5</sub>), 1.43–1.30 (m, 2H, H<sub>4</sub>); **RMN-<sup>13</sup>C** (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  178.9 (s, C<sub>1</sub>), 167.6 (s, CONH), 161.3 (s, C<sub>2</sub> Py), 146.5 (s, C<sub>1</sub> Ph), 143.7 (q,  $^3J_{\text{CF}} = 3.9$  Hz, C<sub>6</sub> Py), 134.1 (q,  $^3J_{\text{CF}} = 3.4$  Hz, C<sub>4</sub> Py), 132.2 (s, C<sub>4</sub> Ph), 132.1 (s, C<sub>3</sub> Py), 128.7 (s, C<sub>2</sub> y C<sub>6</sub> Ph), 127.1 (s, C<sub>3</sub> y C<sub>5</sub> Ph), 126.1 (q,  $^2J_{\text{CF}} = 33.8$  Hz, C<sub>5</sub> Py), 122.8 (q,  $^1J_{\text{CF}} = 273.0$  Hz, CF<sub>3</sub>), 37.2 (s, NHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 35.6 (s, C<sub>6</sub>), 34.6 (s, NHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 34.0 (s, C<sub>2</sub>), 30.9 (s, C<sub>5</sub>), 28.7 (s, C<sub>4</sub>), 24.6 (s, C<sub>3</sub>); **RMN-<sup>19</sup>F** (282 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  -62.69 (s, CF<sub>3</sub>); **EMAR** (TOF, ES+)  $m/z$  calculada para C<sub>21</sub>H<sub>23</sub><sup>35</sup>ClF<sub>3</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub> [M+H]<sup>+</sup> 443.1344, encontrada 443.1354.

## 5.4. Síntesis de haptenos para penthiopyrad

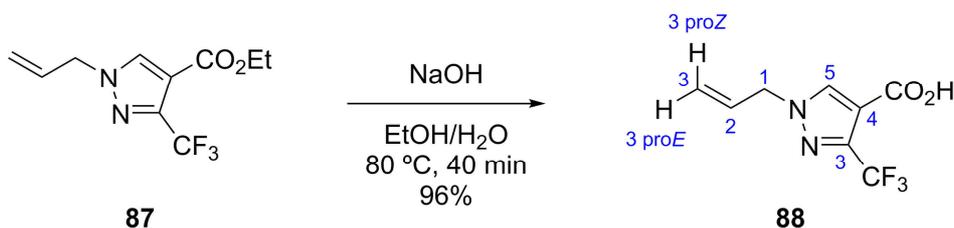
### 5.4.1. Síntesis del hapteno PPa



**1-Alil-3-(trifluorometil)-1H-pirazol-4-carboxilato de etilo (87).** A una suspensión de 3-(trifluorometil)-1H-pirazol-4-carboxilato de etilo (**84**, 500 mg, 2.40 mmol) en acetona anhidra (5.4 mL) bajo atmósfera de N<sub>2</sub> se añadió K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (498 mg, 3.60 mmol) y bromuro de alilo (**85**, 311  $\mu$ L, 3.60 mmol). La mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante 4 h (reacción monitorizada por CCF, hexano/AcOEt 7:3). Transcurrido dicho tiempo la mezcla se diluyó en agua y se extrajo con AcOEt. Las fases orgánicas reunidas

se lavaron con salmuera, se secaron sobre  $\text{MgSO}_4$  anhidro, se filtraron y se evaporaron a vacío. El producto crudo, que contenía una mezcla de **87** y su regioisómero alquilado en N-2 en proporción 40:1, se purificó mediante cromatografía flash en columna (gel de sílice, hexano/AcOEt 9:1), obteniéndose el derivado alílico **87** (513.2 mg, 86%) como un sólido blanco [lit.,<sup>207</sup> sólido amarillo].

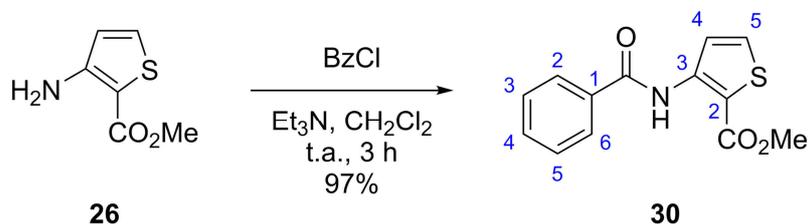
Datos físicos y espectroscópicos:<sup>207</sup> **Pf.** 54.4–55.0 °C (hexano); **IR** (KBr)  $\nu_{\text{máx}}$  ( $\text{cm}^{-1}$ ) 3420d, 3159m, 2995m, 2937m, 1908d, 1728f, 1541f, 1308f, 1059f, 861f, 775f; **RMN-<sup>1</sup>H** (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  7.99 (q,  $^5J_{\text{HF}} = 0.9$  Hz, 1H,  $H_5$  Pz), 6.01 (ddt,  $J = 16.4, 10.2, 6.2$  Hz, 1H,  $\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}_2$ ), 5.38 (ddt,  $J = 10.2, 2.1, 1.1$  Hz, 1H,  $H_3$  proE), 5.32 (ddt,  $J = 16.4, 2.2, 1.2$  Hz, 1H,  $H_3$  proZ), 4.78 (ddd,  $J = 6.2, 1.2, 1.1$  Hz, 2H,  $\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}_2$ ), 4.30 (q,  $J = 7.1$  Hz, 2H,  $\text{CH}_2\text{CH}_3$ ), 1.33 (t,  $J = 7.1$  Hz, 3H,  $\text{CH}_2\text{CH}_3$ ); **RMN-<sup>13</sup>C** (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  160.9 (s,  $\text{CO}_2\text{Et}$ ), 141.7 (q,  $^2J_{\text{CF}} = 38.4$  Hz,  $C_3$  Pz), 135.3 (s,  $C_5$  Pz), 130.9 (s,  $\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}_2$ ), 121.0 (s,  $\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}_2$ ), 120.5 (q,  $^1J_{\text{CF}} = 269.6$  Hz,  $\text{CF}_3$ ), 113.6 (s,  $C_4$  Pz), 61.0 (s,  $\text{CH}_2\text{CH}_3$ ), 55.7 (s,  $\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}_2$ ), 14.2 (s,  $\text{CH}_2\text{CH}_3$ ); **RMN-<sup>19</sup>F** (282 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  -62.49 (s,  $\text{CF}_3$ ); **EMAR** (TOF, ES+)  $m/z$  calculada para  $\text{C}_{10}\text{H}_{12}\text{F}_3\text{N}_2\text{O}_2$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  249.0845, encontrada 249.0845.



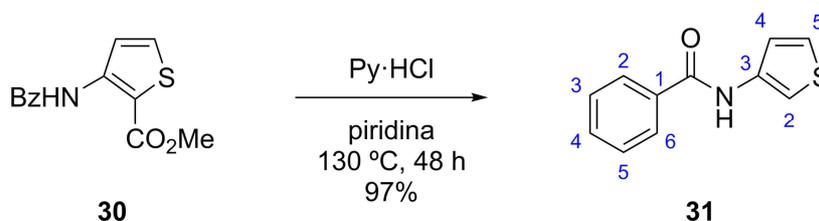
**Ácido 1-alil-3-(trifluorometil)-1H-pirazol-4-carboxílico (88).** Una mezcla del éster etílico **87** (450 mg, 1.81 mmol), NaOH 1 M en agua (3.6 mL, 3.62 mmol) y EtOH (5 mL) se calentó a reflujo (85 °C) durante 30 min (reacción monitorizada mediante CCF, hexano/AcOEt 7:3). Transcurrido dicho tiempo la mezcla se enfrió en un baño de hielo y agua, se acidificó hasta pH 2 con HCl concentrado y se extrajo con AcOEt. Las fases orgánicas reunidas se lavaron con salmuera, se secaron sobre  $\text{MgSO}_4$  anhidro, se filtraron y se evaporaron a vacío. Se obtuvo así el ácido **88** (399.3 mg, 96%) como un sólido blanco que se empleó en la siguiente etapa sin purificación adicional.

Datos físicos y espectroscópicos: **Pf.** 139.6–140.3 °C (hexano/ $\text{CHCl}_3$ ); **IR** (KBr)  $\nu_{\text{máx}}$  ( $\text{cm}^{-1}$ ) 3158f, 2988f, 2600f, 1701f, 1541f, 1317f, 1151f, 1053f, 875f, 743f; **RMN-<sup>1</sup>H** (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  10.52 (br s, 1H,  $\text{CO}_2\text{H}$ ), 8.06 (q,  $^5J_{\text{HF}} = 0.6$  Hz, 1H,  $H_5$  Pz), 6.02 (ddt,  $J = 16.7, 10.2, 6.3$  Hz, 1H,  $\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}_2$ ), 5.41 (ddt,  $J = 10.2, 2.1, 1.1$  Hz, 1H,  $H_3$  proE), 5.35 (ddt,  $J = 16.7, 2.1, 1.4$  Hz, 1H,  $H_3$  proZ), 4.81 (ddd,  $J = 6.3, 1.4, 1.1$  Hz, 2H,  $\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}_2$ ); **RMN-<sup>13</sup>C** (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  166.4 (s,  $\text{CO}_2\text{H}$ ), 142.4 (q,  $^2J_{\text{CF}} = 38.7$  Hz,  $C_3$  Pz), 136.3 (s,  $C_5$

Pz), 130.6 (s, CH<sub>2</sub>CH=CH<sub>2</sub>), 121.3 (s, CH<sub>2</sub>CH=CH<sub>2</sub>), 120.3 (q, <sup>1</sup>J<sub>CF</sub> = 269.8 Hz, CF<sub>3</sub>), 112.6 (s, C<sub>4</sub> Pz), 55.8 (s, CH<sub>2</sub>CH=CH<sub>2</sub>); **RMN-<sup>19</sup>F** (282 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ -62.65 (s, CF<sub>3</sub>); **EMAR** (TOF, ES+) *m/z* calculada para C<sub>8</sub>H<sub>8</sub>F<sub>3</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub> [M+H]<sup>+</sup> 221.0532, encontrada 221.0523.

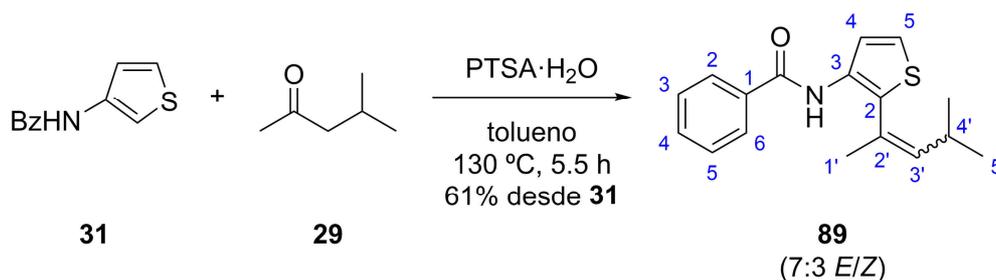


**3-Benzamidotiofeno-2-carboxilato de metilo (30).** A una suspensión de 3-aminotiofeno-2-carboxilato de metilo (**26**, 1.5 g, 9.54 mmol) y trietilamina (1.6 mL, 11.26 mmol) en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> anhidro (10 mL) a 5 °C bajo atmósfera de N<sub>2</sub> se añadió gota a gota cloruro de benzoilo (1.2 mL, 10.02 mmol). La mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante 3 h (reacción monitorizada por CCF, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>). Transcurrido dicho tiempo la mezcla se diluyó en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, se lavó con NaHCO<sub>3</sub> acuoso al 5% y con salmuera, se secó sobre MgSO<sub>4</sub> anhidro, se filtró y el disolvente se evaporó a vacío. El producto crudo se purificó mediante cromatografía flash en columna (gel de sílice, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>), obteniéndose la benzamida **30** (2.409 g, 97%) como un sólido amarillo pálido [lit.,<sup>211</sup> sólido blanco]. Este compuesto se ha descrito previamente (CAS nº 79128-70-4), coincidiendo las propiedades espectroscópicas observadas con las ya descritas.<sup>38,210,211</sup>



**N-(Tiofen-3-il)benzamida (31).** Una suspensión del éster metílico **30** (800 mg, 3.06 mmol) y cloruro de piridinio (1.06 g, 9.19 mmol) en piridina anhidra (8.5 mL) se calentó a reflujo (130 °C) con agitación bajo atmósfera de N<sub>2</sub> durante 48 h (reacción monitorizada mediante CCF, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>). Posteriormente la mezcla se vertió sobre hielo, se acidificó con HCl concentrado hasta pH 2 y se extrajo con AcOEt. Las fases orgánicas reunidas se lavaron con salmuera, se secaron sobre MgSO<sub>4</sub> anhidro, se filtraron y se evaporaron a vacío. Se obtuvo así el compuesto **31** (602.1 mg, 97%) como un sólido marrón pálido que se empleó en la siguiente etapa sin purificación adicional.

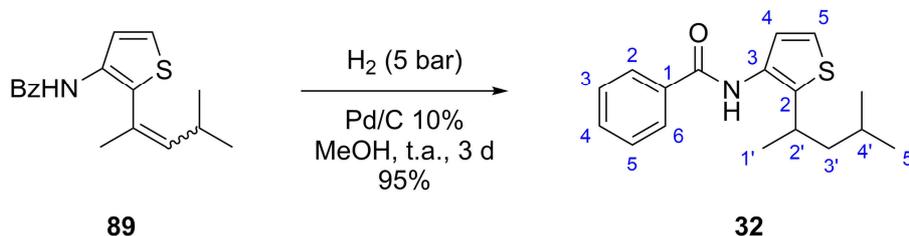
Datos físicos y espectroscópicos:<sup>38,210</sup> **Pf.** 145.0–146.8 °C (CHCl<sub>3</sub>) [lit., pf 153 °C]; **IR** (KBr)  $\nu_{\text{máx}}$  (cm<sup>-1</sup>) 3332d, 3140d, 3112d, 3052d, 2927d, 1652m, 1570m, 1284m, 771m; **RMN-<sup>1</sup>H** (300 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$  7.93–7.87 (m, 2H, *H*<sub>2</sub> y *H*<sub>6</sub> Ph), 7.69 (dd, *J* = 3.2, 1.3 Hz, 1H, *H*<sub>2</sub> Th), 7.58–7.43 (m, 3H, *H*<sub>3</sub>, *H*<sub>4</sub> y *H*<sub>5</sub> Ph), 7.33 (dd, *J* = 5.2, 3.2 Hz, 1H, *H*<sub>5</sub> Th), 7.25 (dd, *J* = 5.2, 1.3 Hz, 1H, *H*<sub>4</sub> Th); **RMN-<sup>13</sup>C** (75 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$  167.9 (s, CONH), 137.8 (s, C<sub>3</sub> Th), 135.8 (s, C<sub>1</sub> Ph), 132.9 (s, C<sub>4</sub> Ph), 129.7 (s, C<sub>3</sub> y C<sub>5</sub> Ph), 128.5 (s, C<sub>2</sub> y C<sub>6</sub> Ph), 125.2 (s, C<sub>5</sub> Th), 123.0 (s, C<sub>4</sub> Th), 111.8 (s, C<sub>2</sub> Th); **EMAR** (TOF, ES+) *m/z* calculada para C<sub>11</sub>H<sub>10</sub>NOS [M+H]<sup>+</sup> 204.0478, encontrada 204.0474.



***N*-(2-(4-Metilpent-2-en-2-il)tiofen-3-il)benzamida (89).** A una suspensión del compuesto **31** (550 mg, 2.71 mmol) y monohidrato de PTSA (257.4 mg, 1.35 mmol) en tolueno bajo atmósfera de N<sub>2</sub> se añadió 4-metilpentan-2-ona (**29**, 1.02 mL, 8.12 mmol). La mezcla resultante se calentó a reflujo (130 °C) durante 5.5 h, eliminando el agua formada mediante una trampa Dean–Stark (reacción monitorizada mediante CCF, hexano/AcOEt 4:1). Transcurrido dicho tiempo, la mezcla se atemperó, se diluyó en benceno y se lavó con NaOH acuoso 1 M. La fase orgánica se lavó con salmuera, se secó sobre MgSO<sub>4</sub> anhidro, se filtró y se evaporó a vacío. El producto crudo se purificó mediante cromatografía flash en columna (gel de sílice, hexano/AcOEt 19:1), obteniéndose el alqueno **89** (473.3 mg, 61%) como un sólido amarillo [lit.,<sup>38</sup> cristales incoloros] cuyo espectro de RMN-<sup>1</sup>H mostró ser una mezcla 7:3 de isómeros *E/Z*.

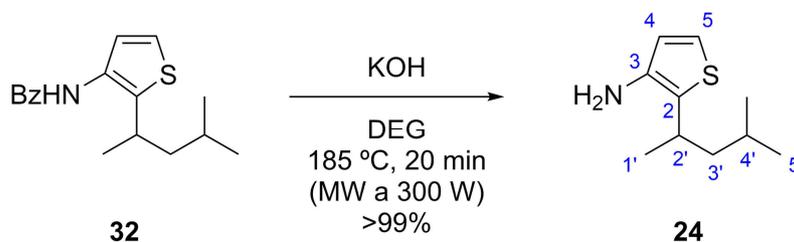
Datos físicos y espectroscópicos:<sup>38</sup> **Pf.** 79.2–80.9 °C (hexano); **IR** (KBr)  $\nu_{\text{máx}}$  (cm<sup>-1</sup>) 3270f, 2958f, 1649f, 1515f, 1490f, 1288f, 714m, 690m; **RMN-<sup>1</sup>H** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  8.27 (s, 1H, CONH), 7.94 (d, *J* = 5.5 Hz, 1H, *H*<sub>4</sub> Th), 7.88–7.79 (m, 2H, *H*<sub>2</sub> y *H*<sub>6</sub> Ph), 7.58–7.44 (m, 3H, *H*<sub>3</sub>, *H*<sub>4</sub> y *H*<sub>5</sub> Ph), 7.19 (d, *J* = 5.5 Hz, 1H, *H*<sub>5</sub> Th), 5.57 (dq, *J* = 9.3, 1.4 Hz, 1H, *H*<sub>3'</sub>), 2.75 (d spt, *J* = 9.3, 6.7 Hz, 1H, *H*<sub>4'</sub>), 2.05 (d, *J* = 1.4 Hz, 3H, *H*<sub>1'</sub>), 1.07 (d, *J* = 6.7 Hz, 6H, CH<sub>3</sub>-4' y *H*<sub>5'</sub>); **RMN-<sup>13</sup>C** (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  164.1 (s, CONH), 139.7 (s, C<sub>3'</sub>), 134.7 (s, C<sub>1</sub> Ph), 131.9 (s, C<sub>4</sub> Ph), 131.3 (s, C<sub>3</sub> Th), 128.9 (s, C<sub>3</sub> y C<sub>5</sub> Ph), 127.0 (s, C<sub>2</sub> y C<sub>6</sub> Ph), 126.4 (s, C<sub>2</sub> Th), 124.5 (s, C<sub>2'</sub>), 123.1 (s, C<sub>4</sub> Th), 122.3 (s, C<sub>5</sub> Th), 28.1 (s, C<sub>4'</sub>), 23.1 (s,

CH<sub>3</sub>-4' y C<sub>5'</sub>), 19.0 (s, C<sub>1'</sub>); **EMAR** (TOF, ES+) *m/z* calculada para C<sub>17</sub>H<sub>20</sub>NOS [M+H]<sup>+</sup> 286.1260, encontrada 286.1260.



***N*-(2-(4-Metilpentan-2-il)tiofen-3-il)benzamida (32)**. Una suspensión de alqueno **89** (400 mg, 1.40 mmol) y Pd/C al 10% (246.1 mg, 0.23 mmol Pd) en MeOH anhidro (10.2 mL) se introdujo en un reactor equipado con agitación magnética y se hidrogenó a temperatura ambiente durante 3 días bajo una presión de H<sub>2</sub> de 5 bar. Posteriormente el reactor se despresurizó y la suspensión negra se filtró a través de celite, lavando con MeOH. Finalmente, el disolvente se evaporó a vacío, obteniéndose el compuesto **32** (382.2 mg, 95%) como un sólido blanco [lit.,<sup>38</sup> cristales incoloros] que se empleó en la siguiente etapa sin purificación adicional.

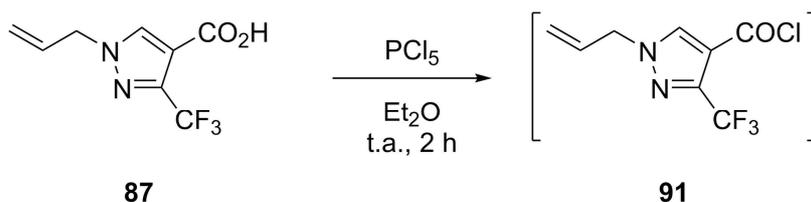
Datos físicos y espectroscópicos:<sup>38</sup> **Pf.** 104.1–105.0 °C (CHCl<sub>3</sub>); **IR** (KBr)  $\nu_{\text{máx}}$  (cm<sup>-1</sup>) 3296f, 2958m, 2927d, 1648f, 1518m, 1486m, 1286m, 704m, 689d; **RMN-<sup>1</sup>H** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  7.85 (d, *J* = 7.1 Hz, 2H, H<sub>2</sub> y H<sub>6</sub> Ph), 7.65 (br s, 1H, CONH), 7.58–7.44 (m, 3H, H<sub>3</sub>, H<sub>4</sub> y H<sub>5</sub> Ph), 7.41 (d, *J* = 5.4 Hz, 1H, H<sub>4</sub> Th), 7.13 (d, *J* = 5.4 Hz, 1H, H<sub>5</sub> Th), 3.13 (ddq, *J* = 6.9, 6.9, 6.9 Hz, 1H, H<sub>2'</sub>), 1.66–1.37 (m, 3H, H<sub>3'</sub> y H<sub>4'</sub>), 1.30 (d, *J* = 6.9 Hz, 3H, H<sub>1'</sub>), 0.89 (d, *J* = 6.3 Hz, 6H, CH<sub>3</sub>-4' y H<sub>5'</sub>); **RMN-<sup>13</sup>C** (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  165.5 (s, CONH), 139.5 (s, C<sub>3</sub> Th), 134.7 (s, C<sub>1</sub> Ph), 131.9 (s, C<sub>4</sub> Ph), 130.4 (s, C<sub>2</sub> Th), 128.9 (s, C<sub>3</sub> y C<sub>5</sub> Ph), 127.2 (s, C<sub>2</sub> y C<sub>6</sub> Ph), 124.6 (s, C<sub>4</sub> Th), 121.2 (s, C<sub>5</sub> Th), 48.6 (s, C<sub>3'</sub>), 30.6 (s, C<sub>2'</sub>), 25.8 (s, C<sub>4'</sub>), 23.1 (s, C<sub>1'</sub>), 22.9 (s, CH<sub>3</sub>-4'), 22.7 (s, C<sub>5'</sub>); **EMAR** (TOF, ES+) *m/z* calculada para C<sub>17</sub>H<sub>22</sub>NOS [M+H]<sup>+</sup> 288.1417, encontrada 288.1414.



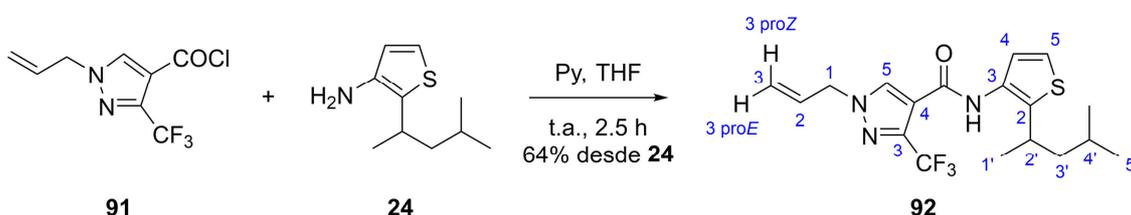
**2-(4-Metilpentan-2-il)tiofen-3-amina (24)**. Una mezcla de KOH (880 mg, 15.68 mmol), la amida **32** (200 mg, 0.70 mmol) y DEG (20 mL) se introdujo en un tubo de microondas. Dicha mezcla se calentó con agitación en horno microondas a 185 °C (300

W) durante 20 min. Transcurrido dicho tiempo, la mezcla se diluyó la mezcla en agua y se extrajo con AcOEt. Las fases orgánicas reunidas se lavaron con salmuera, se secaron sobre  $\text{MgSO}_4$  anhidro, se filtraron y se evaporaron a vacío. El producto crudo se purificó mediante cromatografía flash en columna (gel de sílice, hexano/ $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  3:7), obteniéndose la amina **24** (127.0 mg, >99%) como un aceite amarillento [lit.,<sup>31</sup> aceite amarillo].

**Datos físicos y espectroscópicos:**<sup>31,38</sup> **IR** (KBr)  $\nu_{\text{máx}}$  ( $\text{cm}^{-1}$ ) 3432m, 3348m, 2956f, 2926f, 2868m, 1656d, 1567f, 1459d, 1258d, 718m, 637m; **RMN-<sup>1</sup>H** (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  6.95 (dd,  $J = 5.3$  Hz, 1H,  $H_4$  Th), 6.55 (d,  $J = 5.3$  Hz, 1H,  $H_5$  Th), 3.34 (br s, 2H,  $\text{NH}_2$ ), 2.95 (ddq,  $J = 7.0$  Hz, 1H,  $H_{2'}$ ), 1.69–1.35 (m, 3H,  $H_{3'}$  y  $H_{4'}$ ), 1.24 (d,  $J = 6.8$  Hz, 3H,  $H_{1'}$ ), 0.91 (d,  $J = 6.5$  Hz, 3H,  $H_{5'}$ ), 0.90 (d,  $J = 6.4$  Hz, 3H,  $\text{CH}_3\text{-}4'$ ); **RMN-<sup>13</sup>C** (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  139.0 (s,  $C_3$  Th), 125.5 (s,  $C_2$  Th), 121.8 (s,  $C_5$  Th), 120.7 (s,  $C_4$  Th), 48.2 (s,  $C_{3'}$ ), 29.8 (s,  $C_{2'}$ ), 25.9 (s,  $C_{4'}$ ), 22.9 (s,  $C_{4''}$  y  $C_{5'}$ ), 22.7 (s,  $C_{1'}$ ); **EMAR** (GC–MS, IE)  $m/z$  calculada para  $\text{C}_{10}\text{H}_{17}\text{NS M}^{+\bullet}$  183.1076, encontrada 183.1075.



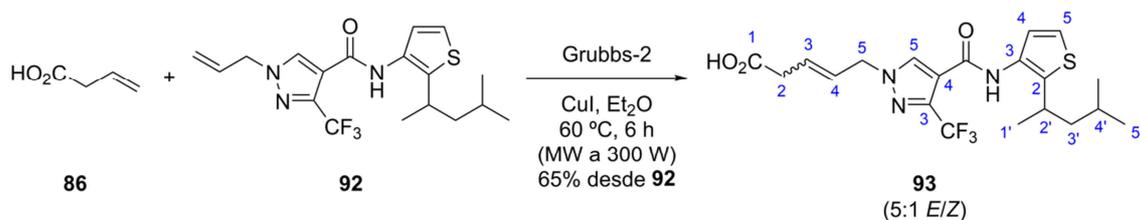
**Cloruro de 1-alil-3-(trifluorometil)-1H-pirazol-4-carbonilo (91).** Una suspensión del ácido **87** (120.1 mg, 0.55 mmol) y  $\text{PCl}_5$  (125 mg, 0.60 mmol) en  $\text{Et}_2\text{O}$  anhidro (1.81 mL) se agitó bajo atmósfera de  $\text{N}_2$  a temperatura ambiente durante 2 h hasta observarse una disolución transparente (reacción monitorizada mediante CCF, hexano/AcOEt 7:3). En este punto, el disolvente se evaporó a vacío para dar lugar a un residuo que contenía el cloruro de acilo intermedio **91**.



**1-Alil-N-(2-(4-metilpentan-2-il)tiofen-3-il)-3-(trifluorometil)-1H-pirazol-4-carboxamida (92).** Una disolución del cloruro de acilo **91** recién preparado en THF anhidro (0.45 mL) se añadió gota a gota bajo atmósfera de  $\text{N}_2$  a una disolución del aminotiofeno **24** (100 mg, 0.55 mmol) y piridina anhidra (88  $\mu\text{L}$ , 1.09 mmol) en THF

anhidro (0.45 mL). La mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante 2.5 h (reacción monitorizada mediante CCF, hexano/AcOEt 7:3). Transcurrido dicho tiempo la mezcla se diluyó en AcOEt y se lavó secuencialmente con disoluciones acuosas de HCl (1 M), NaHCO<sub>3</sub> (5%) y con salmuera. La fase orgánica se secó sobre MgSO<sub>4</sub> anhidro, se filtró y se evaporó a vacío. El producto crudo se purificó mediante cromatografía flash en columna (gel de sílice, hexano/AcOEt 4:1), obteniéndose la amida **92** (135.5 mg, 64%) como un sólido blanco.

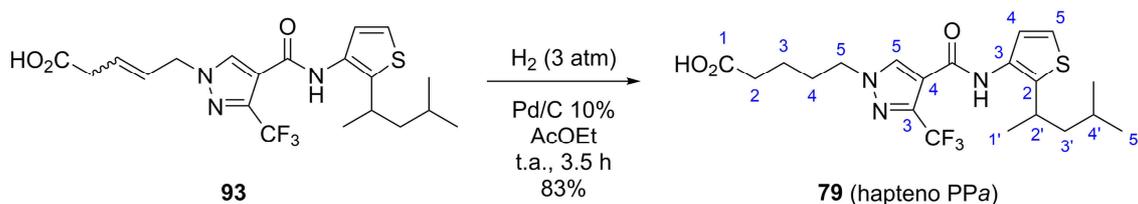
**Datos físicos y espectroscópicos:** Pf. 130.6–131.0 °C (benceno); IR (KBr)  $\nu_{\text{máx}}$  (cm<sup>-1</sup>) 3226m, 3195m, 3126d, 2956m, 1641f, 1566f, 1491m, 1212m, 1142f, 1058f, 896d; **RMN-<sup>1</sup>H** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  8.09 (s, 1H, H<sub>5</sub> Pz), 7.55 (br s, 1H, CONH), 7.42 (d, *J* = 5.4 Hz, 1H, H<sub>4</sub> Th), 7.12 (d, *J* = 5.4 Hz, 1H, H<sub>5</sub> Th), 6.02 (ddt, *J* = 16.6, 10.2, 6.3 Hz, 1H, CH<sub>2</sub>CH=CH<sub>2</sub>), 5.40 (d, *J* = 10.2 Hz, 1H, H<sub>3</sub> proE), 5.35 (d, *J* = 16.6 Hz, 1H, H<sub>3</sub> proZ), 4.79 (d, *J* = 6.3 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>CH=CH<sub>2</sub>), 3.08 (ddq, *J* = 7.0, 7.0, 7.0 Hz, 1H, H<sub>2</sub>'), 1.68–1.38 (m, 3H, H<sub>3</sub>' y H<sub>4</sub>'), 1.25 (d, *J* = 6.8 Hz, 3H, H<sub>1</sub>'), 0.86 (d, *J* = 5.8 Hz, 6H, CH<sub>3</sub>-4' y H<sub>5</sub>'); **RMN-<sup>13</sup>C** (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  158.3 (s, CONH), 139.6 (s, C<sub>3</sub> Th), 137.8 (q, <sup>2</sup>*J*<sub>CF</sub> = 37.6 Hz, C<sub>3</sub> Pz), 135.6 (s, C<sub>5</sub> Pz), 130.8 (s, CH<sub>2</sub>CH=CH<sub>2</sub>), 129.7 (s, C<sub>2</sub> Th), 124.3 (s, C<sub>4</sub> Th), 121.3 (q, <sup>1</sup>*J*<sub>CF</sub> = 269.2 Hz, CF<sub>3</sub>), 121.2 (s, C<sub>5</sub> Th), 121.1 (s, CH<sub>2</sub>CH=CH<sub>2</sub>), 117.5 (s, C<sub>4</sub> Pz), 55.8 (s, CH<sub>2</sub>CH=CH<sub>2</sub>), 48.1 (s, C<sub>3</sub>'), 30.3 (s, C<sub>2</sub>'), 25.8 (s, C<sub>4</sub>'), 23.2 (s, C<sub>1</sub>'), 22.6 (s, CH<sub>3</sub>-4'), 22.5 (s, C<sub>5</sub>'); **RMN-<sup>19</sup>F** (282 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  -59.69 (s, CF<sub>3</sub>); **EMAR** (TOF, ES+) *m/z* calculada para C<sub>18</sub>H<sub>23</sub>F<sub>3</sub>N<sub>3</sub>OS [M+H]<sup>+</sup> 386.1508, encontrada 386.1508.



**Ácido 5-(4-((2-(4-metilpentan-2-il)tiofen-3-il)carbamoil)-3-(trifluorometil)-1H-pirazol-1-il)pent-3-enoico (93).** A una suspensión formada por el alqueno **92** (50 mg, 0.13 mmol), catalizador de Grubbs de 2<sup>a</sup> generación (Grubbs-2, 6.6 mg, 7.78 μmol) y Cul (2.0 mg, 10.38 μmol) en Et<sub>2</sub>O anhidro (1.7 mL), introducida previamente en un tubo de microondas bajo atmósfera de N<sub>2</sub>, se añadió ácido but-3-enoico (**86**, 33 μL, 0.39 mmol). La mezcla resultante se calentó con agitación en horno microondas a 60 °C (300 W) durante 6 horas. Transcurrido dicho tiempo el disolvente se evaporó a vacío, y el residuo se purificó mediante cromatografía flash en columna (gel de sílice). Se eluyó primero con una mezcla CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/Et<sub>2</sub>O 19:1 para recuperar 7.6 mg (15%) de producto de

partida **92**; posteriormente, se eluyó con la misma mezcla en proporción 4:1, obteniéndose el ácido insaturado **93** (37.4 mg, 65%, mezcla 5:1 de isómeros *E/Z* según RMN-<sup>1</sup>H) como un aceite incoloro.

**Datos físicos y espectroscópicos:** IR (KBr)  $\nu_{\text{máx}}$  (cm<sup>-1</sup>) 3262f (ancha), 3126d, 2959f, 1716f, 1652f, 1488f, 1306f, 1143f, 1057f, 974m, 834m, 715m; **RMN-<sup>1</sup>H** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  9.31 (br s, 1H, CO<sub>2</sub>H), 8.16 (s, 1H, H<sub>5</sub> Pz), 7.57 (br s, 1H, CONH), 7.40 (d, *J* = 5.4 Hz, 1H, H<sub>4</sub> Th), 7.12 (d, *J* = 5.4 Hz, 1H, H<sub>5</sub> Th), 5.97 (dt, *J* = 15.6, 6.8 Hz, 1H, H<sub>3</sub>), 5.84 (dt, *J* = 15.6, 6.3 Hz, 1H, H<sub>4</sub>), 4.80 (d, *J* = 6.2 Hz, 1H, H<sub>5</sub>), 3.20 (d, *J* = 6.3 Hz, 1H, H<sub>2</sub>), 3.08 (ddq, *J* = 7.0, 7.0, 7.0 Hz, 1H, H<sub>2'</sub>), 1.66–1.39 (m, 3H, H<sub>3'</sub> y H<sub>4'</sub>), 1.24 (d, *J* = 7.0 Hz, 3H, H<sub>1'</sub>), 0.86 (d, *J* = 6.3 Hz, 6H, CH<sub>3</sub>-4' y H<sub>5'</sub>); **RMN-<sup>13</sup>C** (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  175.5 (s, C<sub>1</sub>), 158.5 (s, CONH), 139.9 (s, C<sub>3</sub> Th), 137.8 (q, <sup>2</sup>*J*<sub>CF</sub> = 43.1 Hz, C<sub>3</sub> Pz), 135.8 (s, C<sub>5</sub> Pz), 129.6 (s, C<sub>2</sub> Th), 129.1 (s, C<sub>3</sub>), 126.9 (s, C<sub>4</sub>), 124.3 (s, C<sub>4</sub> Th), 121.3 (s, C<sub>5</sub> Th), 121.3 (q, <sup>1</sup>*J*<sub>CF</sub> = 270.4 Hz, CF<sub>3</sub>), 117.4 (s, C<sub>4</sub> Pz), 54.9 (s, C<sub>5</sub>), 48.1 (s, C<sub>3'</sub>), 37.1 (s, C<sub>2</sub>), 30.3 (s, C<sub>2'</sub>), 25.8 (s, C<sub>4'</sub>), 23.2 (s, C<sub>1'</sub>), 22.6 (s, CH<sub>3</sub>-4'), 22.5 (s, C<sub>5'</sub>); **RMN-<sup>19</sup>F** (282 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  -59.67 (s, CF<sub>3</sub>); **EMAR** (TOF, ES+) *m/z* calculada para C<sub>20</sub>H<sub>25</sub>F<sub>3</sub>N<sub>3</sub>O<sub>3</sub>S [M+H]<sup>+</sup> 444.1563, encontrada 444.1553.

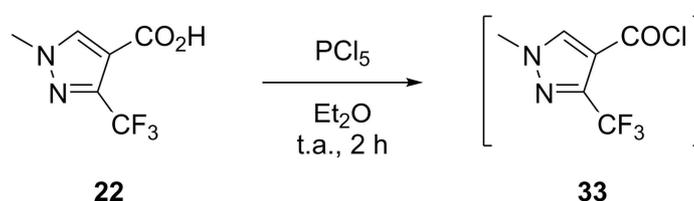


**Ácido 5-(4-((2-(4-metilpentan-2-il)tiofen-3-il)carbamoil)-3-(trifluorometil)-1H-pirazol-1-il)pentanoico (hapteno PPa, 79).** Una suspensión de alqueno **93** (80 mg, 0.18 mmol) y Pd/C al 10% (68 mg, 64  $\mu$ mol Pd) en AcOEt anhidro (4 mL) se introdujo en un reactor equipado con agitación magnética y se hidrogenó a temperatura ambiente durante 3.5 h bajo una presión de H<sub>2</sub> de 3 bar. Posteriormente el reactor se despresurizó, y la mezcla se filtró a través de celite lavando con AcOEt. Tras evaporar el disolvente a vacío, el producto crudo se purificó mediante cromatografía flash en columna (gel de sílice, CHCl<sub>3</sub>/MeOH 49:1), obteniéndose el hapteno PPa (**79**, 66.9 mg, 83%) como un sólido blanco.

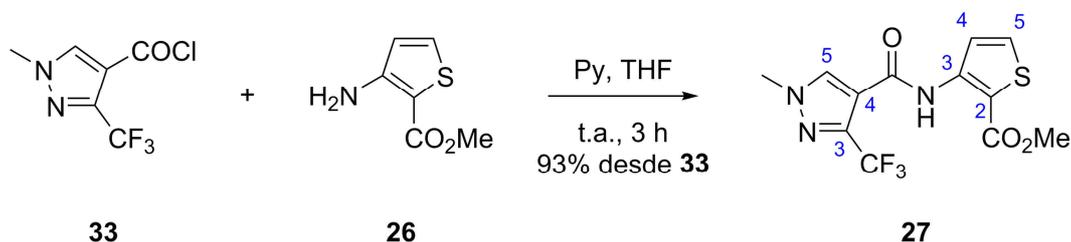
**Datos físicos y espectroscópicos:** Pf. 148.3–149.4 °C (benceno); IR (KBr)  $\nu_{\text{máx}}$  (cm<sup>-1</sup>) 3031m, 2962m, 2261d, 2086d, 1697f, 1408m, 1285m, 1196m, 928d, 689d; **RMN-<sup>1</sup>H** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  9.42 (br s, 1H, CO<sub>2</sub>H), 8.15 (s, 1H, H<sub>5</sub> Pz), 7.62 (br s, 1H, CONH), 7.39 (d, *J* = 5.5 Hz, 1H, H<sub>4</sub> Th), 7.12 (d, *J* = 5.5 Hz, 1H, H<sub>5</sub> Th), 4.19 (t, *J* = 7.0 Hz, 2H, H<sub>5</sub>), 3.09 (ddq, *J* = 6.8, 6.8, 6.8 Hz, 1H, H<sub>2'</sub>), 2.40 (t, *J* = 7.1 Hz, 2H, H<sub>2</sub>), 2.05–1.88 (m, 2H, H<sub>4</sub>),

1.73–1.61 (m, 2H,  $H_3$ ), 1.61–1.39 (m, 3H,  $H_{3'}$  y  $H_{4'}$ ), 1.24 (d,  $J = 6.8$  Hz, 3H,  $H_{1'}$ ), 0.86 (d,  $J = 6.1$  Hz, 6H,  $CH_{3-4'}$  y  $H_5$ ); **RMN- $^{13}C$**  (75 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  178.2 (s,  $C_1$ ), 158.7 (s, CONH), 140.0 (s,  $C_3$  Th), 137.8 (q,  $^2J_{CF} = 37.0$  Hz,  $C_3$  Pz), 136.0 (s,  $C_5$  Pz), 129.6 (s,  $C_2$  Th), 124.4 (s,  $C_4$  Th), 121.3 (q,  $^1J_{CF} = 269.5$  Hz,  $CF_3$ ), 121.2 (s,  $C_5$  Th), 116.9 (s,  $C_4$  Pz), 52.9 (s,  $C_5$ ), 48.1 (s,  $C_{3'}$ ), 33.2 (s,  $C_2$ ), 30.3 (s,  $C_{2'}$ ), 29.2 (s,  $C_4$ ), 25.7 (s,  $C_{4'}$ ), 23.1 (s,  $C_{1'}$ ), 22.6 (s,  $CH_{3-4'}$ ), 22.5 (s,  $C_5$ ), 21.6 (s,  $C_3$ ); **RMN- $^{19}F$**  (282 MHz,  $CD_3OD$ )  $\delta$  -64.08 (s,  $CF_3$ ); **EMAR** (TOF, ES+)  $m/z$  calculada para  $C_{20}H_{27}F_3N_3O_3S$   $[M+H]^+$  446.1720, encontrada 446.1707; **UV** (PB)  $\epsilon$  (290 nm) =  $1.38$   $mM^{-1} cm^{-1}$ ,  $\epsilon$  (280 nm) =  $2.67$   $mM^{-1} cm^{-1}$ ,  $\epsilon$  (270 nm) =  $4.64$   $mM^{-1} cm^{-1}$ ,  $\epsilon$  (260 nm) =  $7.55$   $mM^{-1} cm^{-1}$ ,  $\epsilon$  (250 nm) =  $11.63$   $mM^{-1} cm^{-1}$ .

#### 5.4.2. Síntesis del hapteno PPb



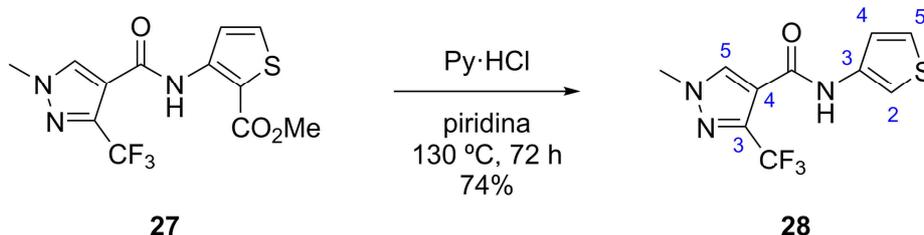
**Cloruro de 1-metil-3-(trifluorometil)-1H-pirazol-4-carbonilo (33).** Una suspensión de ácido 1-metil-3-(trifluorometil)-1H-pirazol-4-carboxílico (**22**, 1 g, 4.63 mmol) y  $PCl_5$  (1.06 mg, 5.09 mmol) en  $Et_2O$  anhidro (16 mL) se agitó bajo atmósfera de  $N_2$  a temperatura ambiente durante 2 h hasta observarse una disolución transparente (reacción monitorizada mediante CCF, hexano/ $AcOEt$  7:3). En este punto, el disolvente se evaporó a vacío para dar lugar a un residuo que contenía el cloruro de acilo intermedio **33**. Este compuesto se ha descrito previamente (CAS nº 126674-98-4), coincidiendo las propiedades espectroscópicas observadas con las ya descritas.<sup>213</sup>



**3-(1-Metil-3-(trifluorometil)-1H-pirazol-4-carboxamido)tiofeno-2-carboxilato de metilo (27).** Una disolución del cloruro de acilo **33** recién preparado en THF anhidro (3.85 mL) se añadió gota a gota bajo atmósfera de  $N_2$  a una disolución de 3-aminotiofeno-2-carboxilato de metilo (**26**, 727.8 mg, 4.63 mmol) y piridina anhidra (749  $\mu$ L, 9.26 mmol) en THF anhidro (3.85 mL). La mezcla resultante se agitó a

temperatura ambiente durante 3 h (reacción monitorizada mediante CCF, hexano/AcOEt 7:3). Transcurrido dicho tiempo la mezcla se diluyó en AcOEt y se lavó secuencialmente con disoluciones acuosas de HCl (1 M), NaHCO<sub>3</sub> (5%) y con salmuera. La fase orgánica se secó sobre MgSO<sub>4</sub> anhidro, se filtró y se evaporó a vacío. El producto crudo se purificó mediante cromatografía flash en columna (gel de sílice, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/Et<sub>2</sub>O 19:1), obteniéndose la amida **27** (1.28 g, 93%) como un sólido blanco [lit.,<sup>38</sup> cristales incoloros].

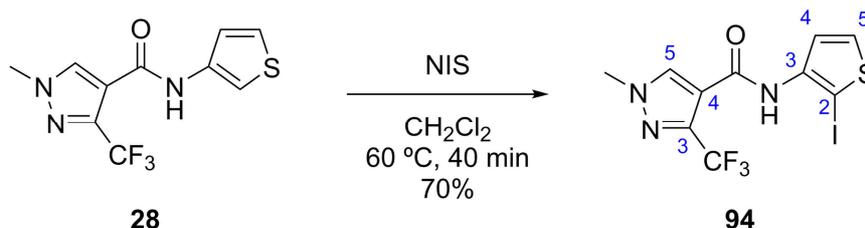
Datos físicos y espectroscópicos:<sup>38</sup> **Pf.** 144.0–144.8 °C (MeOH); **IR** (KBr)  $\nu_{\text{máx}}$  (cm<sup>-1</sup>) 3303d, 3128d, 2956d, 1679f, 1448m, 1301f, 1173f, 1060f, 783f, 651m; **RMN-<sup>1</sup>H** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  10.68 (s, 1H, CONH), 8.19 (d,  $J$  = 5.3 Hz, 1H,  $H_5$  Th), 7.95 (q,  $J$  = 0.5 Hz, 1H,  $H_5$  Pz), 7.51 (d,  $J$  = 5.3 Hz, 1H,  $H_4$  Th), 4.02 (s, 3H, NCH<sub>3</sub>), 3.91 (s, 3H, CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>); **RMN-<sup>13</sup>C** (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  165.2 (s, CO<sub>2</sub>Me), 157.6 (s, CONH), 144.7 (s, C<sub>3</sub> Th), 141.2 (q,  $^2J_{\text{CF}}$  = 38.4 Hz, C<sub>3</sub> Pz), 133.2 (s, C<sub>5</sub> Th), 132.1 (s, C<sub>5</sub> Pz), 122.6 (s, C<sub>4</sub> Th), 120.6 (q,  $^1J_{\text{CF}}$  = 269.6 Hz, CF<sub>3</sub>), 116.9 (s, C<sub>4</sub> Pz), 110.7 (s, C<sub>2</sub> Th), 52.2 (s, CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 40.1 (s, NCH<sub>3</sub>); **RMN-<sup>19</sup>F** (282 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  -61.64 (s, CF<sub>3</sub>); **EMAR** (TOF, ES+)  $m/z$  calculada para C<sub>12</sub>H<sub>11</sub>F<sub>3</sub>N<sub>3</sub>O<sub>3</sub>S [M+H]<sup>+</sup> 334.0468, encontrada 334.0468.



**1-Metil-*N*-(tiofen-3-il)-3-(trifluorometil)-1*H*-pirazol-4-carboxamida (28).** Una suspensión del éster metílico **27** (1.28 g, 3.83 mmol) y cloruro de piridinio (1.33 g, 11.48 mmol) en piridina anhidra (11.3 mL) se calentó a reflujo (130 °C) con agitación bajo atmósfera de N<sub>2</sub> durante 72 h (reacción monitorizada mediante CCF, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/Et<sub>2</sub>O 7:3). Posteriormente la mezcla se vertió sobre hielo, se acidificó con HCl concentrado hasta pH 2 y se extrajo con AcOEt. Las fases orgánicas reunidas se lavaron con salmuera, se secaron sobre MgSO<sub>4</sub> anhidro, se filtraron y se evaporaron a vacío. El producto crudo se purificó mediante cromatografía flash en columna (gel de sílice, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/Et<sub>2</sub>O 19:1), obteniéndose el compuesto **28** (777.6 mg, 74%) como un sólido marrón pálido.

Datos físicos y espectroscópicos:<sup>38</sup> **Pf.** 156.6–157.2 °C (benceno/AcOEt); **IR** (KBr)  $\nu_{\text{máx}}$  (cm<sup>-1</sup>) 3567d, 3343f, 3127m, 2942d, 1648f, 1538f, 1499f, 1309f, 836m, 774f;

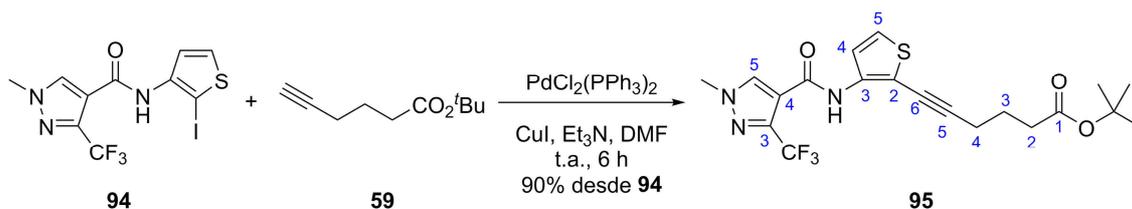
**RMN-<sup>1</sup>H** (300 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ 8.22 (q, *J* = 0.5 Hz, 1H, *H*<sub>5</sub> Pz), 7.60 (dd, *J* = 3.2, 1.3 Hz, 1H, *H*<sub>2</sub> Th), 7.35 (dd, *J* = 5.2, 3.2 Hz, 1H, *H*<sub>5</sub> Th), 7.16 (dd, *J* = 5.2, 1.3 Hz, 1H, *H*<sub>4</sub> Th), 3.99 (s, 3H, NCH<sub>3</sub>); **RMN-<sup>13</sup>C** (75 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ 160.5 (s, CONH), 141.8 (q, <sup>2</sup>*J*<sub>CF</sub> = 38.0 Hz, C<sub>3</sub> Pz), 137.4 (s, C<sub>3</sub> Th), 134.6 (s, C<sub>5</sub> Pz), 125.3 (s, C<sub>5</sub> Th), 122.6 (s, C<sub>4</sub> Th), 122.2 (q, <sup>1</sup>*J*<sub>CF</sub> = 268.5 Hz, CF<sub>3</sub>), 117.7 (s, C<sub>4</sub> Pz), 111.4 (s, C<sub>2</sub> Th), 39.9 (s, NCH<sub>3</sub>); **RMN-<sup>19</sup>F** (282 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ -62.90 (s, CF<sub>3</sub>); **EMAR** (TOF, ES+) *m/z* calculada para C<sub>10</sub>H<sub>9</sub>F<sub>3</sub>N<sub>3</sub>OS [M+H]<sup>+</sup> 276.0413, encontrada 276.0419.



***N*-(2-Yodotiofen-3-il)-1-metil-3-(trifluorometil)-1*H*-pirazol-4-carboxamida (94).**

Una suspensión del tiofeno **28** (250 mg, 0.91 mmol) y NIS (206.1 mg, 0.91 mmol) en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> anhidro (36.7 mL) se agitó en la oscuridad a 65 °C bajo atmósfera de N<sub>2</sub> durante 40 minutos (reacción monitorizada mediante CCF, CHCl<sub>3</sub>/Et<sub>2</sub>O 9:1). Transcurrido dicho tiempo el disolvente se evaporó a vacío, y el residuo obtenido se purificó mediante cromatografía flash en columna (gel de sílice, CHCl<sub>3</sub>), obteniéndose el yodotiofeno **94** (253.6 mg, 70%) como un sólido marrón pálido.

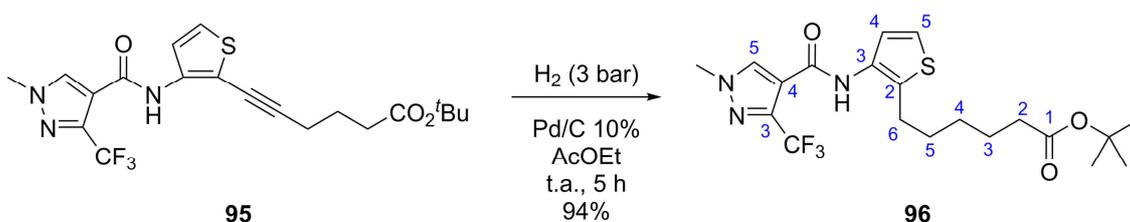
**Datos físicos y espectroscópicos:** **Pf.** 163.2–164.1 °C (benceno/hexano); **IR** (KBr)  $\nu_{\text{máx}}$  (cm<sup>-1</sup>) 3397m, 3117d, 3086m, 2954d, 1675f, 1569f, 1475m, 1379m, 1296m, 1065f; **RMN-<sup>1</sup>H** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 8.03 (s, 1H, *H*<sub>5</sub> Pz), 7.80 (br s, 1H, CONH), 7.72 (d, *J* = 5.8 Hz, 1H, *H*<sub>4</sub> Th), 7.51 (d, *J* = 5.8 Hz, 1H, *H*<sub>5</sub> Th), 4.00 (s, 3H, NCH<sub>3</sub>); **RMN-<sup>13</sup>C** (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 157.7 (s, CONH), 139.6 (s, C<sub>2</sub> Th), 138.6 (q, <sup>2</sup>*J*<sub>CF</sub> = 37.4 Hz, C<sub>3</sub> Pz), 136.1 (s, C<sub>5</sub> Pz), 130.6 (s, C<sub>5</sub> Th), 123.0 (s, C<sub>4</sub> Th), 121.0 (q, <sup>1</sup>*J*<sub>CF</sub> = 269.5 Hz, CF<sub>3</sub>), 117.0 (s, C<sub>4</sub> Pz), 62.5 (s, C<sub>2</sub> Th), 40.1 (s, NCH<sub>3</sub>); **RMN-<sup>19</sup>F** (282 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ -59.52 (s, CF<sub>3</sub>); **EMAR** (TOF, ES+) *m/z* calculada para C<sub>10</sub>H<sub>8</sub>F<sub>3</sub>IN<sub>3</sub>OS [M+H]<sup>+</sup> 401.9379, encontrada 401.9368.



**6-(3-(1-Metil-3-(trifluorometil)-1*H*-pirazol-4-carboxamido)tiofen-2-il)hex-5-inoato de *terc*-butilo (95).** A una disolución sonicada del yoduro **94** (262.1 mg, 0.65 mmol),

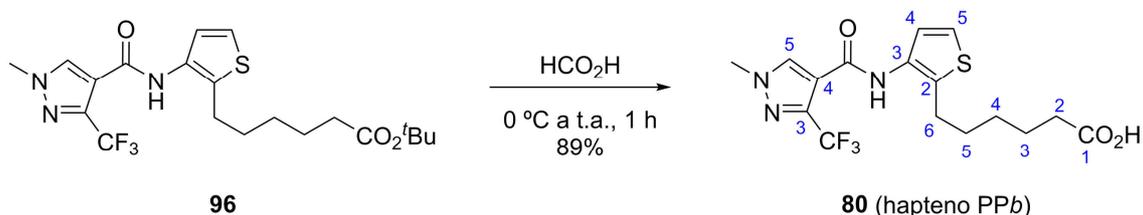
PdCl<sub>2</sub>(PPh<sub>3</sub>)<sub>2</sub> (15 mg, 21 μmol), CuI (9.5 mg, 50 μmol) y el alquino **59** (131.2 mg, 0.78 mmol) en DMF anhidra (840 μL) se añadió bajo atmósfera de N<sub>2</sub> trietilamina (840 μL, 6.03 mmol). La mezcla resultante se agitó 6 h a temperatura ambiente (reacción monitorizada mediante CCF, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/Et<sub>2</sub>O 9:1). Transcurrido dicho tiempo, la mezcla se diluyó en agua y se extrajo con AcOEt. Las fases orgánicas reunidas se lavaron con LiCl acuoso al 1.5% y con salmuera, se secaron sobre MgSO<sub>4</sub> anhidro, se filtraron y se evaporaron a vacío. El producto crudo se purificó mediante cromatografía flash en columna (gel de sílice, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>), obteniéndose el producto de acoplamiento cruzado **95** (259.3 mg, 90%) como un aceite amarillo.

**Datos físicos y espectroscópicos:** IR (KBr)  $\nu_{\text{máx}}$  (cm<sup>-1</sup>) 3417d, 3320f (ancha), 3126d, 2973m, 2934m, 1677f, 1569f, 1422f, 1230f, 1061f, 753m; **RMN-<sup>1</sup>H** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  8.30 (br s, 1H, CONH), 8.10 (q,  $J = 0.5$  Hz, 1H, H<sub>5</sub> Pz), 7.88 (d,  $J = 5.5$  Hz, 1H, H<sub>4</sub> Th), 7.13 (d,  $J = 5.5$  Hz, 1H, H<sub>5</sub> Th), 3.99 (s, 3H, NCH<sub>3</sub>), 2.55 (t,  $J = 7.1$  Hz, 2H, H<sub>4</sub>), 2.38 (t,  $J = 7.1$  Hz, 2H, H<sub>2</sub>), 1.89 (tt,  $J = 7.1$  Hz, 2H, H<sub>3</sub>), 1.42 (s, 9H, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>); **RMN-<sup>13</sup>C** (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  172.6 (s, C<sub>1</sub>), 157.2 (s, CONH), 139.7 (s, C<sub>3</sub> Th), 138.5 (q,  $^2J_{\text{CF}} = 37.3$  Hz, C<sub>3</sub> Pz), 136.2 (s, C<sub>5</sub> Pz), 125.1 (s, C<sub>4</sub> Th), 121.6 (s, C<sub>5</sub> Th), 121.0 (q,  $^1J_{\text{CF}} = 269.6$  Hz, CF<sub>3</sub>), 117.1 (s, C<sub>4</sub> Pz), 107.3 (s, C<sub>2</sub> Th), 99.8 (s, C<sub>5</sub>), 80.6 (s, CMe<sub>3</sub>), 71.3 (s, C<sub>6</sub>), 40.0 (s, NCH<sub>3</sub>), 34.7 (s, C<sub>2</sub>), 28.2 (s, C(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 24.0 (s, C<sub>3</sub>), 19.4 (s, C<sub>4</sub>); **RMN-<sup>19</sup>F** (282 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  -64.75 (s, CF<sub>3</sub>); **EMAR** (TOF, ES+)  $m/z$  calculada para C<sub>20</sub>H<sub>23</sub>F<sub>3</sub>N<sub>3</sub>O<sub>3</sub>S [M+H]<sup>+</sup> 442.1407, encontrada 442.1391.



**6-(3-(1-Metil-3-(trifluorometil)-1H-pirazol-4-carboxamido)tiofen-2-il)hexanoato de *tert*-butilo (96).** Una suspensión del compuesto **95** (146.7 mg, 0.33 mmol) y Pd/C al 10% (76.4 mg, 72 μmol Pd) en AcOEt anhidro (4 mL) se introdujo en un reactor equipado con agitación magnética y se hidrogenó a temperatura ambiente durante 5 h bajo una presión de H<sub>2</sub> de 3 bar. Transcurrido dicho tiempo el reactor se despresurizó, y la suspensión negra se filtró a través de celite, lavando con AcOEt. El disolvente se evaporó a vacío, y el residuo se purificó mediante cromatografía flash en columna (gel de sílice, hexano/AcOEt 7:3) para dar lugar al producto de hidrogenación **96** (139.2 mg, 94%) como un aceite amarillo.

**Datos físicos y espectroscópicos:** IR (KBr)  $\nu_{\text{máx}}$  ( $\text{cm}^{-1}$ ) 3278m (ancha), 3128d, 2978m, 2934m, 1727f, 1652f, 1548f, 1368f, 1139f, 837m, 761m; **RMN-<sup>1</sup>H** (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  8.04 (s, 1H,  $H_5$  Pz), 7.64 (br s, 1H, CONH), 7.42 (d,  $J = 5.4$  Hz, 1H,  $H_4$  Th), 7.09 (d,  $J = 5.4$  Hz, 1H,  $H_5$  Th), 3.96 (s, 3H,  $\text{NCH}_3$ ), 2.69 (t,  $J = 7.6$  Hz, 2H,  $H_6$ ), 2.20 (t,  $J = 7.3$  Hz, 2H,  $H_2$ ), 1.65 (tt,  $J = 7.5, 7.5$  Hz, 2H,  $H_5$ ), 1.60 (tt,  $J = 7.5, 7.5$  Hz, 2H,  $H_3$ ), 1.41 (s, 9H,  $\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ), 1.40–1.31 (m, 2H,  $H_4$ ); **RMN-<sup>13</sup>C** (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  173.2 (s,  $C_1$ ), 158.5 (s, CONH), 138.6 (q,  $^2J_{\text{CF}} = 37.9$  Hz,  $C_3$  Pz), 135.5 (s,  $C_5$  Pz), 132.6 (s,  $C_3$  Th), 130.7 (s,  $C_2$  Th), 124.5 (s,  $C_4$  Th), 121.2 (s,  $C_5$  Th), 121.1 (q,  $^1J_{\text{CF}} = 269.3$  Hz,  $\text{CF}_3$ ), 117.0 (s,  $C_4$  Pz), 80.1 (s,  $\text{CMe}_3$ ), 39.7 (s,  $\text{NCH}_3$ ), 35.4 (s,  $C_2$ ), 30.5 (s,  $C_5$ ), 28.4 (s,  $C_4$ ), 28.1 (s,  $\text{C}(\text{CH}_3)_3$ ), 26.5 (s,  $C_6$ ), 24.6 (s,  $C_3$ ); **RMN-<sup>19</sup>F** (282 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  -59.92 (s,  $\text{CF}_3$ ); **EMAR** (TOF, ES+)  $m/z$  calculada para  $\text{C}_{20}\text{H}_{27}\text{F}_3\text{N}_3\text{O}_3\text{S}$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  446.1720, encontrada 446.1725.

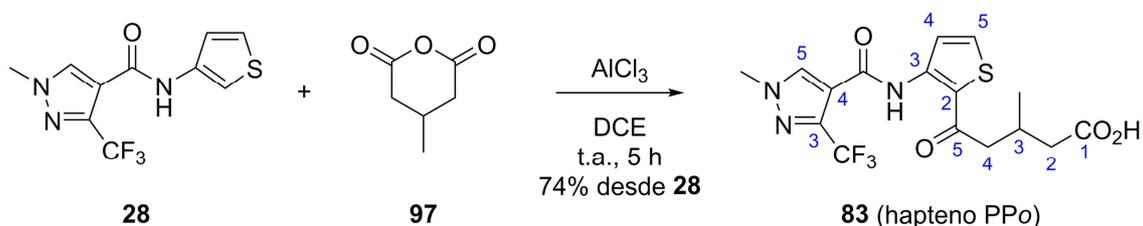


**Ácido 6-(3-(1-metil-3-(trifluorometil)-1H-pirazol-4-carboxamido)tiofen-2-il)hexanoico (hapteno PPb, 80).** El éster *terc*-butílico **96** (136 mg, 0.31 mmol) se disolvió a 0 °C en ácido fórmico (4 mL), y la mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante 1 h (reacción monitorizada mediante CCF, hexano/ $\text{AcOEt}$  3:7). Transcurrido dicho tiempo la mezcla se diluyó en benceno y el disolvente se evaporó a sequedad. El residuo obtenido se purificó mediante cromatografía flash en columna (gel de sílice,  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$  19:1), lo que dio lugar al hapteno PPb (**80**, 105.7 mg, 89%) como un sólido blanco.

**Datos físicos y espectroscópicos:** **Pf.** 106.3–107.7 °C (benceno/ $\text{AcOEt}$ ); IR (KBr)  $\nu_{\text{máx}}$  ( $\text{cm}^{-1}$ ) 3263f, 2944m, 1720f, 1651f, 1575m, 1488m, 1211f, 1123f, 896d; **RMN-<sup>1</sup>H** (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  10.85 (br s, 1H,  $\text{CO}_2\text{H}$ ), 8.03 (s, 1H,  $H_5$  Pz), 7.70 (br s, 1H, CONH), 7.34 (d,  $J = 5.4$  Hz, 1H,  $H_4$  Th), 7.06 (d,  $J = 5.4$  Hz, 1H,  $H_5$  Th), 3.92 (s, 3H,  $\text{NCH}_3$ ), 2.68 (t,  $J = 7.6$  Hz, 2H,  $H_6$ ), 2.31 (t,  $J = 7.3$  Hz, 2H,  $H_2$ ), 1.64 (tt,  $J = 7.5$  Hz, 2H,  $H_5$ ), 1.63 (tt,  $J = 7.4$  Hz, 2H,  $H_3$ ), 1.46–1.33 (m, 2H,  $H_4$ ); **RMN-<sup>13</sup>C** (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  179.0 (s,  $C_1$ ), 158.4 (s, CONH), 138.0 (q,  $^2J_{\text{CF}} = 35.5$  Hz,  $C_3$  Pz), 136.5 (s,  $C_5$  Pz), 132.1 (s,  $C_3$  Th), 130.7 (s,  $C_2$  Th), 124.4 (s,  $C_4$  Th), 121.5 (s,  $C_5$  Th), 121.3 (q,  $^1J_{\text{CF}} = 269.1$  Hz,  $\text{CF}_3$ ), 117.2 (s,  $C_4$  Pz), 40.0 (s,  $\text{NCH}_3$ ), 33.9 (s,  $C_2$ ), 30.6 (s,  $C_5$ ), 28.6 (s,  $C_4$ ), 26.6 (s,  $C_6$ ), 24.4 (s,  $C_3$ ); **RMN-<sup>19</sup>F** (282 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta$  -60.13 (s,  $\text{CF}_3$ ); **EMAR** (TOF, ES+)  $m/z$  calculada para  $\text{C}_{16}\text{H}_{19}\text{F}_3\text{N}_3\text{O}_3\text{S}$   $[\text{M}+\text{H}]^+$

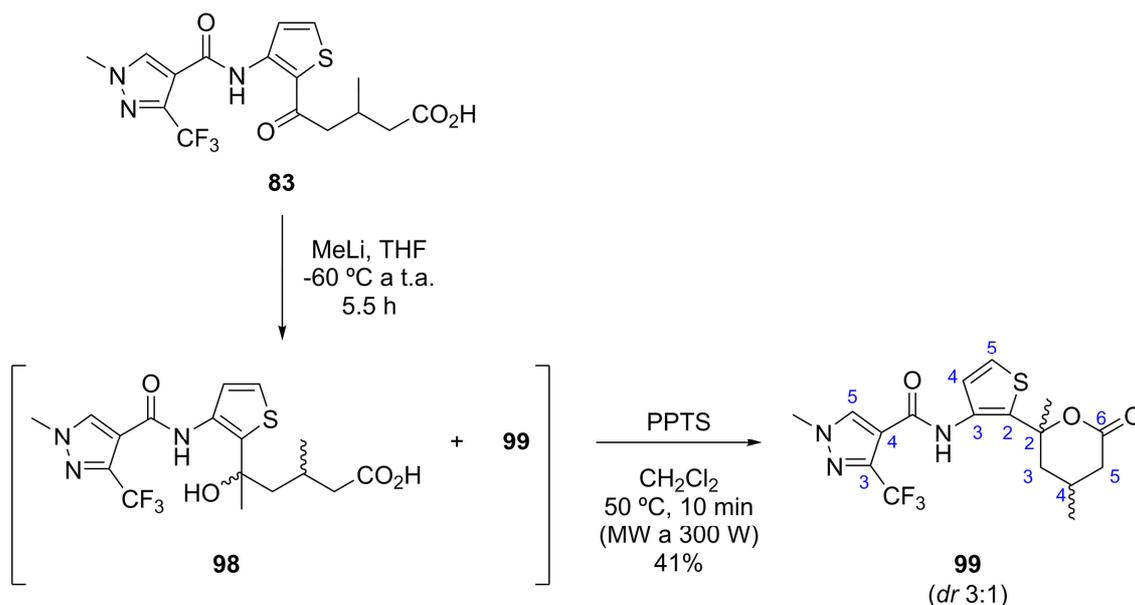
390.1094, encontrada 390.1105; **UV** (PB)  $\epsilon$  (290 nm) = 0.85 mM<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>,  $\epsilon$  (280 nm) = 1.50 mM<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>,  $\epsilon$  (270 nm) = 2.47 mM<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>,  $\epsilon$  (260 nm) = 3.93 mM<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>,  $\epsilon$  (250 nm) = 6.11 mM<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>.

### 5.4.3. Síntesis de los haptenos P<sub>P</sub>m y P<sub>P</sub>o



**Ácido 3-metil-5-(3-(1-metil-3-(trifluorometil)-1H-pirazol-4-carboxamido)tiofen-2-il)-5-oxopentanoico (hapteno P<sub>P</sub>o, 83).** Una mezcla del tiofeno **28** (150 mg, 0.54 mmol), anhídrido 3-metilglutárico (**97**, 104.3 mg, 0.81 mmol) y AlCl<sub>3</sub> (361.9 mg, 2.72 mmol) en DCE anhidro (2 mL) se agitó a temperatura ambiente bajo atmósfera de N<sub>2</sub> durante 5 h (reacción monitorizada mediante CCF, CHCl<sub>3</sub>/MeOH 19:1). Transcurrido dicho tiempo la mezcla se diluyó en agua con hielo, se acidificó con HCl concentrado hasta pH 1 y se extrajo con AcOEt. Las fases orgánicas reunidas se lavaron con salmuera, se secaron sobre MgSO<sub>4</sub> anhidro, se filtraron y se evaporaron a vacío. El producto crudo se purificó mediante cromatografía flash en columna (gel de sílice, CHCl<sub>3</sub>/MeOH 99:1), obteniéndose el hapteno P<sub>P</sub>o (**83**, 163.1 mg, 74%) como un sólido amarillo pálido.

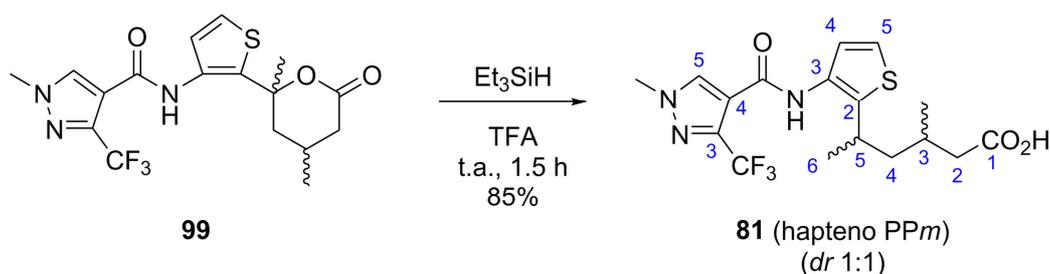
**Datos físicos y espectroscópicos:** **Pf.** 179.4–180.8 °C (AcOEt); **IR** (KBr)  $\nu_{\text{máx}}$  (cm<sup>-1</sup>) 3275m, 3081m, 2962m, 2926m, 1709f, 1686f, 1625f, 1567f, 1430f, 1293f, 1165f, 1067m; **RMN-<sup>1</sup>H** (300 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$  8.35 (q,  $J$  = 0.5 Hz, 1H,  $H_5$  Pz), 8.13 (d,  $J$  = 5.4 Hz, 1H,  $H_5$  Th), 7.78 (d,  $J$  = 5.4 Hz, 1H,  $H_4$  Th), 4.03 (s, 3H, NCH<sub>3</sub>), 2.94 (dd,  $J$  = 15.7, 6.2 Hz, 1H,  $H_4$ ), 2.78 (dd,  $J$  = 15.7, 7.3 Hz, 1H,  $H_4$ ), 2.72–2.55 (m,  $J$  = 6.6 Hz, 1H,  $H_3$ ), 2.44 (dd,  $J$  = 15.4, 6.1 Hz, 1H,  $H_2$ ), 2.27 (dd,  $J$  = 15.4, 7.6 Hz, 1H,  $H_2$ ), 1.06 (d,  $J$  = 6.6 Hz, 3H, CH<sub>3</sub>-3); **RMN-<sup>13</sup>C** (75 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$  196.7 (s, C<sub>5</sub>), 176.2 (s, C<sub>1</sub>), 159.5 (s, CONH), 145.5 (s, C<sub>3</sub> Th), 142.1 (q,  $^2J_{\text{CF}}$  = 38.0 Hz, C<sub>3</sub> Pz), 135.2 (s, C<sub>5</sub> Pz), 134.1 (s, C<sub>5</sub> Th), 123.4 (s, C<sub>4</sub> Th), 122.1 (q,  $^1J_{\text{CF}}$  = 268.2 Hz, CF<sub>3</sub>), 121.7 (s, C<sub>2</sub> Th), 117.2 (s, C<sub>4</sub> Pz), 48.5 (s, C<sub>4</sub>), 41.7 (s, C<sub>2</sub>), 40.1 (s, NCH<sub>3</sub>), 28.5 (s, C<sub>3</sub>), 20.3 (s, CH<sub>3</sub>-3); **RMN-<sup>19</sup>F** (282 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$  -63.07 (s, CF<sub>3</sub>); **EMAR** (TOF, ES+)  $m/z$  calculada para C<sub>16</sub>H<sub>17</sub>F<sub>3</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub>S [M+H]<sup>+</sup> 404.0886, encontrada 404.0893; **UV** (PB)  $\epsilon$  (290 nm) = 5.67 mM<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>,  $\epsilon$  (280 nm) = 4.27 mM<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>,  $\epsilon$  (270 nm) = 3.02 mM<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>,  $\epsilon$  (260 nm) = 4.27 mM<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>,  $\epsilon$  (250 nm) = 5.87 mM<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>.



***N*-(2-(2,4-Dimetil-6-oxotetrahidro-2H-piran-2-il)tiofen-3-il)-1-metil-3-(trifluorometil)-1H-pirazol-4-carboxamida (99)**. A una disolución del cetoácido **83** (163.1 mg, 0.40 mmol) en THF anhidro (16.3 mL) a  $-60\text{ }^\circ\text{C}$  se añadió gota a gota bajo atmósfera de  $\text{N}_2$  una disolución 3 M de MeLi en DEM (0.68 mL, 2.02 mmol). La mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante 5.5 h (reacción monitorizada mediante CCF,  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$  19:1). Transcurrido dicho tiempo la mezcla se diluyó en agua con hielo, se acidificó con HCl acuoso 1 M hasta pH 2 y se extrajo con AcOEt. Las fases orgánicas reunidas se lavaron con salmuera, se secaron sobre  $\text{MgSO}_4$  anhidro, se filtraron y se evaporaron a vacío. El residuo, cuyo espectro de RMN- $^1\text{H}$  mostró que contenía una mezcla impura del hidroxiácido **98** y la lactona **99**, se disolvió en  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  anhidro (1.5 mL) en un tubo de microondas, se añadió PPTS (2.0 mg) y la mezcla se calentó con agitación en horno microondas a  $50\text{ }^\circ\text{C}$  (300 W) durante 10 min. Posteriormente el disolvente se evaporó a vacío y el producto crudo se purificó mediante cromatografía flash en columna (gel de sílice,  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$  99:1). Se obtuvo así la lactona **99** (66.5 mg, 41%) como un sólido blanco, cuyo espectro de RMN- $^1\text{H}$  mostró ser una mezcla 3:1 de diastereoisómeros.

Datos físicos y espectroscópicos: **Pf.**  $136.4\text{--}137.9\text{ }^\circ\text{C}$  ( $\text{CHCl}_3$ ); **IR** (KBr)  $\nu_{\text{máx}}$  ( $\text{cm}^{-1}$ ) 3401d, 2962d, 1737f, 1683f, 1574m, 1399m, 1296m, 1245m, 1173f, 1136f, 1061f, 883m; **RMN- $^1\text{H}$**  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  9.18 (br s, 1H, CONH), 8.36 (s, 1H,  $\text{C}_5$  Pz), 8.05 (d,  $J = 5.5$  Hz, 1H,  $\text{H}_4$  Th), 7.18 (d,  $J = 5.5$  Hz, 1H,  $\text{H}_5$  Th), 4.00 (s, 3H,  $\text{NCH}_3$ ), 2.61 (ddd,  $J = 17.2, 4.9, 1.9$  Hz, 1H,  $\text{H}_5$ ), 2.40 (ddd,  $J = 14.5, 3.1, 2.1$  Hz, 1H,  $\text{H}_3$ ), 2.34–2.25 (m, 1H,  $\text{H}_4$ ), 2.08 (dd,  $J = 17.2, 11.8$  Hz, 1H,  $\text{H}_5$ ), 1.73 (dd,  $J = 14.5, 12.1$  Hz, 1H,  $\text{H}_3$ ), 1.72 (s, 3H,

$CH_3-2$ ), 1.07 (d,  $J = 6.4$  Hz, 3H,  $CH_3-4$ ); **RMN- $^{13}C$**  (75 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  171.1 (s,  $C_1$ ), 157.4 (s, CONH), 141.6 (q,  $^2J_{CF} = 38.1$  Hz,  $C_3$  Pz), 134.8 (s,  $C_3$  Th), 133.4 (s,  $C_5$  Pz), 125.6 (s,  $C_2$  Th), 124.5 (s,  $C_4$  Th), 122.6 (s,  $C_5$  Th), 120.8 (q,  $^1J_{CF} = 269.8$  Hz,  $CF_3$ ), 117.2 (s,  $C_4$  Pz), 86.3 (s,  $C_2$ ), 44.0 (s,  $C_3$ ), 40.0 (s, NCH $_3$ ), 37.8 (s,  $C_5$ ), 32.0 (s,  $CH_3-2$ ), 25.1 (s,  $H_4$ ), 21.2 (s,  $CH_3-4$ ); **RMN- $^{19}F$**  (282 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  -61.71 (s,  $CF_3$ ); **EMAR** (TOF, ES+)  $m/z$  calculada para  $C_{17}H_{19}F_3N_3O_3S$   $[M+H]^+$  402.1094, encontrada 402.1076.

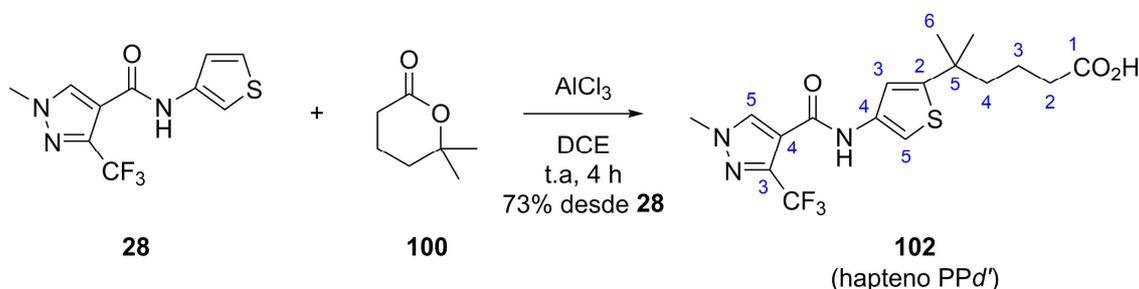


**Ácido 3-metil-5-(3-(1-metil-3-(trifluorometil)-1H-pirazol-4-carboxamido)tiofen-2-il)hexanoico (hapteno PPM, 81).** A una disolución de la lactona **99** (64.6 mg, 0.16 mmol) y TFA (0.82 mL, 10.61 mmol) en  $CH_2Cl_2$  anhidro (1 mL) bajo atmósfera de  $N_2$  se añadió trietilsilano (1.7 mL, 10.61 mmol). La mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante 1.5 h (reacción monitorizada mediante CCF,  $CHCl_3/MeOH$  19:1). Transcurrido dicho tiempo el disolvente se evaporó a vacío, y el producto crudo se purificó mediante cromatografía flash en columna (gel de sílice,  $CHCl_3/MeOH$  49:1). Se obtuvo así el hapteno PPM (**81**, 55.2 mg, 85%) como un sólido blanco, cuyo espectro de RMN- $^1H$  mostró ser una mezcla 1:1 de diastereoisómeros.

Datos físicos y espectroscópicos: **Pf.** 91.9–92.1 °C ( $CH_2Cl_2$ ); **IR** (puro)  $\nu_{m\acute{a}x}$  ( $cm^{-1}$ ) 3126d, 2962d, 2930d, 1705f, 1652f, 1547m, 1486d, 1301m, 1175f, 1137f, 1057f, 833m; **RMN- $^1H$**  (300 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  10.72 (br s, 1H,  $CO_2H$ ), 8.05 (s, 1H,  $H_5$  Pz), 7.71 (br s, 1H, CONH), 7.33 (d,  $J = 5.4$  Hz, 1H,  $H_4$  Th), 7.12 (d,  $J = 5.4$  Hz, 1H,  $H_5$  Th), 3.93 (s, 3H, NCH $_3$ ), 3.12 (ddq,  $J = 7.0, 7.0, 7.0$  Hz, 1H,  $H_5$ ), 2.28 (dd,  $J = 14.9, 6.1$  Hz, 1H,  $H_2$ ), 2.17 (dd,  $J = 14.9, 7.1$  Hz, 1H,  $H_2$ ), 2.02–1.87 (m, 1H,  $H_3$ ), 1.76–1.64 (m, 1H,  $H_4$ ), 1.55–1.43 (m, 1H,  $H_4$ ), 1.26 (d,  $J = 7.0$  Hz, 3H,  $H_6$ ), 0.94 (d,  $J = 6.6$  Hz, 3H,  $CH_3-3$ ); **RMN- $^{13}C$**  (75 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  178.2 (s,  $C_1$ ), 159.2 (s, CONH), 139.2 (s,  $C_3$  Th), 138.5 (q,  $^2J_{CF} = 37.0$  Hz,  $C_3$  Pz), 136.0 (s,  $C_5$  Pz), 129.8 (s,  $C_2$  Th), 124.8 (s,  $C_4$  Th), 121.6 (s,  $C_5$  Th), 121.2 (q,  $^1J_{CF} = 269.5$  Hz,  $CF_3$ ), 116.9 (s,  $C_4$  Pz), 45.6 (s,  $C_4$ ), 41.1 (s,  $C_2$ ), 39.9 (s, NCH $_3$ ), 30.4 (s,  $C_5$ ), 28.2 (s,  $C_3$ ), 23.1 (s,  $C_6$ ), 20.0 (s,  $CH_3-3$ ); **RMN- $^{19}F$**  (282 MHz,  $DMSO-d_6$ )  $\delta$  -60.13 (s,  $CF_3$ ); **EMAR** (TOF, ES+)  $m/z$  calculada para  $C_{17}H_{21}F_3N_3O_3S$   $[M+H]^+$  404.1250, encontrada 404.1256;

**UV** (PB)  $\epsilon$  (290 nm) = 1.34 mM<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>,  $\epsilon$  (280 nm) = 2.38 mM<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>,  $\epsilon$  (270 nm) = 3.86 mM<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>,  $\epsilon$  (260 nm) = 6.05 mM<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>,  $\epsilon$  (250 nm) = 9.16 mM<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>.

#### 5.4.4. Síntesis del hapteno PPd'



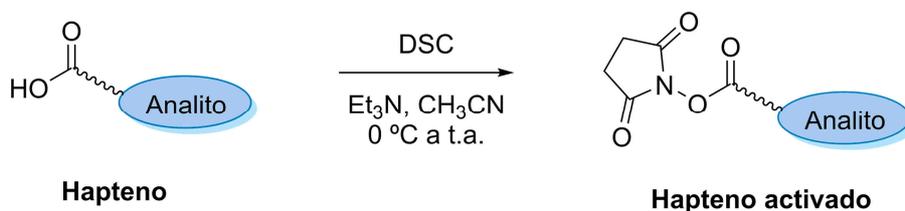
**Ácido 5-metil-5-(4-(1-metil-3-(trifluorometil)-1H-pirazol-4-carboxamido)tiopen-2-il)hexanoico (hapteno PPd', 102).** Una mezcla del tiofeno **28** (78.7 mg, 0.29 mmol), la lactona **100** (75 mg, 0.59 mmol) y AlCl<sub>3</sub> (267 mg, 2 mmol) en DCE anhidro (2.5 mL) se agitó a temperatura ambiente bajo atmósfera de N<sub>2</sub> durante 4 h (reacción monitorizada mediante CCF, CHCl<sub>3</sub>/MeOH 19:1). Transcurrido dicho tiempo la mezcla se diluyó en agua con hielo, se acidificó con HCl concentrado hasta pH 1 y se extrajo con AcOEt. Las fases orgánicas reunidas se lavaron con salmuera, se secaron sobre MgSO<sub>4</sub> anhidro, se filtraron y se evaporaron a vacío. El producto crudo se purificó mediante cromatografía flash en columna (gel de sílice, CHCl<sub>3</sub>/MeOH 49:1), obteniéndose el hapteno PPd' (**102**, 84.2 mg, 73%) como un sólido marrón pálido.

**Datos físicos y espectroscópicos:** Pf. 106.5–108.5 °C (CHCl<sub>3</sub>/MeOH); **IR** (puro)  $\nu_{\text{máx}}$  (cm<sup>-1</sup>) 3289d, 2961d, 1706f, 1651f, 1582m, 1542f, 1302m, 1132f, 1053f, 830m; **RMN-<sup>1</sup>H** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  10.27 (br s, 1H, CO<sub>2</sub>H), 8.00 (br s, 2H, H<sub>5</sub> Pz y CONH), 7.41 (d, *J* = 1.5 Hz, 1H, H<sub>3</sub> Th), 6.73 (d, *J* = 1.5 Hz, 1H, H<sub>5</sub> Th), 3.96 (s, 3H, NCH<sub>3</sub>), 2.29 (t, *J* = 7.1 Hz, 2H, H<sub>2</sub>), 1.72–1.58 (m, 2H, H<sub>4</sub>), 1.58–1.41 (m, 2H, H<sub>3</sub>), 1.34 (s, 6H, CH<sub>3</sub>-5 y H<sub>6</sub>); **RMN-<sup>13</sup>C** (75 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  179.2 (s, C<sub>1</sub>), 158.0 (s, CONH), 154.7 (s, C<sub>4</sub> Th), 138.5 (q, *J* = 37.3 Hz, C<sub>3</sub> Pz), 135.6 (s, C<sub>5</sub> Pz), 133.9 (s, C<sub>2</sub> Th), 121.1 (q, <sup>1</sup>J<sub>CF</sub> = 273.1 Hz, CF<sub>3</sub>), 117.1 (s, C<sub>4</sub> Pz), 117.0 (s, C<sub>5</sub> Th), 108.7 (s, C<sub>3</sub> Th), 44.6 (s, C<sub>4</sub>), 40.0 (s, NCH<sub>3</sub>), 37.6 (s, C<sub>5</sub>), 34.3 (s, C<sub>2</sub>), 29.8 (s, CH<sub>3</sub>-5 y C<sub>6</sub>), 20.2 (s, C<sub>3</sub>); **RMN-<sup>19</sup>F** (282 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  -59.98 (s, CF<sub>3</sub>); **EMAR** (TOF, ES+) *m/z* calculada para C<sub>17</sub>H<sub>21</sub>F<sub>3</sub>N<sub>3</sub>O<sub>3</sub>S [M+H]<sup>+</sup> 404.1250, encontrada 404.1248; **UV** (PB)  $\epsilon$  (290 nm) = 2.45 mM<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>,  $\epsilon$  (280 nm) = 3.47 mM<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>,  $\epsilon$  (270 nm) = 4.15 mM<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>,  $\epsilon$  (260 nm) = 4.19 mM<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>,  $\epsilon$  (250 nm) = 3.82 mM<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>.

## 5.5. Preparación de conjugados proteína–hapteno

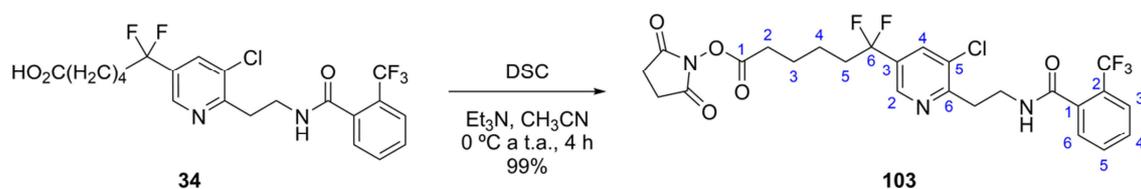
### 5.5.1. Activación de haptenos

#### 5.5.1.1. Procedimiento general de activación



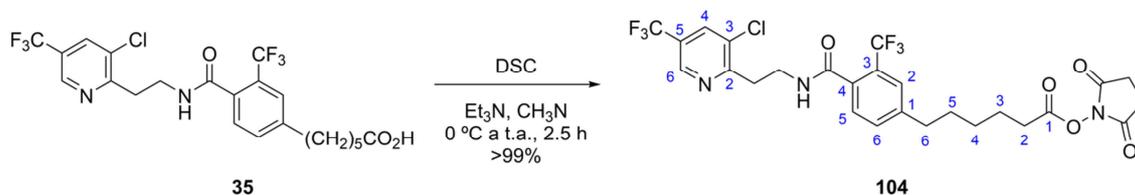
A una suspensión a 0 °C de DSC (1.3 equiv.) en una disolución 50 mM del hapteno (reactivo limitante) en CH<sub>3</sub>CN anhidro se añadió bajo atmósfera de N<sub>2</sub> trietilamina anhidra (3.8 equiv.). La mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente hasta observarse mediante CCF (CHCl<sub>3</sub>/MeOH 19:1) el consumo total del hapteno. Una vez acabada la reacción, la mezcla se diluyó en agua y se extrajo con AcOEt. Las fases orgánicas reunidas se lavaron con NaHCO<sub>3</sub> acuoso al 5% y con salmuera, se secaron sobre MgSO<sub>4</sub> anhidro, se filtraron y se evaporaron a vacío. El producto crudo se purificó mediante cromatografía flash en columna (gel de sílice, CHCl<sub>3</sub>) para dar lugar al hapteno activado puro. La activación se confirmó mediante RMN-<sup>1</sup>H.

#### 5.5.1.2. Activación de los haptenos para fluopyram



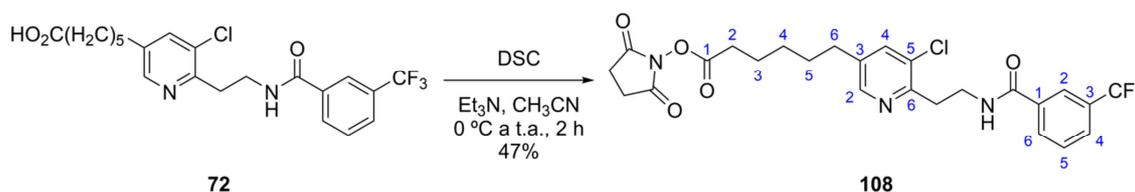
**6-(5-Cloro-6-(2-(2-(trifluorometil)benzamido)etil)piridin-3-il)-6,6-difluorohexanoato de 2,5-dioxopirrolidin-1-ilo (FP $\alpha$ -NHS, 103).** La activación del hapteno FP $\alpha$  (**34**, 12.2 mg, 26  $\mu$ mol) proporcionó tras 4 h el éster activo FP $\alpha$ -NHS (**103**, 14.6 mg, 99%) como un aceite incoloro.

Datos espectroscópicos: **RMN-<sup>1</sup>H** (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  8.48 (d,  $J$  = 2.0 Hz, 1H,  $H_2$  Py), 7.76 (d,  $J$  = 2.0 Hz, 1H,  $H_4$  Py), 7.68–7.63 (m, 1H,  $H_3$  Ph), 7.61–7.46 (m, 3H,  $H_4$ ,  $H_5$  y  $H_6$  Ph), 6.75 (br t,  $J$  = 5.3 Hz, 1H, CONH), 3.98 (dt,  $J$  = 6.0, 6.0 Hz, 2H, NHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 3.27 (t,  $J$  = 5.9 Hz, 2H, NHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 2.81 (s, 4H, CO(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>CO), 2.60 (t,  $J$  = 7.2 Hz, 2H,  $H_2$ ), 2.25–2.07 (m, 2H,  $H_5$ ), 1.80 (dt,  $J$  = 7.5, 7.5 Hz, 2H,  $H_3$ ), 1.63–1.53 (m, 2H,  $H_4$ ).



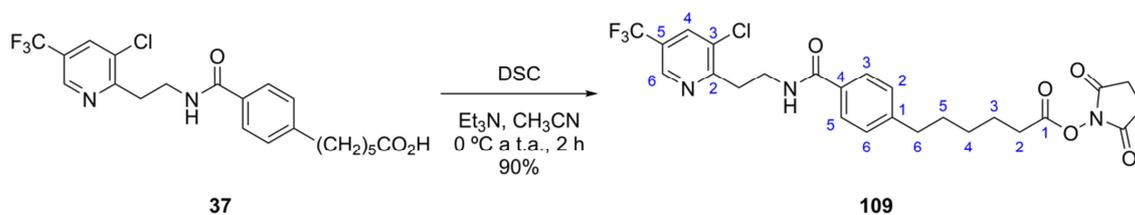
**6-(4-(2-(3-Cloro-5-(trifluorometil)piridin-2-il)etil)carbamoi)-3-trifluorometil-fenil)hexanoato de 2,5-dioxopirrolidin-1-ilo (FPb-NHS, 104).** La activación del hapteno FPb (**35**, 20.2 mg, 40  $\mu\text{mol}$ ) proporcionó tras 2.5 h el éster activo FPb-NHS (**104**, 23.9 mg, >99%) como un sólido blanco.

Datos espectroscópicos: **RMN-<sup>1</sup>H** (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  8.65 (dq,  $^4J_{\text{HH}} = 1.9$  Hz,  $^4J_{\text{HF}} = 0.8$  Hz, 1H,  $H_6$  Py), 7.91 (dq,  $^4J_{\text{HH}} = 1.9$  Hz,  $^4J_{\text{HF}} = 0.6$  Hz, 1H,  $H_4$  Py), 7.44 (d,  $J = 1.1$  Hz, 1H,  $H_2$  Ph), 7.42 (d,  $J = 7.8$  Hz, 1H,  $H_5$  Ph), 7.36 (dd,  $J = 7.8, 1.1$  Hz, 1H,  $H_6$  Ph), 6.66 (t,  $J = 6.0$  Hz, 1H, CONH), 3.98 (dt,  $J = 6.0, 6.0$  Hz, 2H,  $\text{NHCH}_2\text{CH}_2$ ), 3.29 (t,  $J = 6.0$  Hz, 2H,  $\text{NHCH}_2\text{CH}_2$ ), 2.84 (s, 4H,  $\text{CO}(\text{CH}_2)_2\text{CO}$ ), 2.68 (t,  $J = 7.7$  Hz, 2H,  $H_6$ ), 2.60 (t,  $J = 7.3$  Hz, 2H,  $H_2$ ), 1.77 (tt,  $J = 7.3, 7.3$  Hz, 2H,  $H_3$ ), 1.66 (tt,  $J = 7.7, 7.4$  Hz, 2H,  $H_5$ ), 1.50–1.38 (m, 2H,  $H_4$ ).



**6-(5-Cloro-6-(2-(3-(trifluorometil)benzamido)etil)piridin-3-il)hexanoato de 2,5-dioxo-pirroli-din-1-ilo (FPha'-NHS, 108).** La activación del hapteno FPha (**72**, 14 mg, 32  $\mu\text{mol}$ ) proporcionó tras 2 h el éster activo FPha'-NHS (**108**, 8 mg, 47%) como un aceite incoloro.

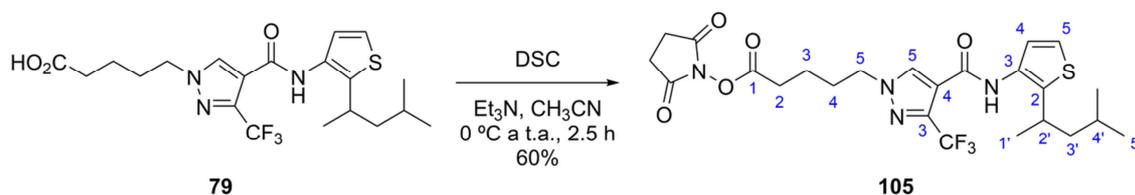
Datos espectroscópicos: **RMN-<sup>1</sup>H** (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  8.28 (s, 1H,  $H_2$  Py), 8.02 (s, 1H,  $H_2$  Ph), 7.94 (d,  $J = 7.4$  Hz, 1H,  $H_6$  Ph), 7.73 (d,  $J = 7.4$  Hz, 1H,  $H_4$  Ph), 7.55 (dd,  $J = 7.4, 7.4$  Hz, 1H,  $H_5$  Ph), 7.52 (s, 1H,  $H_4$  Py), 7.52 (br t,  $J = 5.2$  Hz, 1H, CONH), 3.93 (dt,  $J = 5.5, 5.2$  Hz, 2H,  $\text{NHCH}_2\text{CH}_2$ ), 3.22 (t,  $J = 5.5$  Hz, 2H,  $\text{NHCH}_2\text{CH}_2$ ), 2.82 (s, 4H,  $\text{CO}(\text{CH}_2)_2\text{CO}$ ), 2.62 (t,  $J = 7.5$  Hz, 2H,  $H_6$ ), 2.61 (t,  $J = 7.1$  Hz, 2H,  $H_2$ ), 1.79 (tt,  $J = 7.3, 7.3$  Hz, 2H,  $H_3$ ), 1.67 (tt,  $J = 7.6, 7.6$  Hz, 2H,  $H_5$ ), 1.47 (tt,  $J = 7.5, 7.5$  Hz, 2H,  $H_4$ ).



**6-(4-((2-(3-Cloro-5-(trifluorometil)piridin-2-il)etil)carbamoil)fenil)hexanoato de 2,5-di-oxopirrolidin-1-ilo (FPhb–NHS, 109).** La activación del hapteno FPhb (**37**, 20 mg, 45  $\mu\text{mol}$ ) proporcionó tras 2 h el éster activo FPhb–NHS (**109**, 21.9 mg, 90%) como un sólido blanco.

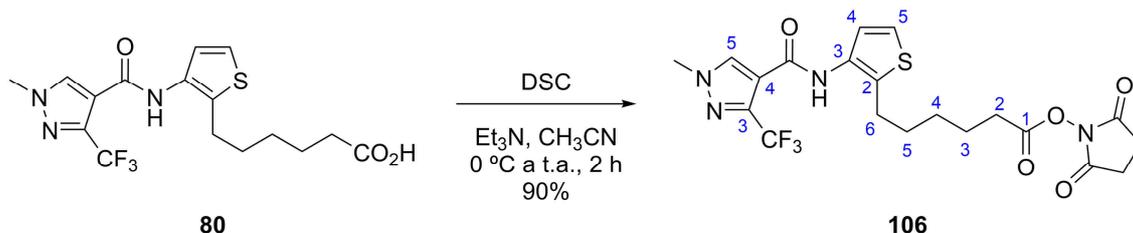
Datos espectroscópicos: **RMN-<sup>1</sup>H** (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  8.74 (d,  $J = 2.0$  Hz, 1H,  $H_6$  Py), 7.91 (d,  $J = 2.0$  Hz, 1H,  $H_4$  Py), 7.65 (d,  $J = 8.2$  Hz, 2H,  $H_3$  y  $H_5$  Ph), 7.21 (d,  $J = 8.2$  Hz, 2H,  $H_2$  y  $H_6$  Ph), 7.03 (t,  $J = 6.0$  Hz, 1H, CONH), 3.97 (dt,  $J = 6.0, 6.0$  Hz, 2H,  $\text{NHCH}_2\text{CH}_2$ ), 3.31 (t,  $J = 6.0$  Hz, 2H,  $\text{NHCH}_2\text{CH}_2$ ), 2.83 (s, 4H,  $\text{CO}(\text{CH}_2)_2\text{CO}$ ), 2.65 (t,  $J = 7.6$  Hz, 2H,  $H_6$ ), 2.59 (t,  $J = 7.5$  Hz, 2H,  $H_2$ ), 1.76 (tt,  $J = 7.5, 7.5$  Hz, 2H,  $H_3$ ), 1.65 (tt,  $J = 7.6, 7.6$  Hz, 2H,  $H_5$ ), 1.49–1.38 (m, 2H,  $H_4$ ).

### 5.5.1.3. Activación de los haptenos para penthiopyrad



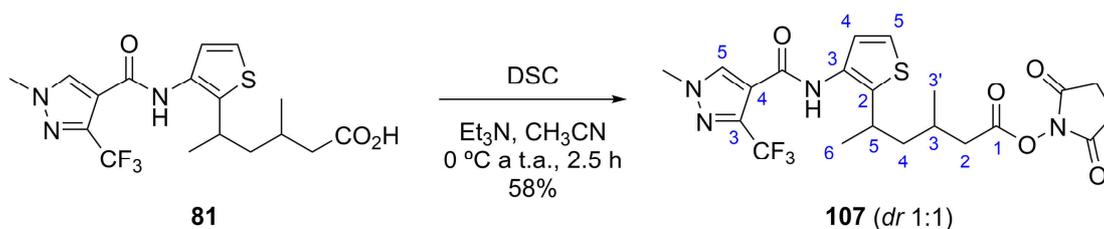
**5-(4-((2-(4-Metilpentan-2-il)tiofen-3-il)carbamoil)-3-(trifluorometil)-1H-pirazol-1-il)penta-noato de 2,5-dioxopirrolidin-1-ilo (PP $\alpha$ –NHS, 105).** La activación del hapteno PP $\alpha$  (**79**, 15 mg, 34  $\mu\text{mol}$ ) proporcionó tras 2.5 h el éster activo PP $\alpha$ –NHS (**105**, 11.1 mg, 60%) como un aceite incoloro.

Datos espectroscópicos: **RMN-<sup>1</sup>H** (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  8.11 (s, 1H,  $H_5$  Pz), 7.55 (br s, 1H, CONH), 7.40 (d,  $J = 5.4$  Hz, 1H,  $H_4$  Th), 7.12 (d,  $J = 5.4$  Hz, 1H,  $H_5$  Th), 4.22 (t,  $J = 7.0$  Hz, 2H,  $H_5$ ), 3.09 (ddq,  $J = 7.0, 7.0, 7.0$  Hz, 1H,  $H_2$ ), 2.83 (s, 4H,  $\text{CO}(\text{CH}_2)_2\text{CO}$ ), 2.67 (t,  $J = 7.0$  Hz, 2H,  $H_2$ ), 2.07 (tt,  $J = 7.4, 7.0$  Hz, 2H,  $H_4$ ), 1.78 (tt,  $J = 7.4, 7.0$  Hz, 2H,  $H_3$ ), 1.65–1.40 (m, 3H,  $H_{3'}$  y  $H_{4'}$ ), 1.25 (d,  $J = 7.0$  Hz, 3H,  $H_{1'}$ ), 0.86 (d,  $J = 6.3$  Hz, 6H,  $\text{CH}_3$ -4' y  $H_5$ ).



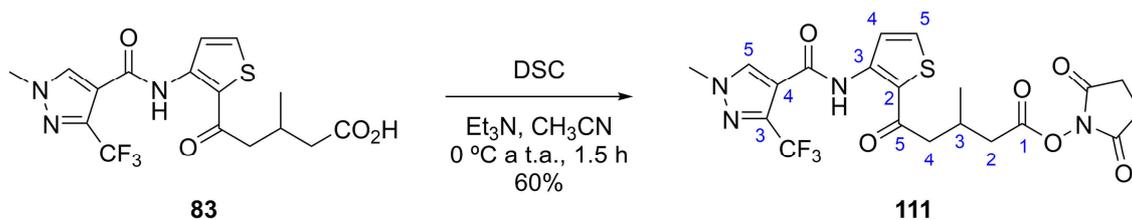
**6-(3-(1-Metil-3-(trifluorometil)-1H-pirazol-4-carboxamido)tiofen-2-il)hexanoato de 2,5-dioxopirrolidin-1-ilo (PPb-NHS, 106).** La activación del hapteno PPb (**80**, 15.2 mg, 39  $\mu\text{mol}$ ) proporcionó tras 2 h el éster activo PPb-NHS (**106**, 17 mg, 90%) como un aceite incoloro.

Datos espectroscópicos: **RMN-<sup>1</sup>H** (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  8.03 (s, 1H,  $H_5$  Pz), 7.57 (br s, 1H, CONH), 7.42 (d,  $J = 5.4$  Hz, 1H,  $H_4$  Th), 7.11 (d,  $J = 5.4$  Hz, 1H,  $H_5$  Th), 3.98 (s, 3H,  $\text{NCH}_3$ ), 2.82 (s, 4H,  $\text{CO}(\text{CH}_2)_2\text{CO}$ ), 2.72 (t,  $J = 7.7$  Hz, 2H,  $H_6$ ), 2.60 (t,  $J = 7.4$  Hz, 2H,  $H_2$ ), 1.77 (tt,  $J = 7.4, 7.4$  Hz, 2H,  $H_3$ ), 1.68 (tt,  $J = 7.7, 7.7$  Hz, 2H,  $H_5$ ), 1.55–1.44 (m, 2H,  $H_4$ ).



**3-Metil-5-(3-(1-metil-3-(trifluorometil)-1H-pirazol-4-carboxamido)tiofen-2-il)hexanoato de 2,5-dioxopirrolidin-1-ilo (PPm-NHS, 107).** La activación del hapteno PPm (**81**, 11.7 mg, 29  $\mu\text{mol}$ ) proporcionó tras 2.5 h el éster activo PPm-NHS (**107**, 8.4 mg, 58%, mezcla 1:1 de diastereoisómeros según RMN-<sup>1</sup>H) como un aceite amarillo.

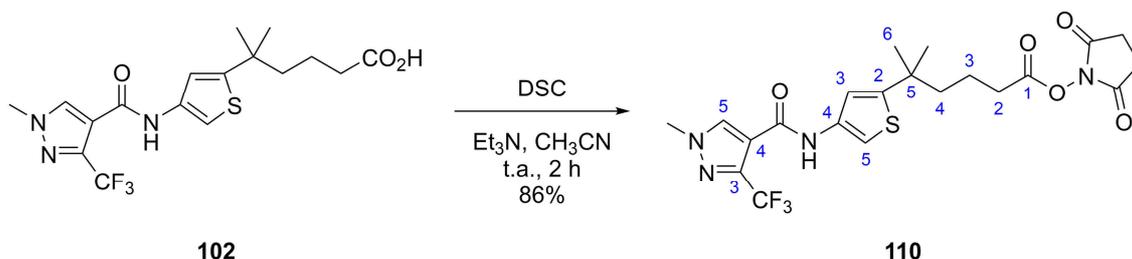
Datos espectroscópicos: **RMN-<sup>1</sup>H** (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  8.02 (s, 1H,  $H_5$  Pz), 7.63 (s, 1H, CONH), 7.34 (d,  $J = 5.4$  Hz, 1H,  $H_4$  Th), 7.13 (d,  $J = 5.4$  Hz, 1H,  $H_5$  Th), 3.98 (s, 3H,  $\text{NCH}_3$ ), 3.14 (ddq,  $J = 6.9, 6.9, 6.9$  Hz, 1H,  $H_5$ ), 2.81 (s, 4H,  $\text{CO}(\text{CH}_2)_2\text{CO}$ ), 2.57 (dd,  $J = 15.1, 5.8$  Hz, 1H,  $H_2$ ), 2.43 (dd,  $J = 15.1, 7.6$  Hz, 1H,  $H_2$ ), 2.15–2.01 (m, 1H,  $H_3$ ), 1.86–1.50 (m, 2H,  $H_4$ ), 1.29 (d,  $J = 6.9$  Hz, 3H,  $H_6$ ), 1.04 (d,  $J = 6.7$  Hz, 3H,  $\text{CH}_3$ -3).



**3-Metil-5-(3-(1-metil-3-(trifluorometil)-1H-pirazol-4-carboxamido)tiofen-2-il)-5-oxopen-tanoato de 2,5-dioxopirrolidin-1-ilo (PPo-NHS, 111).** La activación del

hapteno PPO (**83**, 20 mg, 49  $\mu\text{mol}$ ) proporcionó tras 1.5 h el éster activo PPO–NHS (**111**, 15 mg, 60%) como un aceite incoloro.

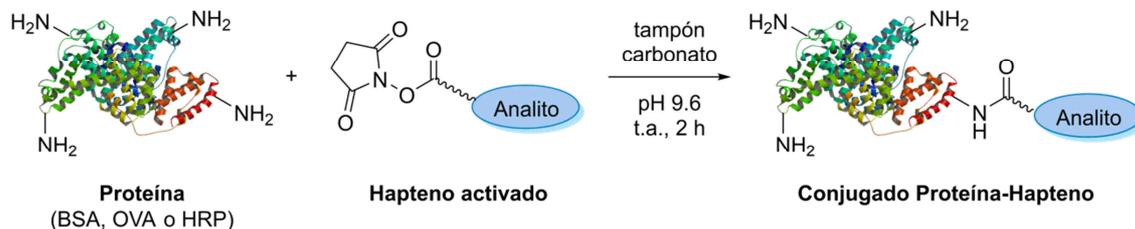
Datos espectroscópicos: **RMN- $^1\text{H}$**  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  11.68 (br s, 1H, CONH), 8.27 (d,  $J = 5.4$  Hz, 1H,  $H_5$  Th), 8.04 (s, 1H,  $H_5$  Pz), 7.54 (d,  $J = 5.4$  Hz, 1H,  $H_4$  Th), 4.04 (s, 3H,  $\text{NCH}_3$ ), 2.96 (dd,  $J = 15.6, 6.4$  Hz, 1H,  $H_4$ ), 2.83 (s, 4H,  $\text{CO}(\text{CH}_2)_2\text{CO}$ ), 2.89–2.71 (m, 3H,  $H_2, H_3$  y  $H_4$ ), 2.62 (dd,  $J = 16.8, 8.7$  Hz, 1H,  $H_2$ ), 1.17 (d,  $J = 6.3$  Hz, 3H,  $\text{CH}_3$ -3).



**5-Metil-5-(4-(1-metil-3-(trifluorometil)-1H-pirazol-4-carboxamido)tiopen-2-il)-hexanoato de 2,5-dioxopirrolidin-1-ilo (PPd'–NHS, 110).** La activación del hapteno PPd' (**102**, 22.9 mg, 57  $\mu\text{mol}$ ) proporcionó tras 2 h el éster activo PPd'–NHS (**110**, 24.4 mg, 86%) como un aceite incoloro.

Datos espectroscópicos: **RMN- $^1\text{H}$**  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  8.13 (s, 1H, CONH), 7.98 (s, 1H,  $H_5$  Pz), 7.45 (d,  $J = 1.5$  Hz, 1H,  $H_4$  Th), 6.74 (d,  $J = 1.5$  Hz, 1H,  $H_2$  Th), 3.95 (s, 3H,  $\text{NCH}_3$ ), 2.82 (s, 4H,  $\text{CO}(\text{CH}_2)_2\text{CO}$ ), 2.54 (t,  $J = 6.8$  Hz, 2H,  $H_2$ ), 1.79–1.53 (m, 4H,  $H_3$  y  $H_4$ ), 1.34 (s, 6H,  $\text{CH}_3$ -5 y  $H_6$ ).

### 5.5.2. Conjugación de haptenos a BSA, OVA y HRP



**Procedimiento para la obtención y purificación de conjugados.** Una disolución de hapteno activado en DMF anhidra se adicionó gota a gota y con agitación vigorosa sobre una disolución de proteína en tampón de tapizado (pH 9.6), y se incubó la reacción 2 h a temperatura ambiente. Las cantidades de hapteno y proteína empleadas en cada caso se muestran en la Tabla 5.1. Transcurrido dicho tiempo se

purificó el conjugado mediante cromatografía de filtración en gel (ver sección 5.1.3), empleando como eluyente PB (pH 7.4) a 5 mL/min y recogiendo fracciones de 1 mL.

**Tabla 5.1.** Cantidades de hapteno y proteína empleadas en la obtención de conjugados.

Conjugado	Proteína			Hapteno			
	V ( $\mu\text{L}$ ) <sup>a</sup>	C (mg/mL) <sup>b</sup>	n ( $\mu\text{mol}$ ) <sup>c</sup>	V ( $\mu\text{L}$ )	C (mM)	n ( $\mu\text{mol}$ )	Equiv. <sup>d</sup>
BSA-Hapteno	1800	15.0	0.41	200	50	10.0	24
OVA-Hapteno	1900	15.0	0.64	100	50	5.0	8
HRP-Hapteno	900	2.5	0.05	100	5	0.5	10

<sup>a</sup> Volumen de disolución. <sup>b</sup> Concentración de la disolución añadida. <sup>c</sup> Cantidad de sustancia. <sup>d</sup> Número de equivalentes de hapteno (moles de hapteno por cada mol de proteína).

**Almacenaje de los conjugados de BSA.** Las fracciones cromatográficas que contenían conjugado se reunieron, y la disolución resultante se esterilizó con filtros de 0.45  $\mu\text{m}$  y se llevó a una concentración de 1 mg/mL con tampón de elución estéril, para lo que se asumió que no hubo pérdidas de proteína en el proceso de purificación. Tras registrar el espectro de absorción UV/vis, la disolución se almacenó a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

**Almacenaje de los conjugados de OVA.** Las fracciones cromatográficas que contenían conjugado se reunieron, y la disolución resultante se llevó a una concentración de 1 mg/mL con tampón de elución al que se había añadido previamente timerosal hasta alcanzar el 0.01% (m/v). De nuevo, se asumió que no se produjeron pérdidas durante la purificación. Tras registrar el espectro de absorción UV/vis, la disolución se almacenó a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

**Cuantificación y almacenaje de los conjugados de HRP.** Las fracciones cromatográficas que contenían trazador enzimático se reunieron y se registró el espectro de absorción UV/vis de la disolución resultante. La cuantificación se llevó a cabo a partir del valor de absorbancia a 400 nm, asumiendo que la conjugación no modificó significativamente los espectros UV/vis de enzima y hapteno, y habiendo comprobado previamente que a dicha longitud de onda sólo absorbía la enzima. Se empleó un coeficiente de extinción molar a 400 nm para HRP de  $65.38\text{ mM}^{-1}\text{ cm}^{-1}$ , que se determinó previamente según se describe en la sección 5.5.3. Una vez cuantificado, el trazador enzimático se llevó a 600  $\mu\text{g/mL}$  con tampón de elución y luego a 300  $\mu\text{g/mL}$  con PBS-BSA-timerosal. La disolución final se almacenó a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

### 5.5.3. Determinación de la densidad hapténica

**Absorbancia diferencial.** Tras la medida de los espectros de absorción UV/vis de los conjugados proteína–hapteno, se asumió que los coeficientes de extinción molar de proteína y hapteno no variaron significativamente tras la reacción de conjugación y que la absorbancia del conjugado fue la suma de las absorbancias de ambos componentes por separado expresadas según la ley de Lambert–Beer (Ecuación 5.1). En dicha ecuación,  $\lambda$  es la longitud de onda,  $A_\lambda$  es la absorbancia a dicha longitud de onda,  $\epsilon_\lambda^P$  y  $\epsilon_\lambda^H$  son los coeficientes de extinción molar de la proteína y del hapteno, respectivamente,  $C_P$  y  $C_H$  son las concentraciones molares de la proteína y del hapteno en el conjugado, y  $l$  es la longitud de paso de la celda óptica.

$$A_\lambda = \epsilon_\lambda^P C_P l + \epsilon_\lambda^H C_H l \quad \text{Ecuación 5.1}$$

Para los conjugados BSA–hapteno y OVA–hapteno, la concentración de proteína ( $C_P$ ) se conoció de antemano tras asumir que no hubo pérdidas en el proceso de purificación, mientras que en el caso de los conjugados HRP–hapteno dicho valor se calculó a partir de la absorbancia a 400 nm como se ha descrito en la sección 5.5.2. De este modo, a partir de la Ecuación 5.1 se dedujo la Ecuación 5.2, mediante la que se calculó la relación molar hapteno/proteína (RM) indistintamente a partir de la absorbancia a 260 o 280 nm (zona de máxima absorción de la proteína).

$$RM = \frac{C_H}{C_P} = \frac{A_\lambda - \epsilon_\lambda^P C_P l}{\epsilon_\lambda^H C_P l} \quad \text{Ecuación 5.2}$$

Los coeficientes de extinción molar de haptenos y proteínas sin conjugar a las longitudes de onda de interés fueron determinados previamente. Se prepararon diluciones en serie de la especie de interés en PB y se registró su espectro de absorción UV/vis. Para una longitud de onda dada, se determinó el coeficiente de extinción molar como la pendiente de la recta ajustada por regresión lineal a la representación gráfica de la densidad óptica a dicha longitud de onda frente a la concentración de la especie.

**Análisis mediante MALDI–TOF.** La muestra de conjugado (100  $\mu$ g para conjugados basados en BSA y OVA, 15  $\mu$ g para conjugados basados en HRP), previamente disuelto según se ha descrito en la sección 5.5.2, se introdujo en una casete de diálisis de 300  $\mu$ L de capacidad y se sumergió en 2 L de agua MilliQ a 4 °C durante 2 h. Este ciclo se repitió un total de tres veces, y en el último ciclo se mantuvo la diálisis con agua MilliQ a 4 °C durante toda la noche para completar la eliminación de sales de la muestra. La

disolución remanente en la casete se liofilizó, y el residuo se redisolvió en agua MilliQ a una concentración aproximada de 0.3 µg/µL. De esta disolución se tomó 1 µL y se depositó sobre la placa de MALDI, donde se dejó evaporar el agua a temperatura ambiente. Posteriormente se añadieron 0.75 µL de matriz, y de nuevo se dejó evaporar. El residuo resultante se introdujo en el espectrómetro y se analizó en modo lineal positivo (1500 disparos por posición) en un rango de valores de  $m/z$  de 10000 a 120000. La placa se calibró previamente con 1 µL de mezcla de calibrado TOF/TOF™ en 13 posiciones. Por otra parte, la muestra se calibró mediante el método de “calibración externa cercana”, utilizando para ello el espectro de la proteína sin funcionalizar correspondiente (BSA, OVA o HRP) adquirido en una posición cercana a la de la muestra.

De los espectros de masas registrados se obtuvieron los valores de  $m/z$  para el conjugado de interés  $[(m/z)_c]$  y para la proteína correspondiente  $[(m/z)_p]$ . Por otra parte, se calculó el incremento de  $m/z$  esperado por cada molécula de hapteno  $[\Delta(m/z)]$  como el peso molecular del hapteno menos el peso molecular de la molécula de agua que se pierde al formarse el enlace amida. Con todos estos valores, la RM se calculó dividiendo la diferencia de valores de  $m/z$  observados entre el incremento esperado por molécula de hapteno (Ecuación 5.3).

$$RM = \frac{(m/z)_c - (m/z)_p}{\Delta(m/z)} \quad \text{Ecuación 5.3}$$

## 5.6. Generación de anticuerpos policlonales

Con cada conjugado BSA–hapteno preparado fueron inmunizadas dos hembras de conejo blanco New Zealand de aproximadamente 2 kg de peso. Se inmunizaron por lo tanto un total de diez conejos con los conjugados BSA–FP $\alpha$ , BSA–FP $b$ , BSA–PP $\alpha$ , BSA–PP $b$  y BSA–PP $m$ .

**Preparación de inóculos.** Cada dosis consistió en 300 µg de conjugado en 1 mL de emulsión 1:1 (v/v) entre PBS estéril y adyuvante de Freund. Se empleó adyuvante de Freund completo en la primera dosis, mientras que en las restantes las emulsiones se prepararon con adyuvante de Freund incompleto.

**Modo y pauta de inmunización.** Las inyecciones se administraron por vía subcutánea, distribuyendo el volumen total en varios puntos de la zona dorsal de los

animales. En cada caso se administraron un total de cuatro dosis espaciadas por intervalos de tres semanas.

**Obtención y tratamiento de muestras de sangre de conejo.** Transcurridos diez días desde la cuarta inmunización, los conejos fueron exsanguinados a través de la vena de la oreja y por punción intracardíaca, y las muestras de sangre obtenidas se dejaron coagular a 4 °C durante aproximadamente 24 h. Posteriormente el coágulo se eliminó por centrifugación de las muestras dos veces a 3150×g durante 15 min, dando lugar a los correspondientes antisueros de conejo.

Mediante el mismo procedimiento se obtuvieron antisueros a partir de muestras de sangre de 5-10 mL extraídas a través de la vena de la oreja diez días después de la tercera inmunización. Estas muestras se emplearon para controlar la correcta evolución de la respuesta inmunitaria. Dichos antisueros se diluyeron 1:1 (v/v) con PBS-BSA-timerosal estéril, y se almacenaron a 4 °C.

**Purificación y conservación de anticuerpos.** Los antisueros obtenidos a partir de la exsanguinación de los animales se diluyeron 1:1 (v/v) con SAS para provocar la precipitación salina de las proteínas que contenían. Tras eliminar el líquido sobrenadante por centrifugación a 3800×g durante 20 min, se llevó el sedimento al volumen original de suero con PBS estéril y se precipitó nuevamente como se ha descrito más arriba para obtener una suspensión de anticuerpo policlonal (pAb). Una alícuota de suspensión homogeneizada se diluyó 1:1 (v/v) con PBS-BSA-timerosal estéril para su uso diario. Tanto las alícuotas de trabajo como los pAbs precipitados se almacenaron a 4 °C.

## 5.7. Generación de anticuerpos monoclonales

### 5.7.1. Inmunización de ratones

Los conjugados que se utilizaron para la inmunización de ratones fueron BSA-FP $\alpha$ , BSA-FP $\beta$ , BSA-PP $\alpha$  y BSA-PP $\beta$ . Con cada uno de ellos se inmunizaron cuatro hembras de ratón blanco BALB/c de 6 a 8 semanas de edad, es decir, un total de 16 ratones.

**Preparación de inóculos.** Las tres primeras dosis consistieron en 100 µg de conjugado en un volumen de 200 µL de emulsión 1:1 (v/v) entre PBS estéril y adyuvante de Freund (completo en la primera inmunización e incompleto en las

restantes). La última dosis fue también de 100 µg de conjugado, pero esta vez disuelto en 200 µL de una mezcla 1:1 (v/v) de PB y PBS estéril.

**Modo y pauta de inmunización.** Todas las dosis se inyectaron por vía intraperitoneal. Se administraron inicialmente tres dosis espaciadas por intervalos de tres semanas. Por último, cada ratón fue inmunizado 4 días antes de su sacrificio y de la posterior fusión celular.

### 5.7.2. Generación de hibridomas

Los hibridomas se generaron por fusión celular de la línea de mieloma P3-X63-Ag8.653<sup>240</sup> con los linfocitos B extraídos del bazo de cada ratón inmunizado, siguiendo para ello una adaptación del protocolo originalmente descrito por Kohler y Milstein.<sup>124,241</sup>

**Cultivo de mielomas.** Con el fin de tener una cantidad suficiente de células para realizar la fusión con la proporción celular deseada, los mielomas se cultivaron en fase de crecimiento exponencial en medio incompleto durante los días previos a la fusión celular.

**Extracción y aislamiento de linfocitos.** Una vez sacrificado el ratón, se exanguinó mediante punción intracardíaca y se extirpó su bazo, del que se extrajeron las células sobre medio completo por presión suave y continuada con el émbolo de una jeringa estéril. Los eritrocitos se lisaron por choque osmótico con 1 mL de tampón de lisis a 4 °C durante 1 min, y tras lavar los linfocitos con medio completo a 4 °C, se filtró para eliminar los posibles coágulos.

**Fusión celular y cultivo de hibridomas.** Los linfocitos se mezclaron con los mielomas en proporción linfocito/mieloma 4:1 y se lavaron 3 veces con medio incompleto. Tras eliminar completamente el medio por centrifugación y decantación, se añadió 1 mL de PEG 1500 a lo largo de 1 min para inducir la fusión entre células. Posteriormente se enrasó a 50 mL con medio completo y se dejaron reposar las células a temperatura ambiente durante 30 min. Transcurrido dicho tiempo, se recogieron las células por centrifugación, se resuspendieron en medio post-fusión y se sembraron en microplacas de cultivo de 96 pocillos a razón de 100 µL por pocillo de medio conteniendo entre  $1.5 \cdot 10^5$  y  $2 \cdot 10^5$  linfocitos, y se introdujeron en el incubador. Pasadas 24 h se añadieron 100 µL por pocillo de medio HAT y se mantuvieron los cultivos en el incubador durante 10–12 días desde el día de la fusión.

### 5.7.3. Obtención de antisueros de ratón

Las muestras de sangre de ratón obtenidas tras el sacrificio de cada animal se dejaron coagular a 4 °C durante aproximadamente 24 h. Posteriormente el coágulo se eliminó por centrifugación de las muestras dos veces a 9660×g durante 15 min. Los antisueros de ratón obtenidos (antisueros de fusión) se diluyeron 1/5 con PBS-BSA-timerosal estéril, y se almacenaron a 4 °C.

Mediante este mismo procedimiento se obtuvieron antisueros a partir de muestras de sangre extraídas mediante punción submandibular diez días después de la tercera inmunización, que se emplearon para controlar la correcta evolución de la respuesta inmunitaria. Dichos antisueros se diluyeron y almacenaron del mismo modo que los obtenidos tras el sacrificio de los animales.

### 5.7.4. Aislamiento y conservación de hibridomas de interés

**Determinación de la eficiencia de la fusión.** Las placas de cultivos se examinaron al microscopio y se calculó la eficiencia de la fusión como el porcentaje de pocillos que contenían al menos un clon visible al microscopio. El cálculo se hizo justo antes de iniciar el experimento para la selección de hibridomas.

**Selección de hibridomas (ELISA competitivo diferencial).** Los pocillos que contenían hibridomas de interés se escogieron analizando cada sobrenadante de cultivo mediante ELISA competitivo indirecto en dos pocillos adyacentes, uno de ellos a una concentración fija de analito (100 nM) y el otro sin analito (blanco).<sup>126</sup> Se siguió un procedimiento similar al que se describe más adelante en la sección 5.8.2, pero con algunas diferencias:

- Por cada placa de cultivos se tapizaron dos microplacas de ELISA con 100 µL por pocillo de disolución de conjugado OVA–hapteno homólogo a 100 ng/mL en tampón de tapizado.
- Los ensayos competitivos se realizaron mezclando en cada pocillo 50 µL de sobrenadante con 50 µL de disolución de analito 200 nM en PBS (100 nM en ensayo) o bien con 50 µL de PBS sin analito.
- Los 50 µL de sobrenadante de dos pocillos de cultivo sin crecimiento se reemplazaron por 50 µL de una dilución 1/1000 de antisuero de fusión del

correspondiente ratón en PBS-T. Estos pocillos se emplearon como control positivo.

El criterio de selección fue una señal superior a 0.5 en el blanco (reconocimiento del conjugado, resultado positivo) y una inhibición igual o superior al 80% en el pocillo con analito (reconocimiento del conjugado y del analito, resultado competitivo).

**Selección de hibridomas (ELISA competitivo bidimensional).** Los sobrenadantes de los pocillos con resultado positivo y competitivo en el ELISA diferencial se reanalizaron mediante ELISA competitivo indirecto (ver sección 5.8.2), tapizando placas con conjugado homólogo a 10 y 100 ng/mL y ensayando diluciones 1/10, 1/50, 1/250 y 1/1250 de los sobrenadantes frente a concentraciones de analito de 0, 10 y 100 nM. La selección definitiva de los pocillos con hibridomas de interés se realizó en función de la señal máxima obtenida en ausencia de analito y del grado de inhibición inducido por el analito en este ensayo.

**Clonaje y aislamiento de hibridomas.** Cada sobrenadante de interés se diluyó en medio HT-HFCS y se sembró en una nueva microplaca de cultivo de 96 pocillos a razón de 100  $\mu$ L y 2 células por pocillo (método de dilución límite). Pasados de 7 a 10 días, se inspeccionaron al microscopio todos los pocillos, se localizaron aquellos que contenían un solo clon, y después todos los sobrenadantes se analizaron mediante ELISA competitivo diferencial, como se ha descrito previamente. El cruce de los resultados de la inspección visual y del ELISA diferencial permitió seleccionar en cada caso un pocillo adecuado para continuar con el clonaje. Este ciclo se repitió hasta que se aseguró la monoclonalidad de la línea celular (como mínimo dos ciclos).

**Expansión y conservación de hibridomas.** Cada hibridoma clonado se cultivó en HT-HFCS, aumentando de forma progresiva el volumen del recipiente del cultivo, hasta tener una cantidad aproximada de 100 mL de sobrenadante de cultivo. Una parte de los cultivos se reservó para la producción del correspondiente anticuerpo monoclonal (sección 5.7.5), mientras que las células restantes fueron resuspendidas en medio de congelación a una concentración aproximada de  $10^7$  células/mL y distribuidas en 4 criotubos de 1 mL, que se congelaron primero a  $-80$  °C y 24 h después en  $N_2$  líquido.

### 5.7.5. Obtención y purificación de anticuerpos monoclonales

**Cultivos celulares.** Cada hibridoma se expandió por divisiones sucesivas de los cultivos en placas Petri hasta tener una cantidad entre 100 y 200 mL de sobrenadante,

y en este punto se dejó de dividir el cultivo y se mantuvo en el incubador hasta el consumo total de los nutrientes del medio. Transcurridos 7–10 días se centrifugó el sobrenadante para eliminar las células y se mezcló lentamente en proporción 1:1 (v/v) con SAS, con el fin de provocar la precipitación de las proteínas presentes en el medio, incluidas las inmunoglobulinas. La suspensión se almacenó a 4 °C hasta la purificación del anticuerpo monoclonal (mAb).

**Purificación de anticuerpos monoclonales.** La suspensión homogeneizada de mAb precipitado se centrifugó a 3800×g durante 20 min y se eliminó el sobrenadante por decantación. El sedimento se redisolvió en PB20 (pH 7.4), se filtró a través de una membrana de nitrocelulosa (0.45 µm de diámetro de poro), y se tomó una alícuota del filtrado (500 µL) que se almacenó a 4 °C como control. El resto del filtrado se purificó mediante cromatografía de afinidad (sección 5.1.4), cargando la columna con PB20 a 3 mL/min y eluyendo después con tampón citrato sódico 100 mM (pH 2.5) también a 3 mL/min. Se recogieron fracciones de 850 µL que se neutralizaron con 150 µL de tampón Tris-HCl 1 M (pH 9.5). Las fracciones cromatográficas que contenían mAb se reunieron y se filtraron por centrifugación a través de membranas semipermeables con el objetivo de concentrar el anticuerpo y cambiar la mezcla de tampones por PB20. La fracción no filtrada se llevó a un volumen conocido con dicho tampón y se cuantificó la concentración de mAb a partir de su absorbancia a 280 nm, considerando en todos los casos un coeficiente de extinción a dicha longitud de onda de  $1.4 \text{ L g}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ .

**Conservación de anticuerpos monoclonales.** Una vez cuantificado, el mAb purificado se llevó a una concentración de 2 mg/mL con PB20 y se mezcló lentamente en proporción 1:1 (v/v) con SAS para precipitar el anticuerpo. Una alícuota de la suspensión homogeneizada del mAb precipitado se llevó a una concentración de anticuerpo de 500 µg/mL con PBS-BSA-timerosal estéril para su uso diario. Tanto la alícuota de trabajo como el resto de la suspensión de mAb precipitado se almacenaron a 4 °C.

## 5.8. ELISA competitivo

### 5.8.1. **Formato de anticuerpo inmovilizado con detección directa**

En este formato de ensayo, también denominado simplemente formato directo, el tapizado se llevó a cabo a 4 °C con las placas selladas durante toda la noche, mediante

la adición de 100  $\mu\text{L}$  por pocillo de una disolución del anticuerpo de interés en tampón de tapizado. Tras esta incubación, la placa se lavó 4 veces con disolución de lavado. La etapa de competición se efectuó mezclando en cada pocillo 50  $\mu\text{L}$  de patrón, muestra o blanco de analito diluido en PBS y 50  $\mu\text{L}$  de trazador enzimático (conjugado HRP–hapteno homólogo o heterólogo) diluido en PBS-T. Tras una incubación a temperatura ambiente durante 1 h, la placa se lavó nuevamente como se ha descrito anteriormente. La presencia de trazador enzimático retenido en los pocillos por el anticuerpo se reveló colorimétricamente por adición de 100  $\mu\text{L}$  por pocillo de disolución de revelado recién preparada, y la reacción enzimática se detuvo a los 10 min con 100  $\mu\text{L}$  por pocillo de disolución de parada. Inmediatamente después, se leyó la absorbancia a 492 nm de los pocillos, que se empleó como señal del ensayo.

Cuando se ensayaron anticuerpos monoclonales, en algunos casos se empleó una variante de este formato denominada ensayo de captura, en la que los pocillos se tapizaron toda la noche a 4 °C con 100  $\mu\text{L}$  por pocillo de GAM a 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  en tampón de tapizado. Tras la incubación, la placa se lavó 4 veces con disolución de lavado y se adicionaron 100  $\mu\text{L}$  por pocillo del anticuerpo de interés diluido en PBS-T. Tras incubar las placas 1 h a temperatura ambiente y lavarlas como se ha indicado previamente, se llevó a cabo la competición y el resto de etapas del inmunoensayo tal y como se ha descrito en el párrafo anterior.

### **5.8.2. Formato de conjugado inmovilizado con detección indirecta**

En este formato de ensayo, también conocido como formato indirecto, el tapizado se efectuó a temperatura ambiente, con las placas selladas durante toda la noche, con conjugado OVA–hapteno (homólogo o heterólogo) diluido en tampón de tapizado y distribuido a razón de 100  $\mu\text{L}$  por pocillo. A continuación, la placa se lavó 4 veces con disolución de lavado. La etapa de competición tuvo lugar tras mezclar en cada pocillo 50  $\mu\text{L}$  de patrón, muestra o blanco de analito diluido en PBS y 50  $\mu\text{L}$  de anticuerpo diluido en PBS-T, y tras incubar la placa 1 h a temperatura ambiente se volvió a lavar 4 veces. Después se añadieron 100  $\mu\text{L}$  por pocillo de disolución de anticuerpo secundario (RAM–HRP diluido 1/2000 en PBS-T para ensayos con anticuerpos de ratón y GAR–HRP diluido 1/10<sup>4</sup> en PBS-T con un 10% [v/v] de SBA para ensayos con anticuerpos policlonales de conejo). Una vez incubada la placa durante 1 h a temperatura ambiente, se lavó por última vez y se generó la señal del ensayo tal y como se ha descrito para el formato directo.

### 5.8.3. Lectura y tratamientos matemático y gráfico de resultados

La señal del ensayo se midió espectrofotométricamente a 492 nm (máxima absorción de la forma oxidada de la OPD), tomando como referencia la lectura a 650 nm. La señal de los patrones se representó frente a la concentración de analito en escala semilogarítmica, y los puntos experimentales se ajustaron por regresión a una función logística de 4 parámetros,<sup>242</sup> recogida en la Ecuación 5.4 y cuya representación gráfica corresponde a una curva sigmoide.

$$y = \frac{A - D}{1 + \left(\frac{x}{C}\right)^B} + D \quad \text{Ecuación 5.4}$$

En la Ecuación 5.4,  $x$  es la concentración de analito, y la señal del ensayo,  $A$  la asíntota máxima de la curva ( $A_{\text{máx}}$ ),  $B$  un parámetro positivo proporcional al valor absoluto de la pendiente en el punto de inflexión,  $C$  la concentración de analito en el punto de inflexión y  $D$  la asíntota mínima de la curva ( $A_{\text{mín}}$ ). La señal del ensayo también puede expresarse en función del porcentaje de reducción de la señal ( $\alpha$ ), como se muestra en la Ecuación 5.5.

$$y = D + (A - D) \left(1 - \frac{\alpha}{100}\right) \quad \text{Ecuación 5.5}$$

Si se combinan la Ecuación 5.4 y la Ecuación 5.5 y se despeja la concentración de analito ( $x$ ) se obtiene la Ecuación 5.6, que proporciona la concentración de analito necesaria para inhibir la interacción anticuerpo–conjugado hasta reducir la señal máxima del ensayo en un porcentaje  $\alpha$  respecto de la diferencia entre las asíntotas de la curva ( $IC_{\alpha}$ ).

$$IC_{\alpha} = C \left(\frac{\alpha}{100 - \alpha}\right)^{\frac{1}{B}} \quad \text{Ecuación 5.6}$$

Puesto que el valor de  $D$  ( $A_{\text{mín}}$ ) tiende a cero en ausencia de interacciones inespecíficas que den lugar a una señal residual, se puede redefinir  $IC_{\alpha}$  como la concentración de analito que disminuye la señal máxima del ensayo un porcentaje  $\alpha$ , y en particular el parámetro  $C$ , que correspondería a la  $IC_{50}$ , es decir, la concentración de analito necesaria para reducir la señal máxima del ensayo a la mitad. Este último valor, proporcionado por el ajuste matemático, se utilizó para estimar la afinidad de los anticuerpos y la sensibilidad de los inmunoensayos. Por otra parte, se definió el límite de detección teórico del ensayo (LOD) como el valor de  $IC_{10}$ . Finalmente, el rango de

trabajo se estableció en el intervalo de concentraciones desde IC<sub>20</sub> hasta IC<sub>80</sub>. Los valores numéricos de IC<sub>10</sub>, IC<sub>20</sub> e IC<sub>80</sub> se calcularon empleando la Ecuación 5.6.

Cuando fue necesario, los valores de absorbancia de cada curva de inhibición (A<sub>i</sub>) se normalizaron respecto al valor de absorbancia experimental obtenido en ausencia de analito (A<sub>0</sub>) mediante la Ecuación 5.7.

$$A_{\text{norm},i} = \frac{A_i}{A_0} \quad \text{Ecuación 5.7}$$

## 5.9. Caracterización de anticuerpos

### 5.9.1. Evaluación de la afinidad

**Evaluación mediante ELISA competitivo bidimensional directo.** Para cada combinación de anticuerpo y trazador enzimático (conjugado HRP–hapteno homólogo o heterólogo) se empleó una microplaca de ELISA y se siguió el protocolo descrito en la sección 5.8.1. En el caso de ensayos con anticuerpos policlonales se evaluaron diluciones de pAb en ensayo de  $1/3 \cdot 10^3$ ,  $1/10^4$  y  $1/3 \cdot 10^4$  para el tapizado y concentraciones de trazador de 10, 30, 100 y 300 ng/mL para la etapa de competición. Cuando se emplearon anticuerpos monoclonales, se estudiaron concentraciones de mAb de 300 y 1000 ng/mL para el tapizado y concentraciones de trazador de 1, 3, 10, 30, 100 y 300 ng/mL para la competición. En ambos casos, cada combinación de concentraciones se evaluó frente a una curva estándar de analito de siete puntos y un blanco, preparada por dilución en serie partiendo de 10 μM con factor de dilución 10. El primer punto de la curva se preparó a partir de una disolución stock concentrada 1000× y preparada en DMF. De este estudio se obtuvo una colección de curvas de inhibición, de las que se escogió como representante de cada combinación anticuerpo/trazador aquella curva con un valor de A<sub>máx</sub> cercano a 1 y mayor de 0.8, y con el menor valor de IC<sub>50</sub>. Se consideró que los anticuerpos con mayor afinidad hacia el analito fueron aquellos que presentaron valores de IC<sub>50</sub> inferiores.

**Evaluación mediante ELISA competitivo bidimensional indirecto.** Para cada combinación de anticuerpo y conjugado OVA–hapteno (homólogo o heterólogo) se empleó una microplaca de ELISA y se siguió el protocolo descrito en la sección 5.8.2. En los ensayos con ambos tipos de anticuerpos se tapizó con disoluciones de conjugado a 100 y 1000 ng/mL. La competición en los ensayos con anticuerpos policlonales se llevó

a cabo con diluciones de pAb en ensayo de  $1/10^3$ ,  $1/3 \cdot 10^3$ ,  $1/10^4$ ,  $1/3 \cdot 10^4$ ,  $1/10^5$  y  $1/3 \cdot 10^5$ . En el caso de los estudios con anticuerpos monoclonales, se evaluaron concentraciones de mAb en ensayo de 1, 3, 10, 30, 100 y 300 ng/mL para la etapa de competición. La preparación de las curvas estándar de analito, la selección de la curva estándar representante de cada combinación anticuerpo/conjugado y la estimación de la afinidad se llevaron a cabo del mismo modo que en el formato directo.

**Cálculo de constantes de equilibrio.** En algunos casos, la señal obtenida mediante ELISA competitivo bidimensional se utilizó para calcular las constantes de equilibrio de disociación de los complejos anticuerpo/analito ( $K_{D,A}$ ) y anticuerpo/conjugado ( $K_{D,C}$ ), ya fueran en disolución o en fase sólida. Para ello, se asumió que la estequiometría de las interacciones fue 1:1 en todos los casos, que la inmunoadsorción seguía el comportamiento descrito por el modelo de Langmuir,<sup>132,234</sup> y que el número de moléculas retenidas en el equilibrio era despreciable frente a las que quedaban en disolución. La superficie recubierta de los pocillos se consideró como un conjunto homogéneo de sitios de unión equivalentes (paratopos de los anticuerpos en el formato directo y moléculas de hapteno del conjugado OVA–hapteno en el formato indirecto), siendo posible sólo la adsorción de una molécula por sitio. La fracción de recubrimiento de la superficie debida a la interacción de anticuerpo y conjugado ( $\theta_c$ ), deducida del modelo de adsorción aplicable en cada formato, se igualó al cociente de la señal obtenida en cada pocillo (A) y la señal máxima obtenida en condiciones de saturación ( $A_{sat}$ ). En el formato indirecto se consideró la adsorción del anticuerpo al conjugado inmovilizado y se obtuvo la Ecuación 5.8, en la que la concentración libre de anticuerpo, [B], se calculó a partir de la Ecuación 5.9 teniendo en cuenta la extensión del equilibrio en disolución con el analito. Por su parte, en el formato directo, ya fuera con inmovilización directa del anticuerpo o con su captura haciendo uso de GAM, se consideró la adsorción competitiva de analito y conjugado HRP–hapteno al anticuerpo inmovilizado, lo que proporcionó la Ecuación 5.10.

$$\theta_c = \frac{A}{A_{sat}} = \frac{[B]}{K_{D,C} + [B]} \Rightarrow \boxed{A = \frac{A_{sat}[B]}{K_{D,C} + [B]}} \quad \text{Ecuación 5.8}$$

$$[B] = \frac{[B]_0 - [A]_0 - K_{D,A}}{2} + \sqrt{\frac{1}{4}([A]_0 + [B]_0 + K_{D,A})^2 - [A]_0[B]_0} \quad \text{Ecuación 5.9}$$

$$\theta_c = \frac{A}{A_{\text{sat}}} = \frac{[C]_0}{K_{D,C} \left( 1 + \frac{[A]_0}{K_{D,A}} \right) + [C]_0} \Rightarrow A = \frac{A_{\text{sat}} [C]_0}{K_{D,C} \left( 1 + \frac{[A]_0}{K_{D,A}} \right) + [C]_0} \quad \text{Ecuación 5.10}$$

En las ecuaciones anteriores,  $[A]_0$ ,  $[B]_0$  y  $[C]_0$  son respectivamente las concentraciones totales de analito, anticuerpo y conjugado. Los valores experimentales hallados mediante ELISA competitivo bidimensional en ambos formatos se ajustaron matemáticamente a su correspondiente ecuación, siendo precisamente los parámetros de ajuste las constantes de equilibrio deseadas, además de la señal máxima en condiciones de saturación.

### 5.9.2. Evaluación de la especificidad

Los estudios de especificidad se llevaron a cabo mediante ELISA competitivo indirecto (sección 5.8.2) con conjugados OVA–hapteno homólogos, empleando las concentraciones óptimas de inmunorreactivos determinadas por ensayo bidimensional. En cada ensayo se empleó una curva estándar del analito de interés (X) y otra del posible analito competidor (Y), ambas preparadas de igual forma, tal y como se realizó en los estudios de afinidad (sección 5.9.1). Tras obtener los parámetros de las curvas de inhibición ajustadas matemáticamente, se calculó la reactividad cruzada ( $RC_Y$ ) como el porcentaje del cociente entre los valores observados de  $IC_{50}$  del analito competidor y del analito de interés (Ecuación 5.11).

$$RC_Y = \frac{IC_{50}(Y)}{IC_{50}(X)} \cdot 100\% \quad \text{Ecuación 5.11}$$

### 5.9.3. Isotipación de anticuerpos monoclonales

La isotipación de las cadenas pesadas y ligeras de los anticuerpos monoclonales se llevó a cabo mediante ELISA no competitivo con detección indirecta, siguiendo las instrucciones de los fabricantes de los kits y reactivos empleados en el experimento. Por una parte, se emplearon seis anticuerpos de conejo anti-cadena pesada de inmunoglobulina de ratón (RAM-antiH) capaces de reconocer cadenas pesadas  $\gamma_1$ (IgG<sub>1</sub>),  $\gamma_{2a}$ (IgG<sub>2a</sub>),  $\gamma_{2b}$ (IgG<sub>2b</sub>),  $\gamma_3$ (IgG<sub>3</sub>),  $\mu$ (IgM) y  $\alpha$ (IgA). Por otra parte, se emplearon dos anticuerpos de conejo anti-cadena ligera de inmunoglobulina de ratón (RAM-antiL) para el reconocimiento de cadenas ligeras  $\kappa$  y  $\lambda$ .

**Protocolo para la isotipación.** Cada mAb se diluyó a 1 µg/mL en tampón de tapizado y se distribuyeron 100 µL por pocillo en 8 pocillos. Tras incubar la placa a 4 °C durante toda la noche, se lavó 4 veces con disolución de lavado. Posteriormente se añadió a cada pocillo 100 µL de disolución del correspondiente RAM-antiH (diluciones 1/2) o RAM-antiL (anti-κ diluido  $2.4 \cdot 10^5$  veces y anti-λ  $4 \cdot 10^4$  veces) en PBS-T, y se dejó incubar la placa a temperatura ambiente durante 1 h. Tras lavar la placa, se añadieron 100 µL por pocillo de GAR-HRP (suministrado con el kit) diluido  $4 \cdot 10^3$  veces en PBS-T, y se incubó la placa a temperatura ambiente durante 1 h. Tras un último lavado, la señal se generó y registró como se describe en la sección 5.8.

#### **5.9.4. Caracterización de anticuerpos monoclonales mediante SPR**

Todos los análisis se llevaron a cabo empleando chips de oro CM5 Serie S. Los chips se acondicionaron antes de cualquier uso mediante inyección por triplicado de hidrócloruro de glicina (Gly·HCl) 15 mM, pH 1.5, a 30 µL/min. Después, las respuestas de las cuatro celdas de análisis del chip se normalizaron con glicerol siguiendo el asistente del software del equipo.

##### *5.9.4.1. Preparación de la superficie de análisis*

**Inmovilización del anticuerpo de captura.** Inicialmente se procedió a la unión covalente de GAM sobre la matriz de dextrano del chip para actuar como reactivo de captura en los análisis. La inmovilización se llevó a cabo mediante el método del éster activo, empleando el asistente incorporado en el software del equipo Biacore y los reactivos incluidos en el kit Amine Coupling Kit (EDC·HCl, NHS y etanolamina) según las instrucciones del fabricante. En primer lugar se hizo pasar una disolución 1:1 (v/v) de EDC·HCl y NHS en agua MilliQ para formar ésteres de *N*-hidroxisuccinimidilo en la superficie del chip. Posteriormente se inyectó una disolución de GAM a 50 µg/mL en tampón acetato sódico 50 mM, pH 5.0, hasta alcanzar el incremento de respuesta deseado. Por último, los ésteres activos que no habían reaccionado se desactivaron haciendo pasar etanolamina por la superficie del chip.

Antes de llevar a cabo la inmovilización, se determinó el pH óptimo para el proceso mediante inyecciones sucesivas de disoluciones de GAM a 50 µg/mL en diferentes tampones de acetato sódico 50 mM de pH variable sin haber activado todavía la superficie con EDC·HCl y NHS. Se seleccionó el tampón con el que se observó un

incremento de la respuesta simultáneamente más rápido y elevado, que reflejó una difusión más rápida y en mayor cantidad del anticuerpo hacia la superficie del chip.

Las variaciones de respuesta producidas sobre el chip debidas a la inmovilización del ligando y la posterior interacción con el analito están relacionadas estequiométricamente mediante la Ecuación 5.12.<sup>175</sup> En esta ecuación,  $\Delta R_{GAM}$  ( $R_L$  en el ámbito de la técnica) es el incremento de respuesta debido al GAM inmovilizado,  $\Delta R_{PP}$  (usualmente referido como  $R_{m\acute{a}x}$ ) es el incremento máximo esperado en la respuesta debido al penthiopyrad reconocido durante los ensayos,  $Mw_{GAM}$  y  $Mw_{PP}$  son respectivamente los pesos moleculares de GAM y penthiopyrad, y  $n$  el coeficiente estequiométrico del anticuerpo monoclonal (es decir,  $n = 2$ ). Considerando el formato del ensayo, se programó el instrumento para inmovilizar aproximadamente 5000 RU de GAM en las cuatro celdas del chip, de modo que el valor esperado de  $\Delta R_{PP}$  fuera de 24 RU. Los valores finales de  $\Delta R_{GAM}$  estuvieron en el rango de 5100 a 5300 RU.

$$\frac{\Delta R_{GAM}}{Mw_{GAM}} = \frac{1}{n} \cdot \frac{\Delta R_{PP}}{Mw_{PP}} \quad \text{Ecuación 5.12}$$

**Optimización de las condiciones de regeneración.** La búsqueda de condiciones óptimas para la regeneración de las superficies se llevó a cabo mediante ciclos sucesivos de inyección de una disolución del anticuerpo monoclonal PPM#11 a 15  $\mu\text{g/mL}$  (5 min, 10  $\mu\text{L/min}$ ) seguida de la inyección de los reactivos de regeneración a ensayar. En cada caso se realizaron cinco ciclos y se fueron probando condiciones cada vez más agresivas. Tras ensayar disoluciones de Gly-HCl 10 mM a pH 3.0, 2.5, 2.0 y 1.5 (30 s, 30  $\mu\text{L/min}$ ), se decidió utilizar la disolución a pH 2.0 seguida de una segunda regeneración con NaOH 10 mM (30 s, 30  $\mu\text{L/min}$ ).

#### 5.9.4.2. Análisis cinético de las interacciones anticuerpo/penthiopyrad

Los análisis se llevaron a cabo en las celdas 2, 3 y 4 de los chips, empleando la celda 1 como referencia en los tres casos. Este diseño permitió realizar ensayos simultáneamente con tres anticuerpos monoclonales. Los mAbs ensayados fueron PPM#11, PPM#13, PPM#43, PPM#47, PPM#410 y PPM#412.

**Procedimiento de análisis.** En cada ciclo se inyectaron en primer lugar de forma secuencial disoluciones de los tres mAbs a ensayar a 15  $\mu\text{g/mL}$  (300 s, 10  $\mu\text{L/min}$ ) para su captura, haciendo pasar cada uno únicamente por su correspondiente celda de análisis (2, 3 o 4). Posteriormente se hizo pasar por todas las celdas una disolución que

contenía penthiopyrad y conjugado HRP-PPm (120 s, 30  $\mu\text{L}/\text{min}$ ) a concentraciones variables en cada ciclo, seguida de tampón de ensayo para producir la disociación de los componentes retenidos en la superficie (10 min, 30  $\mu\text{L}/\text{min}$ ). Por último, la superficie de todas las celdas se regeneró empleando las condiciones descritas anteriormente (ver sección 5.9.4.1), y se estabilizó la respuesta hasta el inicio del siguiente ciclo con tampón de ensayo (10 min, 30  $\mu\text{L}/\text{min}$ ). Las concentraciones de conjugado HRP-PPm y penthiopyrad oscilaron entre 1 y 500 nM, y se intercalaron de forma aleatoria ciclos de control sin conjugado ni fungicida, al igual que lo fueron los tres primeros ciclos del experimento (*startup*).

**Tratamiento de datos.** Para cada mAb ensayado se representó gráficamente la diferencia de respuesta entre la correspondiente celda de análisis y la celda de referencia en el intervalo de tiempo de la interacción. Las líneas base de las representaciones obtenidas (una por cada disolución de penthiopyrad y HRP-PPm inyectada) se normalizaron entre sí para hacerlas coincidir. Por último, se realizó un ajuste de los resultados al modelo *Heterogeneous Analyte* implementado en el software del equipo, que considera una competición entre dos analitos (penthiopyrad y HRP-PPm) por unirse al ligando (el mAb ensayado), y permite obtener las constantes de velocidad y de equilibrio para ambas interacciones.

## 5.10. Optimización y desarrollo de inmunoensayos

### 5.10.1. Optimización de concentraciones de inmunorreactivos

Las combinaciones de inmunorreactivos para los inmunoensayos a desarrollar fueron seleccionadas a partir de los resultados obtenidos mediante ELISA competitivo bidimensional (sección 5.9.1). De dicho estudio, se escogió la pareja anticuerpo/conjugado (homólogo o heterólogo) que dio lugar al ensayo más sensible (menor valor de  $\text{IC}_{50}$ ) en cada formato de ensayo (anticuerpo inmovilizado o conjugado inmovilizado). Posteriormente, se repitió el ensayo con los inmunorreactivos seleccionados manteniendo constante la concentración de la especie de tapizado y variando la concentración de la de competición, hasta lograr un valor de  $A_{\text{máx}}$  entre 1.0 y 1.3. Siguiendo esta metodología, se seleccionó para continuar con su optimización y desarrollo un total de cuatro inmunoensayos, dos por cada fungicida estudiado.

### 5.10.2. Optimización de la curva estándar

Una vez seleccionados los inmunoensayos a desarrollar, para cada uno se buscó la serie de patrones de analito que mejor permitió definir la forma de la correspondiente curva de inhibición. Se llevaron a cabo los inmunoensayos como se describe en la sección 5.8 usando las concentraciones de inmunorreactivos (anticuerpo y conjugado) óptimas en cada caso. En la competición se prepararon diversas curvas estándar de analito formadas por siete patrones, preparados por dilución en serie, y un blanco, variando entre ellas la concentración del primer patrón y el factor de dilución. Tras procesar los resultados, se usó como criterio de selección la presencia de 4 a 6 puntos en el intervalo  $IC_{10}$ – $IC_{90}$ , de 1 a 2 puntos en la asíntota inferior y de 2 a 3 puntos en la asíntota superior.

### 5.10.3. Influencia del pH

**Ensayos de influencia del pH.** Los inmunoensayos en formatos directo e indirecto seleccionados se llevaron a cabo según se describe en la sección 5.8, usando las concentraciones de inmunorreactivos óptimas en cada caso. Para cada valor de pH a ensayar, la competición se llevó a cabo mezclando por duplicado 50  $\mu$ L de curva estándar en agua MilliQ con 50  $\mu$ L por pocillo de disolución del inmunorreactivo de competición disuelto en un tampón a dicho pH y preparado de tal manera que la fuerza iónica, la concentración total del sistema tampón y la concentración de Tween-20 en ensayo fuesen iguales a las de la mezcla PBS/PBS-T 1:1 (v/v) (166 mM, 10 mM y 0.025% v/v, respectivamente) empleada habitualmente. Para los ensayos a pH 8.5 y 9.0 se empleó tampón borato, mientras que para los ensayos a pH 9.5 y 10.0 se utilizó tampón carbonato. En todos los demás casos (ensayos a pH 5.0, 5.5, 6.0, 6.5, 7.0, 7.4 y 8.0) se usó tampón fosfato.

**Preparación de tampones fosfato y carbonato.** Para cada valor de pH se preparó una disolución precursora de la especie ácida 20 mM ( $NaH_2PO_4$  para tampón fosfato y  $NaHCO_3$  para tampón carbonato) y otra de la especie básica 20 mM ( $Na_2HPO_4$  para tampón fosfato y  $Na_2CO_3$  para tampón carbonato), ambas con un 0.05% (v/v) de Tween-20 y con la concentración necesaria de NaCl para lograr una fuerza iónica de 166 mM en ensayo. Las disoluciones precursoras se mezclaron lentamente entre sí hasta obtener el tampón con el pH deseado.

**Preparación de tampones borato.** Aproximadamente 90 mL de una disolución de  $\text{H}_3\text{BO}_3$  (2 mmol), Tween-20 (50  $\mu\text{L}$ ) y NaCl (cantidad necesaria para lograr una fuerza iónica de 166 mM en ensayo) se neutralizaron con NaOH 0.1 M hasta el pH deseado, y la mezcla resultante se enrasó a 100 mL para obtener el tampón borato 20 mM buscado.

**Cálculo de la fuerza iónica y de la concentración de NaCl.** La fuerza iónica en ensayo ( $I$ ), se calculó a partir de las concentraciones molares en equilibrio ( $c_i$ ) de las especies iónicas  $i$  y su carga ( $z_i$ ) mediante la Ecuación 5.13.

$$I = \frac{1}{2} \sum_i c_i z_i^2 \quad \text{Ecuación 5.13}$$

Se consideró de forma aproximada el comportamiento real de las disoluciones, por lo que los cálculos se hicieron teniendo en cuenta las actividades de las especies iónicas  $i$  ( $a_i$ ). Éstas se calcularon a partir de sus concentraciones molares ( $c_i$ ) y de sus coeficientes de actividad ( $\gamma_i$ ), como se indica en la Ecuación 5.14. Para hacer adimensionales los valores de actividad, se tomó como concentración estándar ( $c^0$ ) un valor de 1 M. Para las especies no iónicas se consideró un coeficiente de actividad igual a la unidad, y por tanto una actividad numéricamente equivalente a su concentración molar.

$$a_i = \gamma_i \frac{c_i}{c^0} \quad \text{Ecuación 5.14}$$

Puesto que en todos los casos se trabajó con disoluciones iónicas diluidas ( $I < 500$  mM), los coeficientes de actividad fueron calculados de forma teórica mediante el modelo de disolución electrolítica propuesto por Debye y Hückel, empleando la ecuación de Davies (Ecuación 5.15)<sup>243</sup> y considerando en todos los casos una temperatura de 25 °C.

$$\log \gamma_i = -0.512 \cdot z_i^2 \cdot \left[ \frac{\sqrt{I}}{1 + \sqrt{I}} - 0.2I \right] \quad \text{Ecuación 5.15}$$

Con todas estas consideraciones, se resolvió cada sistema mediante un método iterativo teniendo en cuenta todas las posibles especies presentes en el equilibrio y sus concentraciones iniciales. Una vez hallada la fuerza iónica de la mezcla PBS/PBS-T 1:1 (v/v) ( $I = 166$  mM), y teniendo en cuenta la concentración total del sistema tampón en ensayo (10 mM), se determinó para cada valor de pH la concentración de NaCl en ensayo requerida para alcanzar dicho valor de fuerza iónica.

#### 5.10.4. Influencia de la fuerza iónica

**Ensayos de influencia de fuerza iónica.** El estudio se llevó a cabo del mismo modo que se hizo con el pH (sección 5.10.3). En este caso, los inmunorreactivos se disolvieron en diversos tampones fosfato de fuerza iónica variable y preparados de tal manera que el pH, la concentración total del sistema tampón (fosfato) y la concentración de Tween-20 en ensayo fuesen siempre iguales a las de la mezcla PBS/PBS-T 1:1 (v/v) (7.4, 10 mM y 0.025% v/v, respectivamente) empleada habitualmente.

**Preparación de tampones.** Para cada tampón se preparó una disolución precursora de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  20 mM y otra de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  20 mM, ambas con un 0.05% (v/v) de Tween-20 y la correspondiente cantidad prefijada de NaCl (ver Tabla 5.2). Estas disoluciones se mezclaron lentamente entre sí hasta obtener el tampón deseado con un pH de 7.4. La fuerza iónica en ensayo se calculó mediante el mismo método iterativo que se empleó en la preparación de tampones para el estudio del pH (sección 5.10.3). Los valores de concentración de NaCl y de fuerza iónica en ensayo se recogen en la Tabla 5.2.

**Tabla 5.2.** Concentración molar de NaCl y fuerza iónica en ensayo para el estudio de fuerza iónica.

[NaCl] (mM)	<i>I</i> (mM)
25	50
50	75
100	126
140	166
200	226
250	276

#### 5.10.5. Tolerancia a disolventes orgánicos

Los inmunoensayos seleccionados en formatos directo e indirecto se llevaron a cabo según se describe en la sección 5.8, usando las concentraciones de anticuerpo y conjugado óptimas en cada caso. Las curvas estándar de analito se prepararon en agua MilliQ con disolvente orgánico, y la competición se llevó a cabo mezclando por duplicado 50  $\mu\text{L}$  por pocillo de curva estándar y 50  $\mu\text{L}$  por pocillo del inmunorreactivo de competición en PBS(2 $\times$ )-T. Las mezclas de disolvente orgánico y agua MilliQ para las

curvas estándar se prepararon por dilución en serie a partir del disolvente puro. Se evaluaron porcentajes de disolvente en ensayo de 0.25%, 0.5%, 1%, 2% y 5% (v/v), y se incluyó una curva estándar sin disolvente como control.

## 5.11. Validación y aplicación de los inmunoensayos

### 5.11.1. **Obtención de muestras de campo de ciruela y uva**

#### 5.11.1.1. *Preparación y modo de aplicación de fungicidas*

El formulado comercial (suspensión concentrada) que contenía el analito de interés se mezcló con agua desionizada y se homogeneizó la suspensión, empleando en cada caso un volumen de formulado adecuado al tratamiento deseado. La suspensión se aplicó a los cultivos con un nebulizador manual, evitando siempre una aplicación excesiva reflejada por el goteo en hojas y frutos. Los formulados comerciales empleados, así como las dosis recomendadas y las concentraciones de analito presentes en ellos, se recogen en la Tabla 5.3.

**Tabla 5.3.** Composición y modo de utilización de los formulados comerciales de fluopyram y penthiopyrad.

Formulado y compañía	Principio activo	Dosis <sup>a</sup>	Concentración <sup>b</sup>
Luna® Experience (Bayer)	Fluopyram 20% (m/v) Tebuconazole 20% (m/v)	0.038% (v/v)	76
Fontelis® (DuPont)	Penthiopyrad 20% (m/v)	0.150% (v/v)	300

<sup>a</sup> Dosis de formulado recomendada por el fabricante en el prospecto del producto. <sup>b</sup> Concentración de analito (mg/L) a la dosis recomendada por el fabricante.

#### 5.11.1.2. *Muestras de ciruela*

**Tratamiento y recogida de muestras.** Las muestras de ciruela se trataron a la dosis recomendada por el fabricante (tratamiento 1, T1) y al doble de dicha dosis (tratamiento 2, T2). En ambos casos se recogieron muestras pasados 1, 3, 5 y 7 días desde el tratamiento. En cada muestreo se tomaron 2 muestras de 3 ciruelas adyacentes en el árbol. Previamente a los tratamientos se recogieron varias muestras sin tratar, que se utilizaron como control y para obtener muestras fortificadas, y se procesaron del mismo modo que las muestras tratadas.

**Procesado de muestras.** Cada muestra recogida se trasladó el mismo día al laboratorio, donde se deshuesaron los frutos y se homogeneizó el fruto con un aparato UltraTurrax. Un volumen aproximado de 50 mL se almacenó a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  hasta su extracción y análisis.

#### 5.11.1.3. Muestras de uva

**Tratamiento y recogida de muestras.** Las muestras de uva, al igual que las de ciruela, se trataron a la dosis recomendada por el fabricante (tratamiento 1, T1) y al doble de dicha dosis (tratamiento 2, T2). En ambos casos se recogieron muestras pasados 1 y 3 días desde el tratamiento. En cada muestreo se tomó una muestra de aproximadamente 500 g de uva. Previamente a los tratamientos se recogieron varias muestras sin tratar de cada variedad, que se utilizaron como control y para obtener muestras fortificadas, y se procesaron del mismo modo que las muestras tratadas.

**Procesado de muestras.** Cada muestra recogida se trasladó el mismo día al laboratorio, donde se eliminó el raspón y se trituraron las uvas en una picadora americana. Una parte de la muestra triturada se reservó para la preparación de mosto y vino (ver sección 5.11.3); el resto del triturado se homogeneizó con un aparato UltraTurrax, y un volumen aproximado de 50 mL se almacenó a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  hasta su extracción y análisis.

### 5.11.2. Obtención de extractos de muestras de ciruela y uva

Los extractos de ciruela y uva se obtuvieron a partir de las muestras homogeneizadas de las frutas (sección 5.11.1) mediante el procedimiento de extracción QuEChERS recomendado por la AOAC (Método Oficial AOAC 2007.01) y por el CEN (EN 15662:2008) para la extracción de residuos de fungicidas de matrices alimentarias.<sup>181-183</sup> El método ha sido descrito a grandes rasgos en la sección 3.8.1.

**Extracción QuEChERS.** A una mezcla de 5 g de cada muestra homogeneizada, 0.5 g de acetato sódico y 5 mL de acetonitrilo con un 1% (v/v) de ácido acético y 500 ng/mL de TPP (patrón interno), se añadieron 2 g de  $\text{MgSO}_4$  anhidro. La suspensión se agitó vigorosamente durante 1 min y luego se centrifugó a  $2040\times g$  durante 5 min. Se tomó 1 mL del sobrenadante (extracto crudo) y se le añadieron 50 mg de PSA y 150 mg de  $\text{MgSO}_4$  anhidro. La suspensión formada se agitó vigorosamente durante 1 min y luego se centrifugó a  $6700\times g$  durante 5 min. El sobrenadante (extracto purificado) se filtró a

través de una membrana de teflón (0.2  $\mu\text{m}$  de diámetro de poro) y se almacenó a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  hasta su análisis.

**Extractos de muestras sin tratar.** En el caso de las muestras sin tratar se preparó una cantidad superior a la habitual de extracto purificado, de la que se reservó una parte como control para el análisis de extractos mediante UPLC–MS/MS (sección 5.11.5). El resto se destinó a los ensayos de evaluación de efecto matriz (sección 5.11.4) y a la obtención de extractos fortificados para la validación analítica de los inmunoensayos (sección 5.11.6.1).

### 5.11.3. Obtención de mostos y vinos

**Preparación de mostos.** Los mostos se obtuvieron por filtración de las muestras de uva triturada preparadas según se describe en la sección 5.11.1.3. Un volumen aproximado de 50 mL del mosto se almacenó a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  hasta su análisis, mientras que otra porción se reservó para la obtención de vino.

**Preparación de vinos.** Se tomaron 60 mL de mosto y, salvo en el caso de la variedad macabeo, se añadió parte de la mezcla de pulpa, piel y hueso separada por filtración para la obtención del mosto. A esta mezcla inicial se inoculó una concentración de levadura de  $2 \cdot 10^6$  células/mL, y la suspensión se incubó a  $28\text{ }^{\circ}\text{C}$  con agitación orbital continua a 150 rpm. El avance de la fermentación se siguió mediante la medida de la densidad del mosto, y la vinificación se consideró finalizada cuando la densidad fue inferior a 0.998 g/mL (tiempos de fermentación entre 114 y 230 h). La muestra final de vino se obtuvo tras descartar los componentes sólidos de la suspensión mediante centrifugación, y un volumen aproximado de 50 mL se almacenó a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  hasta su análisis.

**Análisis de metabolitos extracelulares mediante HPLC.** Una porción de la muestra a analizar (mosto o vino) se centrifugó a  $12000 \times g$  durante 5 min, y el sobrenadante se filtró a través de un filtro de nylon. Por otro lado, se preparó un calibrado multicomponente de todos los metabolitos (glucosa, fructosa, glicerol, etanol y ácido acético) por dilución en serie en agua MilliQ. Posteriormente, se inyectaron 25  $\mu\text{L}$  de muestra o patrón en el cromatógrafo y se eluyó con una disolución de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  1.5 mM en agua MilliQ a un flujo de 600  $\mu\text{L}/\text{min}$ . Se construyeron rectas de calibrado para cada metabolito mediante regresión lineal por mínimos cuadrados representando el área cromatográfica frente a la concentración. La interpolación de la correspondiente área

cromatográfica en su respectiva recta de calibrado y la posterior consideración de la dilución de muestra empleada en el ensayo proporcionó la concentración de los metabolitos. Las muestras se diluyeron en agua MilliQ estéril antes de ser centrifugadas para proporcionar áreas cromatográficas en el rango de trabajo del calibrado.

#### 5.11.4. Evaluación del efecto matriz de extractos, mostos y vinos

Los inmunoensayos seleccionados en formatos directo e indirecto se llevaron a cabo según se describe en la sección 5.8, usando las concentraciones de anticuerpo y conjugado óptimas en cada caso. Se prepararon en primer lugar diluciones en serie de matriz en agua MilliQ a partir de la correspondiente matriz concentrada no tratada con analito (extracto purificado, mosto o vino), y se emplearon dichas diluciones para la preparación de curvas estándar. La competición se llevó a cabo por duplicado mezclando en cada pocillo 50  $\mu$ L de curva estándar y 50  $\mu$ L del inmunorreactivo de competición en PBS(2 $\times$ )-T. Se evaluaron factores de dilución de matriz en ensayo de 50, 100, 500, 1000 y 5000, y se incluyó una curva estándar sin matriz como control. Una vez ajustados los puntos experimentales a la función logística de cuatro parámetros (Ecuación 5.4) para cada dilución ensayada, el promedio del cociente de la señal en presencia de matriz y la señal en tampón en el intervalo de trabajo (promedio de  $A/A_{\text{tampón}}$ ) se calculó según la Ecuación 5.16, en la que  $y'(x)$  e  $y(x)$  corresponden a las funciones logísticas en presencia de matriz y en tampón, respectivamente, y  $x$  es la concentración de analito. La integral definida de la Ecuación 5.16 se estimó numéricamente mediante el método de Simpson, dividiendo el intervalo de integración en diez subintervalos.

$$\text{Promedio de } \frac{A}{A_{\text{tampón}}} = \frac{1}{IC_{80} - IC_{20}} \int_{x=IC_{20}}^{x=IC_{80}} \frac{y'(x)}{y(x)} dx \quad \text{Ecuación 5.16}$$

#### 5.11.5. Análisis de extractos de ciruela y uva mediante UPLC–MS/MS

**Patrones para las rectas de calibrado.** Se preparó un calibrado multicomponente de 6 patrones y un blanco por dilución en serie de fluopyram y penthiopyrad en acetonitrilo. Las concentraciones de ambos analitos en los patrones fueron 3, 10, 30, 100, 300 y 1000 ng/mL. Todos los patrones y el blanco se prepararon con 500 ng/mL de TPP (patrón interno).

**Procedimiento de análisis.** Se inyectaron en el cromatógrafo 5  $\mu\text{L}$  de extracto (patrón, muestra o control), y se ajustó el flujo de fase móvil a 400  $\mu\text{L}/\text{min}$ . Se emplearon mezclas binarias de disoluciones de ácido fórmico al 0.5% (v/v) en agua MilliQ (eluyente A) y en acetonitrilo (eluyente B) como fase móvil. La elución se llevó a cabo inicialmente con un gradiente desde un 50% (v/v) hasta un 95% (v/v) de eluyente B a lo largo de 4 min, y luego en modo isocrático con un 95% (v/v) de eluyente B durante 2 min. Se consideró como señal del ensayo el cociente entre el área del pico cromatográfico del analito y la del patrón interno multiplicado por la concentración de éste último. Los tiempos de retención de los analitos y del patrón interno, así como los iones monitorizados para su cuantificación, se muestran en la Tabla 5.4.

**Tabla 5.4.** Parámetros para la cuantificación de fluopyram y penthiopyrad mediante UPLC–MS/MS.

Compuesto	$t_R^a$	Iones <sup>b</sup>
Fluopyram	1.1	397 [M+H] <sup>+</sup> ; <b>173</b>
Penthiopyrad	2.0	360 [M+H] <sup>+</sup> ; <b>256</b>
Fosfato de trifenilo <sup>c</sup>	2.1	328 [M+H] <sup>+</sup> ; <b>77</b>

<sup>a</sup> Tiempo de retención expresado en min. <sup>b</sup> Valor y tipo de  $m/z$  para el ion molecular, y en negrita valor de  $m/z$  del ion empleado en la cuantificación. <sup>c</sup> Patrón interno.

**Tratamiento de resultados.** Las rectas de calibrado de cada analito se obtuvieron mediante regresión lineal por mínimos cuadrados ponderados ( $1/x$ ) a las representaciones de la señal del ensayo frente a la concentración del correspondiente analito. Las concentraciones de analitos en las muestras se obtuvieron por interpolación de la correspondiente señal en su respectiva recta de calibrado.

## 5.11.6. Análisis de extractos, mostos y vinos mediante inmunoensayo

### 5.11.6.1. Análisis de muestras fortificadas

**Dopaje de muestras.** Las muestras de matriz fortificada (mosto, vino o extracto purificado de ciruela o uva) se prepararon por dilución en serie del analito en la propia matriz, partiendo para ello de una disolución stock concentrada de analito (100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) en acetonitrilo. En cada caso se prepararon fortificaciones a 5, 10, 50, 100, 200 y 500 ng/mL de analito.

**Análisis de muestras fortificadas mediante ELISA competitivo.** Los inmunoensayos seleccionados en formatos directo e indirecto se llevaron a cabo según se describe en la sección 5.8, usando las concentraciones de anticuerpo y conjugado óptimas en cada caso. Se preparó la curva estándar y una serie de diluciones de cada muestra fortificada de matriz en agua MilliQ. La competición se efectuó por triplicado mezclando en cada pocillo 50 µL de patrón o de muestra fortificada diluida y 50 µL del inmunorreactivo de competición en PBS(2×)-T. Se analizaron muestras diluidas 25, 50 y 150 veces. Se incluyeron muestras sin analito como control, y se analizaron igual que las muestras fortificadas.

**Tratamiento de resultados.** El promedio de las señales de cada muestra se interpoló en la curva estándar y el resultado se multiplicó por el correspondiente factor de dilución para obtener la concentración experimental de analito en la muestra ( $C_R$ ). A partir de ésta y de la concentración de fortificación ( $C_F$ ) se calculó el coeficiente de recuperación (R) según la Ecuación 5.17.

$$R = \frac{C_R}{C_F} \cdot 100\% \quad \text{Ecuación 5.17}$$

#### 5.11.6.2. Análisis de muestras de campo

Las muestras de ciruela y uva tratadas en campo (sección 5.11.2), así como las de vino obtenidas a partir de las de uva, se analizaron mediante el mismo procedimiento que se empleó para el análisis de muestras fortificadas (ver sección 5.11.6.1). Las muestras se analizaron tras ser diluidas 25, 50, 150, 250, 500 y 1000 veces. La concentración de analito en cada muestra se obtuvo por interpolación del promedio de la señal del ensayo en la curva estándar y la posterior multiplicación del resultado por el factor de dilución empleado.

#### 5.11.7. Validación de inmunoensayos frente a un método de referencia

Para cada inmunoensayo a validar, se comparó gráficamente la concentración de analito (fluopyram o penthiopyrad) determinada mediante UPLC-MS/MS y ELISA competitivo en los extractos de ciruela y uva tratadas con dicho analito. Para los valores obtenidos por el método cromatográfico se utilizó el eje de abscisas, mientras que los hallados por inmunoensayo se representaron en el eje de ordenadas. A partir del gráfico obtenido se determinó mediante regresión Deming la ecuación de la recta

que mejor se ajustaba a los puntos, y el software calculó además el intervalo de confianza al 95% de probabilidad para la pendiente y la ordenada en el origen, y se llevaron a cabo sendos ensayos de hipótesis de dos lados para decidir si los parámetros eran iguales a 1 y 0, respectivamente, con un 5% de significación. En estos casos, se consideró que los métodos eran estadísticamente comparables. La comparación también se llevó a cabo construyendo gráficos de dispersión Bland–Altman por representación de la concentración media obtenida con ambos métodos en abscisas y su diferencia en ordenadas, incluyendo el valor medio y los límites de confianza al 95% para la diferencia de las concentraciones.

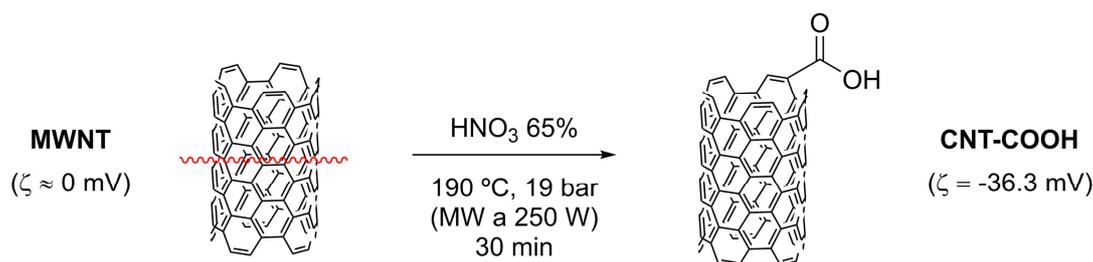
### 5.11.8. Estudio de transferencia de fungicidas de la uva al vino

A partir de las concentraciones de fluopyram y penthiopyrad halladas en cada muestra de campo de uva y su correspondiente vino, la tasa de transferencia de fluopyram o penthiopyrad de la uva al vino se calculó mediante la Ecuación 5.18, es decir, como el porcentaje del cociente entre la concentración de analito en el vino y la encontrada en la uva.

$$\text{Tasa de transferencia} = \frac{\text{Concentración en vino}}{\text{Concentración en uva}} \cdot 100\% \quad \text{Ecuación 5.18}$$

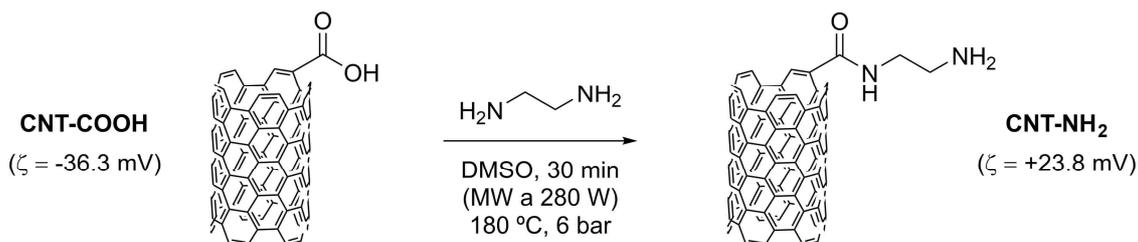
## 5.12. Inmunógenos basados en nanotubos de carbono

### 5.12.1. Activación y funcionalización de nanotubos



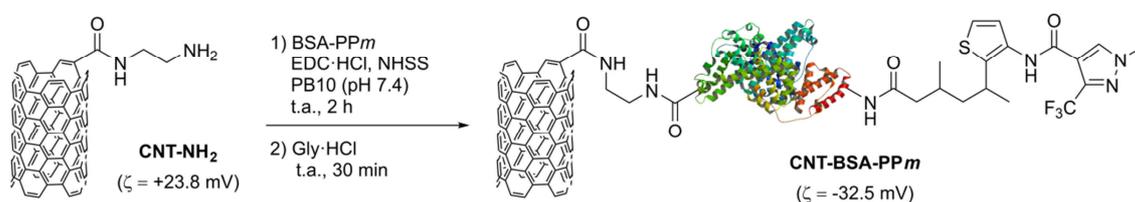
**Preparación de CNT-COOH.** Una mezcla de MWNT (50 mg) y HNO<sub>3</sub> al 65% (12.5 mL) se introdujo en un tubo de microondas y se sonicó durante 20 min. Después, la mezcla se calentó con agitación vigorosa en horno microondas a 190 °C (250 W) y 19 bar durante 30 min. Transcurrido dicho tiempo la suspensión se diluyó en agua desionizada (250 mL), se filtró a vacío y se lavó de nuevo con agua desionizada. El

sólido negro se resuspendió en agua desionizada (50 mL), se sonicó durante 15 min y se centrifugó 15 min a 1800×g. A continuación, el sobrenadante se separó del sedimento (material de partida sin reaccionar), que se hizo reaccionar de nuevo y se purificó según el procedimiento anterior, hasta no observar sedimento tras la centrifugación. Los sobrenadantes reunidos se filtraron a vacío, y el sólido seco se resuspendió en agua desionizada a 1 mg/mL. Tras sonicar durante 5 min, se obtuvo una suspensión estable de CNT-COOH ( $\zeta = -36.3 \pm 0.7$  mV), que se almacenó a 4 °C.



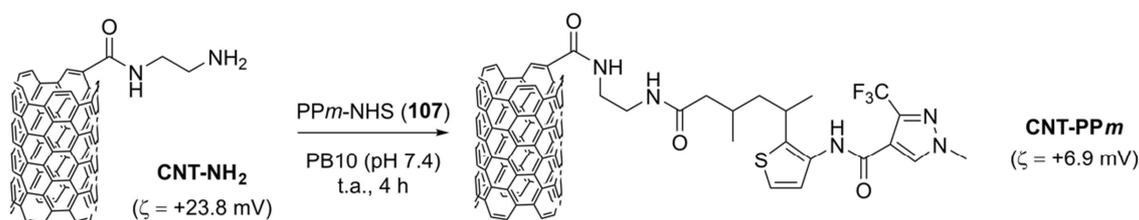
**Preparación de CNT-NH<sub>2</sub>.** Una suspensión de CNT-COOH (100 mg) en DMSO (6 mL) y etilendiamina (4 mL) se introdujo en un tubo de microondas y se sonicó durante 25 min. Después, la mezcla se calentó con agitación vigorosa en horno microondas a 180 °C (280 W) y 6 bar durante 30 min. Transcurrido dicho tiempo la suspensión se diluyó en THF (40 mL), se sonicó durante 15 min y se filtró a vacío. El sólido se resuspendió en acetona (40 mL), se sonicó otros 15 min y se filtró nuevamente a vacío. El sólido seco se resuspendió en agua desionizada a 1 mg/mL y se sonicó durante 5 min para dar lugar a una suspensión estable de CNT-NH<sub>2</sub> ( $\zeta = +23.8 \pm 1.1$  mV), que se almacenó a 4 °C.

### 5.12.2. Preparación y caracterización de constructos inmunogénicos



**Preparación del constructo CNT-BSA-PPm.** A una suspensión de CNT-NH<sub>2</sub> (50 mg) en una disolución de EDC·HCl (450 mg, 2.35 mmol) y sal sódica de *N*-hidroxisulfosuccinimida (NHSS, 45 mg, 207  $\mu\text{mol}$ ) en PB10 (50 mL, pH 7.4) se añadió el conjugado BSA-PPm (RM = 18, ver sección 5.5) a 0.1 mg/mL disuelto en el mismo tampón (50 mL, 76 nmol de BSA). La mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante 2 h. En este punto se añadió hidrócloruro de glicina (Gly·HCl, 393.1

mg, 3.53 mmol) y se agitó durante otros 30 min. Transcurrido este tiempo la mezcla se filtró a vacío dos veces y se lavó con agua desionizada. El sólido seco se resuspendió en PB10 estéril a 2.5 mg/mL y se sonicó durante 5 min para dar una suspensión estable de CNT–BSA–PPm ( $\zeta = -32.5 \pm 1.0$  mV), que se almacenó a 4 °C.



**Preparación del constructo CNT–PPm.** A una suspensión de CNT–NH<sub>2</sub> (100 mg) en PB10 (100 mL) se añadió una disolución 1 mM de éster activo PPm–NHS (**107**, 500  $\mu$ L, 0.5  $\mu$ mol). La mezcla resultante se agitó vigorosamente a temperatura ambiente durante 4 h. Después, la mezcla se filtró a vacío y se lavó con agua desionizada. El sólido se resuspendió en agua, se sonicó durante 10 min y se volvió a filtrar a vacío. El sólido seco se resuspendió por último en PB10 estéril a 2 mg/mL y se sonicó de nuevo durante 5 min para dar una suspensión de CNT–PPm con tendencia a flocular ( $\zeta = +6.9 \pm 0.8$  mV), que se almacenó a 4 °C.

**Cuantificación de carga de inmunógeno.** Las cantidades de conjugado BSA–PPm y de hapteno PPm presentes en los constructos inmunogénicos fueron cuantificadas mediante una adaptación del protocolo de análisis de muestras mediante ELISA competitivo indirecto (secciones 5.8.2 y 5.11.6). Los ensayos se llevaron a cabo empleando los anticuerpos policlonales PPm#1 y PPm#2. Las placas se tapizaron en todos los casos con el conjugado OVA–PPm. Se prepararon curvas estándar de conjugado BSA–PPm y de hapteno PPm (**81**) en PBS, así como diluciones de ambos constructos inmunogénicos en el mismo tampón. La competición se llevó a cabo mezclando en cada pocillo 50  $\mu$ L de patrón (BSA–PPm o hapteno PPm) o muestra (suspensión diluida de constructo) con 50  $\mu$ L de anticuerpo diluido en PBS-T. La carga de BSA–PPm presente en el constructo CNT–BSA–PPm se determinó tras interpolar la señal en la curva estándar de conjugado. Del mismo modo, para cuantificar la carga de hapteno PPm en el constructo CNT–PPm se empleó la curva estándar del hapteno. Los ensayos se realizaron variando las concentraciones de conjugado de tapizado y las diluciones de anticuerpo, obteniendo en todos los casos resultados similares.

**Evaluación mediante microscopía electrónica.** La suspensión de la muestra a analizar (CNT–BSA–PPm o CNT–PPm) se puso en contacto con una rejilla durante 15

min dos días antes del análisis, y después se dejó evaporar el agua durante toda la noche. Sobre la rejilla seca se depositó una disolución de anticuerpo PPM#2 diluido 3000 veces en PBS-T(10×) y se dejó incubar durante 2 h a temperatura ambiente. Tras lavar la rejilla tres veces con PBS-T, se puso en contacto con una disolución de GAR–Au diluido 500 veces en PBS-T(10×), y se dejó incubar en la oscuridad y a temperatura ambiente durante 2 h. Por último, la rejilla se lavó varias veces con PBS-T y se dejó secar en la oscuridad hasta su observación al microscopio electrónico al día siguiente.

### 5.12.3. Inmunización de animales y generación de antisueros

La capacidad inmunogénica de los diferentes constructos se evaluó siguiendo diferentes pautas de inmunización. Dos hembras de conejo blanco New Zealand de aproximadamente 2 kg de peso fueron inmunizadas con cada pauta de inmunización ensayada. Se utilizaron como inmunógenos los dos constructos inmunogénicos basados en nanotubos de carbono, y se introdujeron pautas control en las que se inmunizó con conjugado BSA–PPM, constructo CNT–PPM o mezclas de CNT–NH<sub>2</sub> y hapteno PPM sin conjugar (en cantidad y proporción equivalentes a la misma cantidad de constructo CNT–PPM).

**Preparación de inóculos.** Las dosis se prepararon en PBS estéril, y en los casos en los que se utilizó adyuvante, en una emulsión 1:1 (v/v) entre PBS estéril y adyuvante de Freund (completo en la primera dosis e incompleto en las restantes). Cuando las dosis se prepararon con constructos basados en nanotubos, la correspondiente suspensión se sonicó durante 5 min antes de tomar la cantidad necesaria para preparar el inóculo. En todos los casos las dosis fueron de 1 mL.

**Modo y pauta de inmunización.** Las inyecciones se administraron del mismo modo y con la misma frecuencia que para la obtención de anticuerpos policlonales (ver sección 5.6). En este caso, para cada pauta de inmunización se administró un total de 5 dosis.

**Obtención y conservación de antisueros.** Diez días después de cada inyección, se tomó una muestra de sangre de la vena de la oreja de cada conejo. A partir de dichas muestras se obtuvieron los correspondientes antisueros de conejo siguiendo el procedimiento descrito en la sección 5.6. Los antisueros se diluyeron en proporción 1:1 (v/v) con PBS–BSA–timerosal estéril, y se almacenaron a 4 °C hasta su análisis.

#### 5.12.4. Evaluación de antisueros

Los antisueros se caracterizaron mediante ELISA competitivo indirecto (ver sección 5.8.2). Las placas se tapizaron con una disolución a 100 ng/mL del conjugado homólogo OVA-PPm, y la competición se llevó a cabo con diluciones  $1/10^3$ ,  $1/3 \cdot 10^3$ ,  $1/10^4$ ,  $1/3 \cdot 10^4$ ,  $1/10^5$  y  $1/3 \cdot 10^5$  de antisuero. Cada dilución de antisuero se hizo competir con una curva estándar de penthiopyrad de siete puntos más un blanco, partiendo de 10  $\mu$ M con factor de dilución 10, preparada por dilución en serie desde el primer punto, el cual se obtuvo a partir de una disolución stock 1000 $\times$  en DMF. Tras procesar los resultados y obtener las curvas de inhibición, se determinó el título de los antisueros y se estimó su afinidad hacia penthiopyrad como el valor de  $IC_{50}$  de la curva que presentó un valor de  $A_{m\acute{a}x}$  más cercano a 1.0 y superior a 0.8.

## 6. REFERENCIAS

- [1] Lista de códigos del FRAC para el año 2017 (Frac Code List© 2017). **2017**. <http://www.frac.info/docs/default-source/publications/frac-code-list/frac-code-list-2017-final.pdf?sfvrsn=2>
- [2] Sitio web principal del Fungicide Resistance Action Comitee. **2017**. <http://www.frac.info/>
- [3] Yanase, Y.; Yoshikawa, Y.; Kishi, J.; Katsuta, H. The History of Complex II Inhibitors and the Discovery of Penthiopyrad. En *Pesticide Chemistry: Crop Protection, Public Health, Environmental Safety*, Wiley-VCH Verlag: Weinheim, Alemania, **2007**; pp 295–303.
- [4] Verma, P. R. Biology and control of *Rhizoctonia solani* on rapeseed: A Review. *Phytoprotection* **1996**, 77 (3), 99–111.
- [5] Rheinheimer, J.; Rieck, H.; Coqueron, P. Y. Succinate Dehydrogenase Inhibitors. En *Modern Crop Protection Compounds, Volumes 1-3, Second Edition*, Wiley-VCH Verlag: Weinheim, Alemania, **2012**; Vol. 2, pp 627–645.
- [6] Avenot, H. F.; Michailides, T. J. Progress in understanding molecular mechanisms and evolution of resistance to succinate dehydrogenase inhibiting (SDHI) fungicides in phytopathogenic fungi. *Crop Prot.* **2010**, 29 (7), 643–651.
- [7] Broomfield, P. L. E.; Hargreaves, J. A. A single amino-acid change in the iron-sulphur protein subunit of succinate dehydrogenase confers resistance to carboxin in *Ustilago maydis*. *Curr. Genet.* **1992**, 22 (2), 117–121.
- [8] Skinner, W.; Bailey, A.; Renwick, A.; Keon, J.; Gurr, S.; Hargreaves, J. A. A single amino-acid substitution in the iron-sulphur protein subunit of succinate dehydrogenase determines resistance to carboxin in *Mycosphaerella graminicola*. *Curr. Genet.* **1998**, 34 (5), 393–398.

## Referencias

---

- [9] Shima, Y.; Ito, Y.; Kaneko, S.; Hatabayashi, H.; Watanabe, Y.; Adachi, Y.; Yabe, K. Identification of three mutant loci conferring carboxin-resistance and development of a novel transformation system in *Aspergillus oryzae*. *Fungal Genet. Biol.* **2009**, *46* (1), 67–76.
- [10] Ito, Y.; Muraguchi, H.; Seshime, Y.; Oita, S.; Yanagi, S. O. Flutolanil and carboxin resistance in *Coprinus cinereus* conferred by a mutation in the cytochrome b560 subunit of succinate dehydrogenase complex (Complex II). *Mol. Genet. Genomics* **2004**, *272* (3), 328–335.
- [11] Walter, H. Pyrazole Carboxamide Fungicides Inhibiting Succinate Dehydrogenase. En *Bioactive Heterocyclic Compound Classes: Agrochemicals*, Wiley-VCH Verlag: Weinheim, Alemania, **2012**; pp 175–193.
- [12] Mansfield, D. J.; Cooke, T.; Thomas, P. S.; Coqueron, P. Y.; Vors, J. P.; Briggs, G. G.; Lachaise, H.; Rieck, H.; Desbordes, P.; Gros-Jean-Cournoyer, M. C. *Novel 2-pyridylethylbenzamide derivative*. PCT Int. Appl. WO 2004016088 A2, **2004**.
- [13] Proffer, T. J.; Lizotte, E.; Rothwell, N. L.; Sundin, G. W. Evaluation of dodine, fluopyram and penthiopyrad for the management of leaf spot and powdery mildew of tart cherry, and fungicide sensitivity screening of Michigan populations of *Blumeriella jaapii*. *Pest Manag. Sci.* **2013**, *69* (6), 747–754.
- [14] Reglamento de Ejecución (UE) nº 802/2013 de la Comisión, de 22 de agosto de 2013, por el que se aprueba la sustancia activa fluopyram. **2017**. [http://eur-lex.europa.eu/eli/reg\\_impl/2013/802/oj](http://eur-lex.europa.eu/eli/reg_impl/2013/802/oj)
- [15] Fungicidas comercializados en España por Bayer Cropscience. **2017**. <http://www.cropscience.bayer.es/es-ES/Productos/Fungicidas>
- [16] Sitio principal de Bayer Cropscience. **2017**. <https://www.cropscience.bayer.com/>
- [17] Clarke, E. D.; Delaney, J. S. Physical and Molecular Properties of Agrochemicals: An Analysis of Screen Inputs, Hits, Leads, and Products. *Chimia* **2003**, *57* (11), 731–734.
- [18] Briggs, G. G.; Mansfield, D. J.; Moloney, B.; Gary, S.; Wegmann, T. The discovery and chemistry of fluopicolide: a new standard for oomycetes disease control. *Pflanzenschutz-Nachr. Bayer. (Engl. Ed.)* **2006**, *59*, 141–152.
- [19] Malandrakis, A. A.; Vattis, K. N.; Markoglou, A. N.; Karaoglanidis, G. S. Characterization of boscalid-resistance conferring mutations in the SdhB subunit of respiratory complex II and impact on fitness and mycotoxin production in *Penicillium expansum* laboratory strains. *Pestic. Biochem. Physiol.* **2017**, *138*, 97–103.
- [20] Ficha elaborada por la Agencia de Protección Medioambiental de Estados Unidos para el preparado Fluopyram 500 SC. **2017**. [https://www3.epa.gov/pesticides/chem\\_search/ppls/000432-01538-20160617.pdf](https://www3.epa.gov/pesticides/chem_search/ppls/000432-01538-20160617.pdf)
- [21] Autoridad Europea para la Seguridad Alimentaria (EFSA), Conclusion on the peer review of the pesticide risk assessment of the active substance fluopyram. *EFSA Journal* **2013**, *11* (4), 3052.

- [22] Tinwell, H.; Rouquié, D.; Schorsch, F.; Geter, D.; Wason, S.; Bars, R. Liver tumor formation in female rat induced by fluopyram is mediated by CAR/PXR nuclear receptor activation. *Regul. Toxicol. Pharm.* **2014**, *70* (3), 648–658.
- [23] Rouquié, D.; Tinwell, H.; Blanck, O.; Schorsch, F.; Geter, D.; Wason, S.; Bars, R. Thyroid tumor formation in the male mouse induced by fluopyram is mediated by activation of hepatic CAR/PXR nuclear receptors. *Regul. Toxicol. Pharm.* **2014**, *70* (3), 673–680.
- [24] Informe de 2010 de la Reunión Conjunta FAO/OMS sobre residuos de plaguicidas para fluopyram. **2017**. [http://www.fao.org/fileadmin/templates/agphome/documents/Pests\\_Pesticides/JMPR/Report10/Fluopyram.pdf](http://www.fao.org/fileadmin/templates/agphome/documents/Pests_Pesticides/JMPR/Report10/Fluopyram.pdf)
- [25] Dong, B.; Hu, J. Photodegradation of the novel fungicide fluopyram in aqueous solution: kinetics, transformation products, and toxicity evolution. *Environ. Sci. Pollut. Res.* **2016**, *23* (19), 19096–19106.
- [26] Coqueron, P. Y.; Lhermitte, F.; Perrin-Janet, G.; Dufour, P. *Process for the preparation of a 2-ethylaminopyridine derivative*. Eur. Pat. Appl. EP 1674455 A1, **2006**.
- [27] Moradi, W. A.; Himmler, T.; Müller, T. N.; Schnatterer, A.; Schlegel, G. *Catalytic hydrogenation of nitriles*. PCT Int. Appl. WO 2015071230 A1, **2015**.
- [28] Lhermitte, F.; Coqueron, P. Y.; Desbordes, P.; Himmler, T. *Process for the preparation of a 2-pyridylethylcarboxamide derivative*. PCT Int. Appl. WO 2006067103 A2, **2006**.
- [29] Yoshikawa, Y.; Tomiya, K.; Katsuta, H.; Kawashima, H.; Takahashi, O.; Inami, S.; Yanase, Y.; Kishi, J.; Shimotori, H.; Tomura, N. *Substituted thiophene derivative and agricultural and horticultural fungicide containing the same as active ingredient*. Eur. Pat. Appl. EP 0737682 A1, **1996**.
- [30] Catálogo de productos para protección de cosechas de DuPont. **2017**. <http://www.dupont.com/products-and-services/crop-protection.html>
- [31] Yoshikawa, Y.; Katsuta, H.; Kishi, J.; Yanase, Y. Structure-activity relationship of carboxin-related carboxamides as fungicide. *J. Pestic. Sci.* **2011**, *36* (3), 347–356.
- [32] Edgington, L. V.; Barron, G. L. Fungitoxic spectrum of oxathiin compounds. *Phytopathology* **1967**, *57* (11), 1256–1257.
- [33] Oda, M.; Sasaki, N.; Sakaki, T.; Nonaka, N.; Yamagishi, K.; Tomita, H. Structure-Activity Relationships of 2-Chloropyridine-3-carboxamide Fungicides. *J. Pestic. Sci.* **1992**, *17* (2), 91–98.
- [34] Instrucciones de uso para el preparado Vertisan®. **2017**. [http://www.dupont.com/content/dam/dupont/products-and-services/crop-protection/documents/en\\_us/cp\\_PSD-118\\_SL-1978A.pdf](http://www.dupont.com/content/dam/dupont/products-and-services/crop-protection/documents/en_us/cp_PSD-118_SL-1978A.pdf)
- [35] Culbreath, A. K.; Brenneman, T. B.; Kemerait, R. C.; Hammes, G. G. Effect of the new pyrazole carboxamide fungicide penthiopyrad on late leaf spot and stem rot of peanut. *Pest Manag. Sci.* **2009**, *65* (1), 66–73.

## Referencias

---

- [36] Autoridad Europea para la Seguridad Alimentaria, Conclusion on the peer review of the pesticide risk assessment of the active substance penthiopyrad. *EFSA Journal* **2013**, *11* (2), 3111.
- [37] Informe de 2010 de la Reunión Conjunta FAO/OMS sobre residuos de plaguicidas para penthiopyrad. **2017**. [http://www.fao.org/fileadmin/templates/agphome/documents/Pests\\_Pesticides/JMPR/Report12/Penthiopyrad.pdf](http://www.fao.org/fileadmin/templates/agphome/documents/Pests_Pesticides/JMPR/Report12/Penthiopyrad.pdf)
- [38] Katsuta, H.; Ishii, S.; Tomiya, K.; Kodaka, K. *A process for preparing 2-alkyl-3-aminotiofene derivative and 3-aminotiofene derivative*. Eur. Pat. Appl. EP 1036793 A2, **2000**.
- [39] Fukazawa, Y.; Aoki, Y.; Mita, H.; Komatsu, H. *Method of producing 2-alkyl-3-aminotiofene derivative*. U. S. Pat. Appl. Publ. US 20100267963 A1, **2010**.
- [40] Chen, Z.; Zheng, Y.; Ma, J. A. Use of a Traceless Activating and Directing Group for the Construction of Trifluoromethylpyrazoles: One-Pot Transformation of Nitroolefins and Trifluorodiazaoethane. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2017**, *56* (16), 4569–4574.
- [41] Xu, R.; Zheng, Z.; Jiao, G. Safety Assessment and Detection Methods of Genetically Modified Organisms. *Recent Pat. Food Nutr. Agric.* **2014**, *6* (1), 27–32.
- [42] Van Montagu, M. It Is a Long Way to GM Agriculture. *Annu. Rev. Plant Biol.* **2011**, *62*, 1–23.
- [43] Sitio web principal del Pesticide Data Program (PDP). **2017**. <https://www.ams.usda.gov/datasets/pdp>
- [44] Sitio web principal de la Autoridad Europea para la Seguridad Alimentaria (EFSA). **2017**. <https://www.efsa.europa.eu/>
- [45] Sitio web del Programa de Control de Residuos de Plaguicidas de la AECOSAN. **2017**. [http://www.aecosan.msssi.gob.es/AECOSAN/web/seguridad\\_alimentaria/subseccion/programa\\_control\\_residuos.htm](http://www.aecosan.msssi.gob.es/AECOSAN/web/seguridad_alimentaria/subseccion/programa_control_residuos.htm)
- [46] Informe Anual del PDP para el año 2015. **2017**. <https://www.ams.usda.gov/sites/default/files/media/2015PDPAnnualSummary.pdf>
- [47] Autoridad Europea para la Seguridad Alimentaria, The 2015 European Union report on pesticide residues in food. *EFSA Journal* **2017**, *15* (4), 4791.
- [48] Informe Anual del PDP para el año 2012. **2017**. <https://www.ams.usda.gov/sites/default/files/media/2012%20PDP%20Annual%20Summary.pdf>
- [49] Informe Anual del PDP para el año 2013. **2017**. <https://www.ams.usda.gov/sites/default/files/media/2013%20PDP%20Annual%20Summary.pdf>
- [50] Informe Anual del PDP para el año 2014. **2017**. <https://www.ams.usda.gov/sites/default/files/media/2014%20PDP%20Annual%20Summary.pdf>
- [51] Código electrónico de Regulaciones Federales de Estados Unidos (eCFR). **2017**. <https://www.ecfr.gov/>

- [52] Autoridad Europea para la Seguridad Alimentaria, The 2013 European Union report on pesticide residues in food. *EFSA Journal* **2015**, *13* (3), 4038.
- [53] Autoridad Europea para la Seguridad Alimentaria, The 2014 European Union Report on Pesticide Residues in Food. *EFSA Journal* **2016**, *14* (10), 4611.
- [54] Base de datos de plaguicidas de la Unión Europea. **2017**. <http://ec.europa.eu/food/plant/pesticides/eu-pesticides-database>
- [55] Polgár, L.; García-Reyes, J. F.; Fodor, P.; Gyepes, A.; Dernovics, M.; Abrankó, L.; Gilbert-López, B.; Molina-Díaz, A. Retrospective screening of relevant pesticide metabolites in food using liquid chromatography high resolution mass spectrometry and accurate-mass databases of parent molecules and diagnostic fragment ions. *J. Chromatogr. A* **2012**, *1249*, 83–91.
- [56] Edison, S. E.; Lin, L. A.; Gamble, B. M.; Wong, J.; Zhang, K. Surface swabbing technique for the rapid screening for pesticides using ambient pressure desorption ionization with high-resolution mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2011**, *25* (1), 127–139.
- [57] Yu, F. L.; Fu, P. P.; Wang, S. Q.; Wang, X. Determination of fluopyram residues in tomato by gas chromatography. *Nongyao* **2016**, *55* (4), 278–279.
- [58] Deng, M.; Cao, M.; Wang, Q.; Zhu, G. Simultaneous determination of fluopyram, trifloxystrobin and its metabolite trifloxystrobin acid in fruits by gas chromatography. *Nongyaoxue Xuebao* **2013**, *15* (6), 704–707.
- [59] Lozano, A.; Kiedrowska, B.; Scholten, J.; de Kroon, M.; de Kok, A.; Fernández-Alba, A. R. Miniaturisation and optimisation of the Dutch mini-Luke extraction method for implementation in the routine multi-residue analysis of pesticides in fruits and vegetables. *Food Chem.* **2016**, *192*, 668–681.
- [60] Lichtmanegger, K.; Fischer, R.; Steemann, F. X.; Unterluggauer, H.; Masselter, S. Alternative QuEChERS-based modular approach for pesticide residue analysis in food of animal origin. *Anal. Bioanal. Chem.* **2015**, *407* (13), 3727–3742.
- [61] Lee, J.; Kim, L.; Shin, Y.; Lee, J.; Lee, J.; Kim, E.; Moon, J. K.; Kim, J. H. Rapid and Simultaneous Analysis of 360 Pesticides in Brown Rice, Spinach, Orange, and Potato Using Microbore GC-MS/MS. *J. Agric. Food Chem.* **2017**, *65* (16), 3387–3395.
- [62] Stöckelhuber, M.; Müller, C.; Vetter, F.; Mingo, V.; Lötters, S.; Wagner, N.; Bracher, F. Determination of Pesticides Adsorbed on Arthropods and Gastropods by a Micro-QuEChERS Approach and GC-MS/MS. *Chromatographia* **2017**, *80* (5), 825–829.
- [63] Parrilla-Vázquez, P.; Hakme, E.; Uclés, S.; Cutillas, V.; Martínez-Galera, M.; Mughari, A. R.; Fernández-Alba, A. R. Large multiresidue analysis of pesticides in edible vegetable oils by using efficient solid-phase extraction sorbents based on quick, easy, cheap, effective, rugged and safe methodology followed by gas chromatography–tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* **2016**, *1463*, 20–31.

- [64] Parrilla-Vázquez, P.; Lozano, A.; Uclés, S.; Gómez-Ramos, M. M.; Fernández-Alba, A. R. A sensitive and efficient method for routine pesticide multiresidue analysis in bee pollen samples using gas and liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* **2015**, *1426*, 161–173.
- [65] Yang, P.; Chang, J. S.; Wong, J.; Zhang, K.; Krynitsky, A. J.; Bromirski, M.; Wang, J. Effect of Sample Dilution on Matrix Effects in Pesticide Analysis of Several Matrices by Liquid Chromatography–High-Resolution Mass Spectrometry. *J. Agric. Food Chem.* **2015**, *63* (21), 5169–5177.
- [66] Gan, J.; Lv, L.; Peng, J.; Li, J.; Xiong, Z.; Chen, D.; He, L. Multi-residue method for the determination of organofluorine pesticides in fish tissue by liquid chromatography triple quadrupole tandem mass spectrometry. *Food Chem.* **2016**, *207*, 195–204.
- [67] Gómez-Ramos, M. M.; Rajska, Ł.; Heinzen, H.; Fernández-Alba, A. R. Liquid chromatography Orbitrap mass spectrometry with simultaneous full scan and tandem MS/MS for highly selective pesticide residue analysis. *Anal. Bioanal. Chem.* **2015**, *407* (21), 6317–6326.
- [68] Morris, B. D.; Schriener, R. B. Development of an Automated Column Solid-Phase Extraction Cleanup of QuEChERS Extracts, Using a Zirconia-Based Sorbent, for Pesticide Residue Analyses by LC-MS/MS. *J. Agric. Food Chem.* **2015**, *63* (21), 5107–5119.
- [69] Jadhav, M. R.; Oulkar, D. P.; Shabeer T. P., A.; Banerjee, K. Quantitative Screening of Agrochemical Residues in Fruits and Vegetables by Buffered Ethyl Acetate Extraction and LC-MS/MS Analysis. *J. Agric. Food Chem.* **2015**, *63* (18), 4449–4456.
- [70] Dzuman, Z.; Zachariasova, M.; Veprikova, Z.; Godula, M.; Hajslova, J. Multi-analyte high performance liquid chromatography coupled to high resolution tandem mass spectrometry method for control of pesticide residues, mycotoxins, and pyrrolizidine alkaloids. *Anal. Chim. Acta* **2015**, *863*, 29–40.
- [71] Sun, Y.; Lu, Y.; Wu, Y. L. Fast simultaneous determination of sixteen novel amide fungicides in vegetables and fruits by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Shipin Kexue (Beijing)* **2015**, *36* (12), 230–236.
- [72] Jia, W.; Chu, X.; Ling, Y.; Huang, J.; Chang, J. S. High-throughput screening of pesticide and veterinary drug residues in baby food by liquid chromatography coupled to quadrupole Orbitrap mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* **2014**, *1347*, 122–128.
- [73] Dias, J. V.; Cutillas, V.; Lozano, A.; Pizzutti, I. R.; Fernández-Alba, A. R. Determination of pesticides in edible oils by liquid chromatography-tandem mass spectrometry employing new generation materials for dispersive solid phase extraction clean-up. *J. Chromatogr. A* **2016**, *1462*, 8–18.
- [74] Zhong, Q.; Shen, L.; Liu, J.; Yu, D.; Li, S.; Yao, J.; Zhan, S.; Huang, T.; Hashi, Y.; Kawano, S. I.; Liu, Z.; Zhou, T. Pre-column dilution large volume injection ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry for the analysis of multi-class pesticides in cabbages. *J. Chromatogr. A* **2016**, *1442*, 53–61.

- [75] Han, L.; Sapozhnikova, Y.; Lehotay, S. J. Method validation for 243 pesticides and environmental contaminants in meats and poultry by tandem mass spectrometry coupled to low-pressure gas chromatography and ultrahigh-performance liquid chromatography. *Food Control* **2016**, *66*, 270–282.
- [76] Wu, Y. L.; Chen, R. X.; Zhu, Y.; Zhao, J.; Yang, T. Simultaneous determination of sixteen amide fungicides in vegetables and fruits by dispersive solid phase extraction and liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. B* **2015**, *989*, 11–20.
- [77] Abad-Fuentes, A.; Ceballos-Alcantarilla, E.; Mercader, J. V.; Agulló, C.; Abad-Somovilla, A.; Esteve-Turrillas, F. A. Determination of succinate-dehydrogenase-inhibitor fungicide residues in fruits and vegetables by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Anal. Bioanal. Chem.* **2015**, *407* (14), 4207–4211.
- [78] Gulkowska, A.; Buerge, I. J.; Poiger, T. Online solid phase extraction LC–MS/MS method for the analysis of succinate dehydrogenase inhibitor fungicides and its applicability to surface water samples. *Anal. Bioanal. Chem.* **2014**, *406* (25), 6419–6427.
- [79] Guo, T.; Fang, P.; Jiang, J.; Zhang, F.; Yong, W.; Liu, J.; Dong, Y. Rapid screening and quantification of residual pesticides and illegal adulterants in red wine by direct analysis in real time mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* **2016**, *1471*, 27–33.
- [80] Cody, R. B.; Laramée, J. A.; Durst, H. D. Versatile New Ion Source for the Analysis of Materials in Open Air under Ambient Conditions. *Anal. Chem.* **2005**, *77* (8), 2297–2302.
- [81] Gross, J. H. Direct analysis in real time—a critical review on DART-MS. *Anal. Bioanal. Chem.* **2014**, *406* (1), 63–80.
- [82] Guo, Q. *GC-EI-MS (gas chromatography-electron impact ionization-mass spectrometry) measurement method for penthiopyrad residue*. Faming Zhuanli Shenqing CN 105699525 A, **2016**.
- [83] Guo, Q. *Rapid residual penthiopyrad quantity determination method by GC-EI-MS*. Faming Zhuanli Shenqing CN 105628821 A, **2016**.
- [84] Guo, Q. *GC-MS/MS (gas chromatography-tandem mass spectrometry) determining method of penthiopyrad residual quantity*. Faming Zhuanli Shenqing CN 105548439 A, **2016**.
- [85] Guo, Q. *Method for determining penthiopyrad residue in fruits and vegetables through GC-EI-MS (gas chromatography-electron impact ionization-mass spectrometry)*. Faming Zhuanli Shenqing CN 105548409 A, **2016**.
- [86] Nichkova, M.; Marco, M. P. A High-Throughput Screening Immunochemical Protocol for Biological Exposure Assessment of Chlorophenols in Urine Samples. En *Methods in Biotechnology*, Humana Press: New York, **2006**; Vol. 19, pp 133–145.
- [87] Moreno, M. J.; D'Arienzo, P.; Manclús, J. J.; Montoya, Á. Development of monoclonal antibody-based immunoassays for the analysis of bisphenol A in canned vegetables. *J. Environ. Sci. Heal. B* **2011**, *46* (6), 509–517.

## Referencias

---

- [88] Guillén, I.; Gabaldón, J. A.; Núñez-Delicado, E.; Puchades, R.; Maquieira, Á.; Morais, S. Detection of sulphathiazole in honey samples using a lateral flow immunoassay. *Food Chem.* **2011**, *129* (2), 624–629.
- [89] Fodey, T. L.; Thompson, C. S.; Traynor, I. M.; Haughey, S. A.; Kennedy, D. G.; Crooks, S. R. H. Development of an Optical Biosensor Based Immunoassay to Screen Infant Formula Milk Samples for Adulteration with Melamine. *Anal. Chem.* **2011**, *83* (12), 5012–5016.
- [90] 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.* **2011**, *124* (4), 1727–1733.
- [91] Argarate, 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* (1), 2–11.
- [92] Yalow, R. S.; Berson, S. A. Assay of Plasma Insulin in Human Subjects by Immunological Methods. *Nature* **1959**, *184*, 1648–1649.
- [93] Skenandore, C. S.; Pineda, A.; Bahr, J. M.; Newell-Fugate, A. E.; Cardoso, F. C. Evaluation of a commercially available radioimmunoassay and enzyme immunoassay for the analysis of progesterone and estradiol and the comparison of two extraction efficiency methods. *Domest. Anim. Endocrinol.* **2017**, *60*, 61–66.
- [94] Fürjes, G.; Lelesz, B.; Tóth, G. K.; Arday, A.; Szilvássy, Z.; Varga, A.; Berényi, E.; Németh, J. Comparative distribution of somatostatin and thirtene bioactive peptides in the central nervous system of rat measured by radioimmunoassay. *J. Radioanal. Nucl. Chem.* **2017**, *311* (3), 1741–1749.
- [95] Engvall, E.; Perlmann, P. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) quantitative assay of immunoglobulin G. *Immunochemistry* **1971**, *8* (9), 871–874.
- [96] Van Weemen, B. K.; Schuurs, A. H. W. M. Immunoassay using antigen—enzyme conjugates. *FEBS Lett.* **1971**, *15* (3), 232–236.
- [97] 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* **2011**, *1218* (30), 4902–4909.
- [98] Jiang, X.; Li, D.; Xu, X.; Ying, Y.; Li, Y.; Ye, Z.; Wang, J. Immunosensors for detection of pesticide residues. *Biosens. Bioelectron.* **2008**, *23* (11), 1577–1587.
- [99] Santos, V. O.; Pelegrini, P. B.; Mulinari, F.; Lacerda, A. F.; Moura, R. S.; Cardoso, L. P. V.; Bühner-Sékula, S.; Miller, R. N. G.; Grossi-de-Sa, M. F. Development and validation of a novel lateral flow immunoassay device for detection of aflatoxins in soy-based foods. *Anal. Methods* **2017**, *9* (18), 2715–2722.

- [100] Noticia de 2008 de la FAO sobre la crisis de la leche contaminada con melamina. **2017**. <http://www.fao.org/Newsroom/es/news/2008/1000926/index.html>
- [101] Eltzov, E.; Marks, R. S. Miniaturized Flow Stacked Immunoassay for Detecting *Escherichia coli* in a Single Step. *Anal. Chem.* **2016**, *88* (12), 6441–6449.
- [102] Landsteiner, K. *The Specificity of Serological Reactions*. Dover Publications: New York, **1962**.
- [103] Chen, P.; Tai, H. H. A sensitive enzyme immunoassay for cyclosporin A using antibodies generated against a novel hapten. *Res. Commun. Mol. Pathol. Pharmacol.* **1995**, *88* (3), 317–326.
- [104] 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* (3), 572–580.
- [105] 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* (7), 1791–1803.
- [106] Morales-Sanfrutos, J.; Lopez-Jaramillo, F. J.; Hernandez-Mateo, F.; Santoyo-Gonzalez, F. Vinyl Sulfone Bifunctional Tag Reagents for Single-Point Modification of Proteins. *J. Org. Chem.* **2010**, *75* (12), 4039–4047.
- [107] Inman, J. K.; Merchant, B.; Clafin, L.; Tacey, S. E. Coupling of large haptens to proteins and cell surfaces: Preparation of stable, optimally sensitized erythrocytes for hapten-specific, hemolytic plaque assays. *Immunochemistry* **1973**, *10* (3), 165–174.
- [108] Hermanson, G. T. Vaccines and Immunogen Conjugates. En *Bioconjugate Techniques*, 3rd Edition, Academic Press: San Diego, **2013**; pp 839–865.
- [109] López-Moreno, R.; Mercader, J. V.; Agulló, C.; Abad-Somovilla, A.; Abad-Fuentes, A. Immunoassays for trifloxystrobin analysis. Part I. Rational design of regioisomeric haptens and production of monoclonal antibodies. *Food Chem.* **2014**, *152*, 230–236.
- [110] Huisman, H.; Wynveen, P.; Setter, P. W. Studies on the immune response and preparation of antibodies against a large panel of conjugated neurotransmitters and biogenic amines: specific polyclonal antibody response and tolerance. *J. Neurochem.* **2010**, *112* (3), 829–841.
- [111] Parra, J.; Mercader, J. V.; Agulló, C.; Abad-Fuentes, A.; Abad-Somovilla, A. Concise and modular synthesis of regioisomeric haptens for the production of high-affinity and stereoselective antibodies to the strobilurin azoxystrobin. *Tetrahedron* **2011**, *67* (3), 624–635.
- [112] Wang, S.; Allan, R. D.; Skerritt, J. H.; Kennedy, I. R. Development of a Class-Specific Competitive ELISA for the Benzoylphenylurea Insecticides. *J. Agric. Food Chem.* **1998**, *46* (8), 3330–3338.

## Referencias

---

- [113] 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* (1), 30–39.
- [114] Mercader, J. V.; Montoya, Á. Development of Monoclonal ELISAs for Azinphos-methyl. 1. Hapten Synthesis and Antibody Production. *J. Agric. Food Chem.* **1999**, *47* (3), 1276–1284.
- [115] Khreich, N.; Lamourette, P.; Renard, P. Y.; Clavé, G.; Fenaille, F.; Créminon, C.; Volland, H. A highly sensitive competitive enzyme immunoassay of broad specificity quantifying microcystins and nodularins in water samples. *Toxicon* **2009**, *53* (5), 551–559.
- [116] 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* (2), 125–136.
- [117] Moon, J. K.; Keum, Y. S.; Hwang, E. C.; Park, B. S.; Chang, H. R.; Li, Q. X.; Kim, J. H. Hapten Syntheses and Antibody Generation for a New Herbicide, Metamifop. *J. Agric. Food Chem.* **2007**, *55* (14), 5416–5422.
- [118] 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.* **2007**, *79* (12), 4471–4483.
- [119] Altmann, K. G. Effect of cationization on anti-hapten antibody responses in sheep and mice. *Immunol. Cell Biol.* **1993**, *71*, 517–525.
- [120] Ogura, H.; Kobayashi, T.; Shimizu, K.; Kawabe, K.; Takeda, K. A novel active ester synthesis reagent (*N,N'*-disuccinimidyl carbonate). *Tetrahedron Lett.* **1979**, *20* (49), 4745–4746.
- [121] Langone, J. J.; Vanvunakis, H. Radioimmunoassay of nicotine, cotinine, and  $\gamma$ -(3-Pyridyl)- $\gamma$ -oxo-*N*-methylbutyramide. *Methods Enzymol.* **1982**, *84*, 628–640.
- [122] Ceballos-Alcantarilla, E.; Abad-Fuentes, A.; Aloisio, V.; Agulló, C.; Abad-Somovilla, A.; Mercader, J. V. Haptens, bioconjugates, and antibodies for penthiopyrad immunosensing. *Analyst* **2014**, *139* (21), 5358–5361.
- [123] Chodon, T.; Koya, R. C.; Odunsi, K. Active Immunotherapy of Cancer. *Immunol. Invest.* **2015**, *44* (8), 817–836.
- [124] Köhler, G.; Milstein, C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* **1975**, *256*, 495–497.
- [125] Altshuler, E. P.; Serebryanaya, D. V.; Katrukha, A. G. Generation of recombinant antibodies and means for increasing their affinity. *Biochemistry Mosc.* **2010**, *75* (13), 1584–1605.

- [126] Abad-Fuentes, A.; Montoya, Á. Production of Monoclonal Antibodies for Carbaryl from a Hapten Preserving the Carbamate Group. *J. Agric. Food Chem.* **1994**, *42* (8), 1818–1823.
- [127] 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.* **2008**, *56* (17), 7682–7690.
- [128] Stills, H. F. Adjuvants and Antibody Production: Dispelling the Myths Associated with Freund's Complete and Other Adjuvants. *ILAR J.* **2005**, *46* (3), 280–293.
- [129] Murphy, K.; Travers, P.; Walport, M. Inmunidad innata. En *Inmunobiología de Janeway, 7ª Edición*, McGraw-Hill Interamericana: México, **2008**; pp 39–109.
- [130] Murphy, K.; Travers, P.; Walport, M. *Inmunobiología de Janeway, 7ª Edición*. McGraw-Hill Interamericana: México, **2008**.
- [131] Murphy, K.; Travers, P.; Walport, M. Respuesta inmunitaria humoral. En *Inmunobiología de Janeway, 7ª Edición*, McGraw-Hill Interamericana: México, **2008**; pp 379–420.
- [132] Freund, J.; Casals, J.; Hosmer, E. P. Sensitization and antibody formation after injection of tubercle bacilli and paraffin oil. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **1937**, *37* (3), 509–513.
- [133] Lindblad, E. B. Freund's Adjuvants. En *Methods in Molecular Medicine*, Humana Press: New York, **2000**; Vol. 42, pp 49–63.
- [134] Boyles, M. S. P.; Stoehr, L. C.; Schlinkert, P.; Himly, M.; Duschl, A. The Significance and Insignificance of Carbon Nanotube-Induced Inflammation. *Fibers* **2014**, *2* (1), 45–74.
- [135] Zolnik, B. S.; González-Fernández, Á.; Sadrieh, N.; Dobrovolskaia, M. A. Minireview: Nanoparticles and the Immune System. *Endocrinology* **2010**, *151* (2), 458–465.
- [136] Hassan, H. A. F. M.; Smyth, L.; Rubio, N.; Ratnasothy, K.; Wang, J. T. W.; Bansal, S. S.; Summers, H. D.; Diebold, S. S.; Lombardi, G.; Al-Jamal, K. T. Carbon nanotubes' surface chemistry determines their potency as vaccine nanocarriers in vitro and in vivo. *J. Control. Release* **2016**, *225*, 205–216.
- [137] Sexton, A.; Whitney, P. G.; Chong, S. F.; Zelikin, A. N.; Johnston, A. P. R.; De Rose, R.; Brooks, A. G.; Caruso, F.; Kent, S. J. A protective vaccine delivery system for in vivo T cell stimulation using nanoengineered polymer hydrogel capsules. *ACS Nano* **2009**, *3* (11), 3391–3400.
- [138] Slütter, B.; Plapied, L.; Fievez, V.; Alonso-Sande, M.; des Rieux, A.; Schneider, Y. J.; Van Riet, E.; Jiskoot, W.; Préat, V. Mechanistic study of the adjuvant effect of biodegradable nanoparticles in mucosal vaccination. *J. Control. Release* **2009**, *138* (2), 113–121.
- [139] O'Hagan, D. T.; Rahman, D.; McGee, J. P.; Jeffery, H.; Davies, M. C.; Williams, P.; Davis, S. S.; Challacombe, S. J. Biodegradable microparticles as controlled release antigen delivery systems. *Immunology* **1991**, *73* (2), 239–242.

- [140] Peek, L. J.; Middaugh, C. R.; Berkland, C. Nanotechnology in vaccine delivery. *Adv. Drug Deliver. Rev.* **2008**, *60* (8), 915–928.
- [141] Liu, H.; Irvine, D. J. Guiding Principles in the Design of Molecular Bioconjugates for Vaccine Applications. *Bioconjugate Chem.* **2015**, *26* (5), 791–801.
- [142] Panyam, J.; Labhasetwar, V. Biodegradable nanoparticles for drug and gene delivery to cells and tissue. *Adv. Drug Deliver. Rev.* **2003**, *55* (3), 329–347.
- [143] Mundargi, R. C.; Babu, V. R.; Rangaswamy, V.; Patel, P.; Aminabhavi, T. M. Nano/micro technologies for delivering macromolecular therapeutics using poly(D,L-lactide-co-glycolide) and its derivatives. *J. Control. Release* **2008**, *125* (3), 193–209.
- [144] Gutierrez, I.; Hernández, R. M.; Igartua, M.; Gascón, A. R.; Pedraz, J. L. Influence of dose and immunization route on the serum Ig G antibody response to BSA loaded PLGA microspheres. *Vaccine* **2002**, *20*, 2181–2190.
- [145] Sartori, S.; Caporale, A.; Rechichi, A.; Cufari, D.; Cristallini, C.; Barbani, N.; Giusti, P.; Ciardelli, G. Biodegradable paclitaxel-loaded microparticles prepared from novel block copolymers: influence of polymer composition on drug encapsulation and release. *J. Pept. Sci.* **2013**, *19* (4), 205–213.
- [146] Dykman, L. A.; Matora, L. Y.; Bogatyrev, V. A. Use of colloidal gold to obtain antibiotin antibodies. *J. Microbiol. Methods* **1996**, *24* (3), 247–248.
- [147] Dykman, L. A.; Khlebtsov, N. G. Immunological properties of gold nanoparticles. *Chem. Sci.* **2017**, *8* (3), 1719–1735.
- [148] Ishii, N.; Fitrilawati, F.; Manna, A.; Akiyama, H.; Tamada, Y.; Tamada, K. Gold Nanoparticles Used as a Carrier Enhance Production of Anti-Hapten IgG in Rabbit: A Study with Azobenzene-Dye as a Hapten Presented on the Entire Surface of Gold Nanoparticles. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2008**, *72* (1), 124–131.
- [149] Chen, Y. S.; Hung, Y. C.; Lin, W. H.; Huang, G. S. Assessment of gold nanoparticles as a size-dependent vaccine carrier for enhancing the antibody response against synthetic foot-and-mouth disease virus peptide. *Nanotechnol.* **2010**, *21*, 195101.
- [150] Maquieira, Á.; Brun, E. M.; Garcés-García, M.; Puchades, R. Aluminum Oxide Nanoparticles as Carriers and Adjuvants for Eliciting Antibodies from Non-immunogenic Haptens. *Anal. Chem.* **2012**, *84* (21), 9340–9348.
- [151] Arad-Yellin, R.; Firer, M.; Kahana, N.; Green, B. S. Functionalized polysulfone as a novel and useful carrier for immunization and antibody detection. *React. Funct. Polym.* **2003**, *54*, 5–16.
- [152] Salman, H. H.; Irache, J. M.; Gamazo, C. Immunoadjuvant capacity of flagellin and mannosamine-coated poly(anhydride) nanoparticles in oral vaccination. *Vaccine* **2009**, *27* (35), 4784–4790.

- [153] Pantarotto, D.; Partidos, C. D.; Graff, R.; Hoebeke, J.; Briand, J. P.; Prato, M.; Bianco, A. Synthesis, Structural Characterization, and Immunological Properties of Carbon Nanotubes Functionalized with Peptides. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125* (20), 6160–6164.
- [154] Salvador-Morales, C.; Flahaut, E.; Sim, E.; Sloan, J.; Green, B. S.; Sim, R. B. Complement activation and protein adsorption by carbon nanotubes. *Mol. Immunol.* **2006**, *43* (3), 193–201.
- [155] Iijima, S. Helical microtubules of graphitic carbon. *Nature* **1991**, *354*, 56–58.
- [156] Dresselhaus, M. S.; Dresselhaus, G.; Avouris, P. *Carbon Nanotubes: Synthesis, Structure, Properties, and Applications*. Springer-Verlag: Berlin, **2001**.
- [157] Tasis, D.; Tagmatarchis, N.; Bianco, A.; Prato, M. Chemistry of Carbon Nanotubes. *Chem. Rev.* **2006**, *106* (3), 1105–1136.
- [158] Rubio, N.; Herrero, M. A.; de la Hoz, A.; Meneghetti, M.; Prato, M.; Vázquez, E. Versatile microwave-induced reactions for the multiple functionalization of carbon nanotubes. *Org. Biomol. Chem.* **2010** (8), 1936–1942.
- [159] Brunetti, F. G.; Herrero, M. A.; Muñoz, J. M.; Díaz-Ortiz, A.; Alfonsi, J.; Meneghetti, M.; Prato, M.; Vázquez, E. Microwave-Induced Multiple Functionalization of Carbon Nanotubes. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130* (25), 8094–8100.
- [160] Imholt, T. J.; Dyke, C. A.; Hasslacher, B.; Perez, J. M.; Price, D. W.; Roberts, J. A.; Scott, J. B.; Wadhawan, A.; Ye, Z.; Tour, J. M. Nanotubes in Microwave Fields: Light Emission, Intense Heat, Outgassing, and Reconstruction. *Chem. Mater.* **2003**, *15* (21), 3969–3970.
- [161] Liu, J.; Rinzler, A. G.; Dai, H.; Hafner, J. H.; Bradley, R. K.; Boul, P. J.; Lu, A.; Iverson, T.; Shelimov, K.; Huffman, C. B.; Rodriguez-Macias, F.; Shon, Y. S.; Lee, T. R.; Colbert, D. T.; Smalley, R. E. Fullerene pipes. *Science* **1998**, *280* (5367), 1253–1256.
- [162] Peng, H.; Alemany, L. B.; Margrave, J. L.; Khabashesku, V. N. Sidewall Carboxylic Acid Functionalization of Single-Walled Carbon Nanotubes. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125* (49), 15174–15182.
- [163] Georgakilas, V.; Kordatos, K.; Prato, M.; Guldi, D. M.; Holzinger, M.; Hirsch, A. Organic Functionalization of Carbon Nanotubes. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124* (5), 760–761.
- [164] Dumortier, H.; Lacotte, S.; Pastorin, G.; Marega, R.; Wu, W.; Bonifazi, D.; Briand, J. P.; Prato, M.; Muller, S.; Bianco, A. Functionalized Carbon Nanotubes Are Non-Cytotoxic and Preserve the Functionality of Primary Immune Cells. *Nano Lett.* **2006**, *6* (7), 1522–1528.
- [165] Prato, M.; Kostarelos, K.; Bianco, A. Functionalized Carbon Nanotubes in Drug Design and Discovery. *Acc. Chem. Res.* **2008**, *41* (1), 60–68.
- [166] Van den Bossche, J.; Al-Jamal, W. T.; Tian, B.; Nunes, A.; Fabbro, C.; Bianco, A.; Prato, M.; Kostarelos, K. Efficient receptor-independent intracellular translocation of

- aptamers mediated by conjugation to carbon nanotubes. *Chem. Commun.* **2016**, *46*, 7379–7381.
- [167] Pantarotto, D.; Partidos, C. D.; Hoebeke, J.; Brown, F.; Kramer, E.; Briand, J. P.; Muller, S.; Prato, M.; Bianco, A. Immunization with Peptide-Functionalized Carbon Nanotubes Enhances Virus-Specific Neutralizing Antibody Responses. *Chem. Biol.* **2003**, *10* (10), 961–966.
- [168] Parra, J.; Abad-Somovilla, A.; Mercader, J. V.; Taton, T. A.; Abad-Fuentes, A. Carbon nanotube-protein carriers enhance size-dependent self-adjuvant antibody response to haptens. *J. Control. Release* **2013**, *170* (2), 242–251.
- [169] Parra, J.; Mercader, J. V.; Agulló, C.; Abad-Somovilla, A.; Abad-Fuentes, A. Synthesis of azoxystrobin transformation products and selection of monoclonal antibodies for immunoassay development. *Toxicol. Lett.* **2012**, *210* (2), 240–247.
- [170] Girotti, S.; Eremin, S.; Montoya, Á.; 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* (2), 687–695.
- [171] Friguet, B.; Chaffotte, A. F.; Djavadi-Ohanian, L.; Goldberg, M. E. Measurements of the true affinity constant in solution of antigen-antibody complexes by enzyme-linked immunosorbent assay. *J. Immunol. Methods* **1985**, *77* (2), 305–319.
- [172] Larvor, M. P.; Djavadi-Ohanian, L.; Nall, B.; Goldberg, M. E. Measurement of the dissociation rate constant of antigen/antibody complexes in solution by enzyme-linked immunosorbent assay. *J. Immunol. Methods* **1994**, *170* (2), 167–175.
- [173] Hardy, F.; Djavadi-Ohanian, L.; Goldberg, M. E. Measurement of antibody/antigen association rate constants in solution by a method based on the enzyme-linked immunosorbent assay. *J. Immunol. Methods* **1997**, *200*, 155–159.
- [174] Wood, R. W. On a remarkable case of uneven distribution of light in a diffraction grating spectrum. *Philos. Mag.* **1902**, *4* (21), 396–402.
- [175] Yakes, B. J.; Kanyuck, K. M.; DeGrasse, S. L. First Report of a Direct Surface Plasmon Resonance Immunosensor for a Small Molecule Seafood Toxin. *Anal. Chem.* **2014**, *86* (18), 9251–9255.
- [176] Wang, S.; Zhao, S.; Wei, X.; Zhang, S.; Liu, J.; Dong, Y. An Improved Label-Free Indirect Competitive SPR Immunosensor and Its Comparison with Conventional ELISA for Ractopamine Detection in Swine Urine. *Sensors* **2017**, *17* (3), 604.
- [177] Stanker, L. H.; Beier, R. C. Introduction to Immunoassays for Residue Analysis. En *Immunoassays for Residue Analysis*, American Chemical Society: Washington, D. C., **1996**; Vol. 621, pp 2–16.
- [178] Shelver, W. L.; Keum, Y. S.; Kim, H. J.; Rutherford, D.; Hakk, H. H.; Bergman, Å.; Li, Q. X. Hapten Syntheses and Antibody Generation for the Development of a Polybrominated Flame Retardant ELISA. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53* (10), 3840–3847.

- [179] 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* (23), 6675–6682.
- [180] Ahn, K. C.; Watanabe, T.; Gee, S. J.; Hammock, 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* (15), 4583–4594.
- [181] Anastassiades, M.; Lehotay, S. J.; Štajnbaher, 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* (2), 412–431.
- [182] Lehotay, S. J. Determination of Pesticide Residues in Foods by Acetonitrile Extraction and Partitioning with Magnesium Sulfate: Collaborative Study. *J. AOAC Int.* **2007**, *90* (2), 485–520.
- [183] *Foods of plant origin – Determination of pesticide residues using GC–MS and/or LC–MS/MS following acetonitrile extraction/partitioning and clean-up by dispersive SPE – QuEChERS-method.* Comité Europeo de Normalización (CEN) EN 15662:2008, **2008**.
- [184] Mountford, A. J.; Lancaster, S. J.; Coles, S. J.; Horton, P. N.; Hughes, D. L.; Hursthouse, M. B.; Light, M. E. Intra- and Intermolecular N–H···F–C Hydrogen-Bonding Interactions in Amine Adducts of Tris(pentafluorophenyl)borane and -alane. *Inorg. Chem.* **2005**, *44* (16), 5921–5933.
- [185] Chaudhari, S. R.; Mogurampelly, S.; Suryaprakash, N. Engagement of CF<sub>3</sub> Group in N–H···F–C Hydrogen Bond in the Solution State: NMR Spectroscopy and MD Simulation Studies. *J. Phys. Chem. B* **2013**, *117* (4), 1123–1129.
- [186] Glatthar, R.; Orain, D.; Spanka, C. *Nicotinic Acid Derivatives as Modulators of Metabotropic Glutamate Receptors.* PCT Int. Appl. WO 2007071358 A1, **2007**.
- [187] Zhao, Y.; Chen, G. Palladium-Catalyzed Alkylation of ortho-C(sp<sup>2</sup>)-H Bonds of Benzylamide Substrates with Alkyl Halides. *Org. Lett.* **2011**, *13* (18), 4850–4853.
- [188] Collman, J. P.; Yang, Y.; Decréau, R. A. Synthesis of Nitric Oxide Reductase Active Site Models Bearing Key Components at Both Distal and Proximal Sites. *Org. Lett.* **2007**, *9* (15), 2855–2858.
- [189] Iwai, T.; Nakai, T.; Mihara, M.; Ito, T.; Mizuno, T.; Ohno, T. Pd-Catalyzed Cross-Coupling Reactions of Pyridine Carboxylic Acid Chlorides with Alkylzinc Reagents. *Synlett* **2009** (7), 1091–1094.
- [190] Armarego, W. L. F.; Chai, C. L. L. *Purification of Laboratory Chemicals, 6th Edition.* Butterworth-Heinemann: Burlington, **2009**.
- [191] Singh, R.; Majumder, U.; Shreeve, J. M. Nucleophilic Di- and Tetrafluorination of Dicarboxyl Compounds. *J. Org. Chem.* **2001**, *66* (19), 6263–6267.

## Referencias

---

- [192] Mita, T.; Maeda, K.; Komoda, M.; Ikeda, E.; Toyama, K.; Iwasa, M. *Null. U. S. Pat. Appl. Publ. US 20090156643 A1*, **2009**.
- [193] Han, S. Y.; Kim, Y. A. Recent development of peptide coupling reagents in organic synthesis. *Tetrahedron* **2004**, *60* (11), 2447–2467.
- [194] Jiao, Y.; Xin, B. T.; Zhang, Y.; Wu, J.; Lu, X.; Zheng, Y.; Tang, W.; Zhou, X. Design, synthesis and evaluation of novel 2-(1H-imidazol-2-yl)pyridine Sorafenib derivatives as potential BRAF inhibitors and anti-tumor agents. *Eur. J. Med. Chem.* **2015**, *90*, 170–183.
- [195] Bauer, U. A.; Birch, A. M.; Butlin, R. J.; Green, C.; Barlind, J. G.; Hovland, R.; Johannesson, P.; Johansson, J. M.; Leach, A.; Noeske, A. T.; Petersson, A. U. *Carbamoyl compounds as DGAT1 inhibitors* 190. PCT Int. Appl. WO 2009081195 A1, **2009**.
- [196] Armani, E.; Amari, G.; Esposito, O.; Carzaniga, L.; Capaldi, C. *1-Phenyl-2-pyridinyl alkyl alcohol derivatives as phosphodiesterase inhibitors*. U. S. Pat. Appl. Publ. US 2014155391 A1, **2014**.
- [197] Ohno, M.; Gao, Z. G.; Van Rompaey, P.; Tchilibon, S.; Kim, S. K.; Harris, B. A.; Gross, A. S.; Duong, H. T.; Van Calenbergh, S.; Jacobson, K. A. *Null. Bioorg. Med. Chem.* **2004**, *12* (11), 2995–3007.
- [198] Nair, V.; Richardson, S. G. Utility of Purinyl Radicals in the Synthesis of Base-Modified Nucleosides and Alkylpurines: 6-Amino Group Replacement by H, Cl, Br, and I. *J. Org. Chem.* **1980**, *45* (20), 3969–3974.
- [199] Le Brazidec, J. Y.; Gilson III, C. A.; Boehm, M. F. Stereoselective Synthesis of the C1-C13 Fragment of 2,3-Dihydrodorriginocin A. *J. Org. Chem.* **2005**, *70* (20), 8212–8215.
- [200] Chinchilla, R.; Nájera, C. The Sonogashira Reaction: A Booming Methodology in Synthetic Organic Chemistry. *Chem. Rev.* **2007**, *107* (3), 874–922.
- [201] Enquist, J. A.; Virgil, S. C.; Stoltz, B. M. Total Syntheses of Cyanthiwiggins B, F, and G. *Chem. Eur. J.* **2011**, *17* (36), 9957–9969.
- [202] Cano, M.; Ladlow, M.; Balasubramanian, S. Practical Synthesis of a Dithiane-Protected 3',5'-Dialkoxybenzoic Photolabile Safety-Catch Linker for Solid-Phase Organic Synthesis. *J. Org. Chem.* **2002**, *67* (1), 129–135.
- [203] Molander, G. A.; Vargas, F.  $\beta$ -Aminoethyltrifluoroborates: Efficient Aminoethylations via Suzuki-Miyaura Cross-Coupling. *Org. Lett.* **2007**, *9* (2), 203–206.
- [204] Molander, G. A.; Shin, I. Synthesis and Suzuki-Miyaura Cross-Coupling Reactions of Potassium Boc-Protected Aminomethyltrifluoroborate with Aryl and Hetaryl Halides. *Org. Lett.* **2011**, *13* (15), 3956–3959.
- [205] Bunda, J. L.; Cox, C. D.; Dudkin, V. Y.; Fiji, H. D.; Kelly, M. J.; Layton, M. E.; Pero, J. E.; Shipe, W. D.; Steen, J. T. *Isoindolinone PDE10 inhibitors*. PCT Int. Appl. WO 2012058133 A1, **2012**.

- [206] Mu, H.; Wang, B.; Xu, Z. L.; Sun, Y. M.; Huang, X.; Shen, Y. D.; Eremin, S.; Zherdev, A. V.; Dzantiev, B. B.; Lei, H. T. Stereospecific recognition and quantitative structure–activity relationship between antibodies and enantiomers: ofloxacin as a model hapten. *Analyst* **2015**, *140*, 1037–1045.
- [207] Black, J.; Boehmer, J. E.; Chrystal, E. J. T.; Kozakiewicz, A. M.; Plant, A. *Novel herbicides*. PCT Int. Appl. WO 2007071900 A1, **2007**.
- [208] Cook, B. N.; Harcken, C.; Lee, T. W.; Liu, P.; Mao, C.; Lord, J.; Mao, W.; Raudenbush, B. C.; Razavi, H.; Sarko, C. R.; Swinamer, A. D. *Pyrazole compounds as CCR1 Antagonists*. PCT Int. Appl. WO 2009137338 A1, **2009**.
- [209] Campaigne, E.; Monroe, P. A. 3-Substituted Thiophenes. VII. Derivatives of 3-Aminothiophene. *J. Am. Chem. Soc.* **1954**, *76* (9), 2447–2450.
- [210] Coutts, I. G. C.; Edwards, M.; Richards, D. J. Mild Selective Hydrolysis of the Methyl Esters of some ortho-Substituted Aromatic Carboxylic Acids. *Synthesis* **1981** (6), 487–489.
- [211] Snégaroff, K.; Lassagne, F.; Bentabed-Ababsa, G.; Nassar, E.; Ely, S. C. S.; Hesse, S.; Perspicace, E.; Derdour, A.; Mongin, F. Direct metallation of thienopyrimidines using a mixed lithium–cadmium base and antitumor activity of functionalized derivatives. *Org. Biomol. Chem.* **2009**, *7* (22), 4782–4788.
- [212] Cook, J. M.; Edwankar, R. V.; Edwankar, C. R.; Huang, S.; Jain, H. D.; Yang, J.; Rivas, F.; Zhou, H. *Selective anticonvulsant agents and their uses*. U. S. Pat. Appl. Publ. US 20100261711 A1, **2010**.
- [213] Kolodziejczyk, K.; Roiban, G. D.; Schnürch, M.; Mihovilovic, M. D.; Stanetty, P. Synthesis of potential fungicides based on *N*-(3-furanyl)pyrrolecarboxamides and *N*-(3-furanyl)pyrazolecarboxamides. *Monatsh. Chem.* **2009**, *140* (11), 1349–1359.
- [214] Voigtritter, K.; Ghorai, S.; Lipshutz, B. H. Rate Enhanced Olefin Cross-Metathesis Reactions: The Copper Iodide Effect. *J. Org. Chem.* **2011**, *76* (11), 4697–4702.
- [215] Gronowitz, S.; Gjöes, N.; Kellogs, R. M.; Wynberg, H. Bromination of 3-phenylthiophene. *J. Org. Chem.* **1967**, *32* (2), 463–464.
- [216] Castaño-Mansanet, A. M.; Cordier, F. L.; Domínguez-Manzanares, E.; Hong, J. E.; Hornback, W. J.; Jiang, D. *AMPA receptor potentiators*. PCT Int. Appl. WO 2006132811 A2, **2006**.
- [217] Zhao, H.; Guo, X.; Tian, H.; Li, C.; Xie, Z.; Geng, Y.; Wang, F. Alkyl substituted [6,6]-thienyl-C<sub>61</sub>-butyric acid methyl esters: easily accessible acceptor materials for bulk-heterojunction polymer solar cells. *J. Mater. Chem.* **2010**, *20* (15), 3092–3097.
- [218] Takemiya, A.; Hartwig, J. F. Rhodium-Catalyzed Intramolecular, Anti-Markovnikov Hydroamination. Synthesis of 3-Arylpiperidines. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128* (18), 6042–6043.

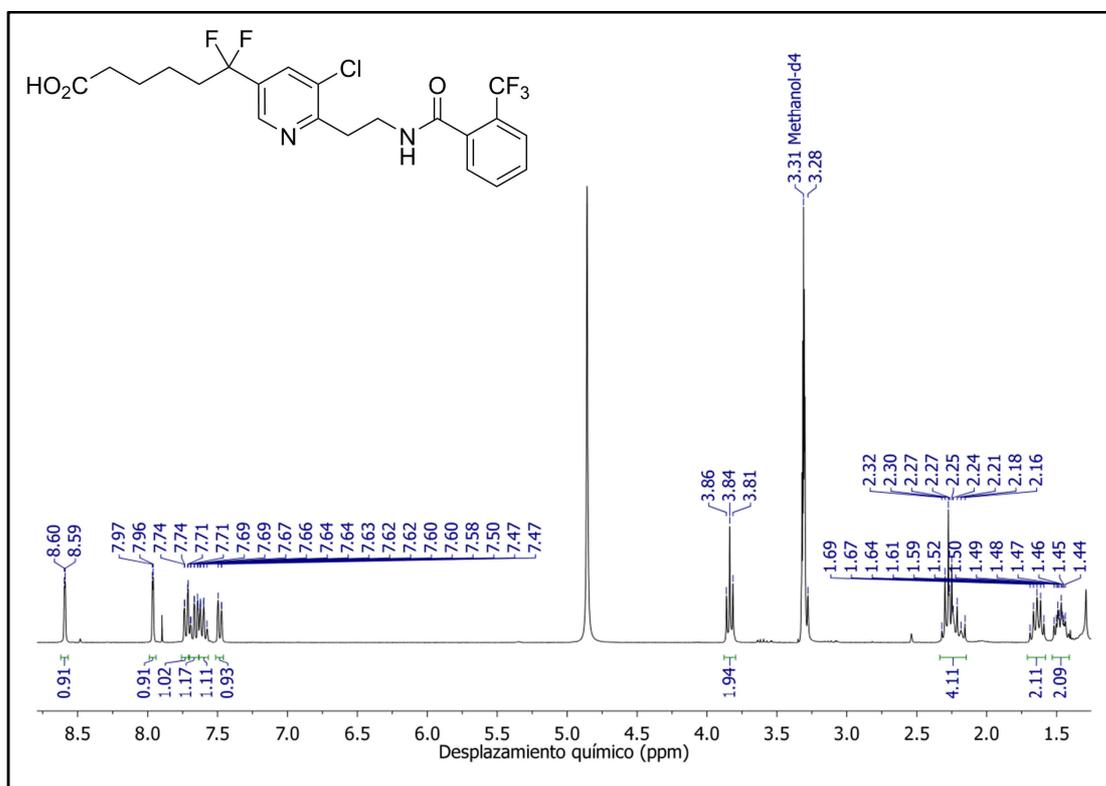
- [219] Beshore, D. C.; Dipardo, R. M.; Kuduk, S. D. *Fused pyridone M1 receptor positive allosteric modulators*. PCT Int. Appl. WO 2009102588 A1, **2009**.
- [220] Dodge, J. A.; Richardson, T. I.; Clarke, C. A.; Jones, S. A.; Hinklin, R. J.; Hummel, C. W.; Lewis, G. S. *Selective Estrogen Receptor Modulator*. PCT Int. Appl. WO 2010036497 A2, **2010**.
- [221] Lane, K. J.; Pinder, A. R. Synthesis of Catalpalactone. *J. Org. Chem.* **1982**, *47* (16), 3171–3172.
- [222] Vashist, S. K. Comparison of 1-Ethyl-3-(3-Dimethylaminopropyl) Carbodiimide Based Strategies to Crosslink Antibodies on Amine-Functionalized Platforms for Immunodiagnostic Applications. *Diagnostics* **2012**, *2* (3), 23–33.
- [223] Hermanson, G. T. *Bioconjugate Techniques, 3rd Edition*. Academic Press: San Diego, **2013**.
- [224] Majorek, K. A.; Porebski, P. J.; Dayal, A.; Zimmerman, M. D.; Jablonska, K.; Stewart, A. J.; Chruszcz, M.; Minor, W. Structural and immunologic characterization of bovine, horse, and rabbit serum albumins. *Mol. Immunol.* **2012**, *52* (3-4), 174–182.
- [225] Stein, P. E.; Leslie, A. G. W.; Finch, J. T.; Carrell, R. W. Crystal structure of uncleaved ovalbumin at 1.95 Å resolution. *J. Mol. Biol.* **1991**, *221* (3), 941–959.
- [226] Berglund, G. I.; Carlsson, G. H.; Smith, A. T.; Szöke, H.; Henriksen, A.; Hajdu, J. The catalytic pathway of horseradish peroxidase at high resolution. *Nature* **2002**, *417*, 463–468.
- [227] Day, Y. S. N.; Baird, C. L.; Rich, R. L.; Myszka, D. G. Direct comparison of binding equilibrium, thermodynamic, and rate constants determined by surface- and solution-based biophysical methods. *Protein Sci.* **2002**, *11* (5), 1017–1025.
- [228] Langmuir, I. The constitution and fundamental properties of solids and liquids. Part I. Solids. *J. Am. Chem. Soc.* **1916**, *38* (11), 2221–2295.
- [229] Foo, K. Y.; Hameed, B. H. Insights into the modeling of adsorption isotherm systems. *Chem. Eng. J.* **2010**, *156* (1), 2–10.
- [230] Tsukahara, Y.; Yamauchi, T.; Kawamoto, T.; Wada, Y. Functionalization of Multi-Walled Carbon Nanotubes Realized by Microwave-Driven Chemistry Inducing Dispersibility in Liquid Media. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **2008**, *81* (3), 387–392.
- [231] Hanaor, D.; Michelazzi, M.; Leonelli, C.; Sorrell, C. C. The effects of carboxylic acids on the aqueous dispersion and electrophoretic deposition of ZrO<sub>2</sub>. *J. Eur. Ceram. Soc.* **2012**, *32* (1), 235–244.
- [232] Bland, J. M.; Altman, D. G. Statistical methods for assessing agreement between two methods of clinical measurement. *Lancet* **1986**, *327* (8476), 307–310.
- [233] Garau, V. L.; Abreu, S. D. M.; Caboni, P.; Angioni, A.; Alves, A.; Cabras, P. Residue-free Wines: Fate of Some Quinone outside Inhibitor (Qol) Fungicides in the Winemaking Process. *J. Agric. Food Chem.* **2009**, *57* (6), 2329–2333.

- [234] Cabras, P.; Angioni, A.; Garau, V. L.; Pirisi, F. M.; Cabitza, F.; Pala, M.; Farris, G. A. Fenhexamid residues in grapes and wine. *Food Addit. Contam.* **2001**, *18* (7), 625–629.
- [235] Angioni, A.; Dedola, F.; Garau, V. L.; Schirra, M.; Caboni, P. Fate of Iprovalicarb, Indoxacarb, and Boscalid Residues in Grapes and Wine by GC–ITMS Analysis. *J. Agric. Food Chem.* **2011**, *59* (12), 6806–6812.
- [236] Sakamoto, T.; Cullen, M. D.; Hartman, T. L.; Watson, K. M.; Buckheit, R. W.; Pannecouque, C.; De Clercq, E.; Cushman, M. 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.
- [237] Ramón, D. J.; Yus, M. Direct synthesis of  $\delta$ -lactones from 2-(3-lithiopropyl)-1,3-dioxolane and carbonyl compounds. *Tetrahedron Lett.* **1990**, *31* (26), 3767–3770.
- [238] Rios, M. Y.; Salazar, E.; Olivo, H. F. Chemo-enzymatic Baeyer–Villiger oxidation of cyclopentanone and substituted cyclopentanones. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2008**, *54* (3–4), 61–66.
- [239] Cooke, T.; Hardy, D.; Moloney, B.; Thomas, P. S.; Steele, C. R.; Briggs, G. G. *Fungicides*. PCT Int. Appl. WO 0111965 A1, **2001**.
- [240] Kearney, J. F.; Radbruch, A.; Liesegang, B.; Rajewsky, K. A New Mouse Myeloma Cell Line that Has Lost Immunoglobulin Expression but Permits the Construction of Antibody-Secreting Hybrid Cell Lines. *J. Immunol.* **1979**, *123* (4), 1548–1550.
- [241] Nowinski, R. C.; Lostrom, M. E.; Tam, M. R.; Stone, M. R.; Burnette, W. N. The isolation of hybrid cell lines producing monoclonal antibodies against the p15(E) protein of ecotropic murine leukemia viruses. *Virology* **1979**, *93* (1), 111–126.
- [242] Raab, G. M. Comparison of a logistic and a mass-action curve for radioimmunoassay data. *Clin. Chem.* **1983**, *29* (10), 1757–1761.
- [243] Davies, C. W. *Ion Association*. Butterworths: London, **1962**.

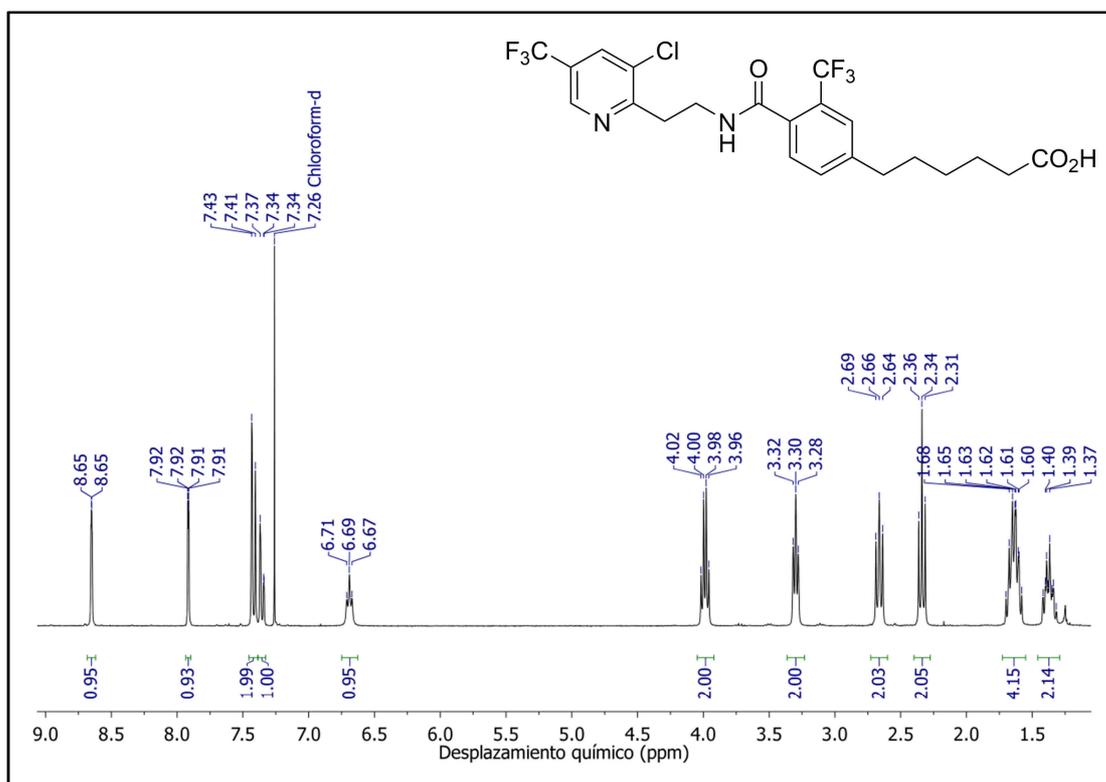


# ANEXO I. ESPECTROS DE RMN SELECCIONADOS

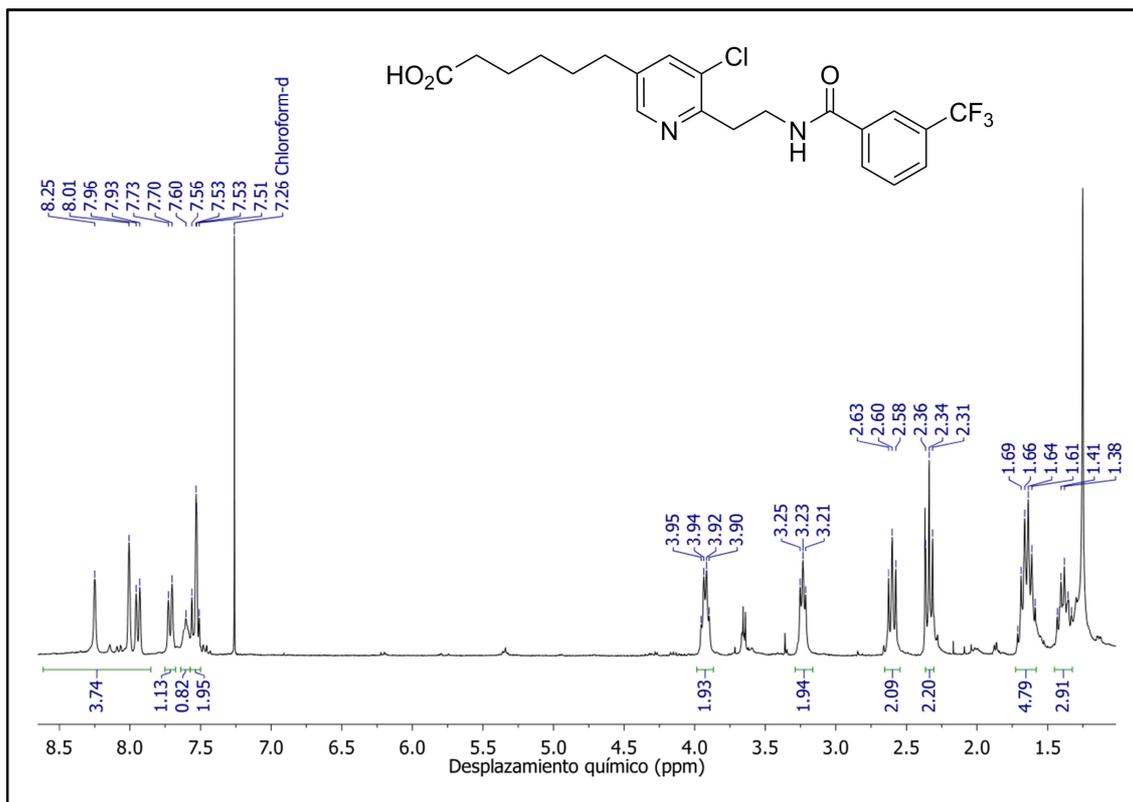
Espectro de RMN-<sup>1</sup>H del hapteno FPa (**34**) en MeOH-*d*<sub>4</sub>



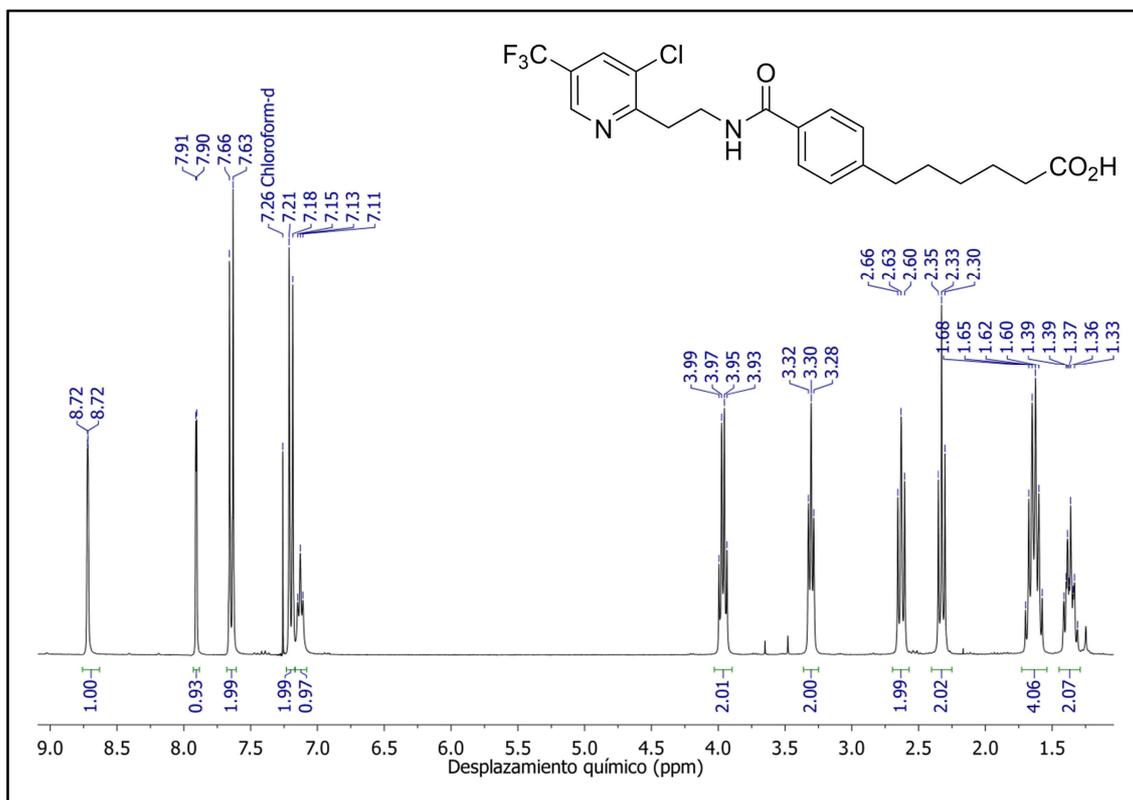
Espectro de RMN-<sup>1</sup>H del hapteno FPb (**35**) en CDCl<sub>3</sub>

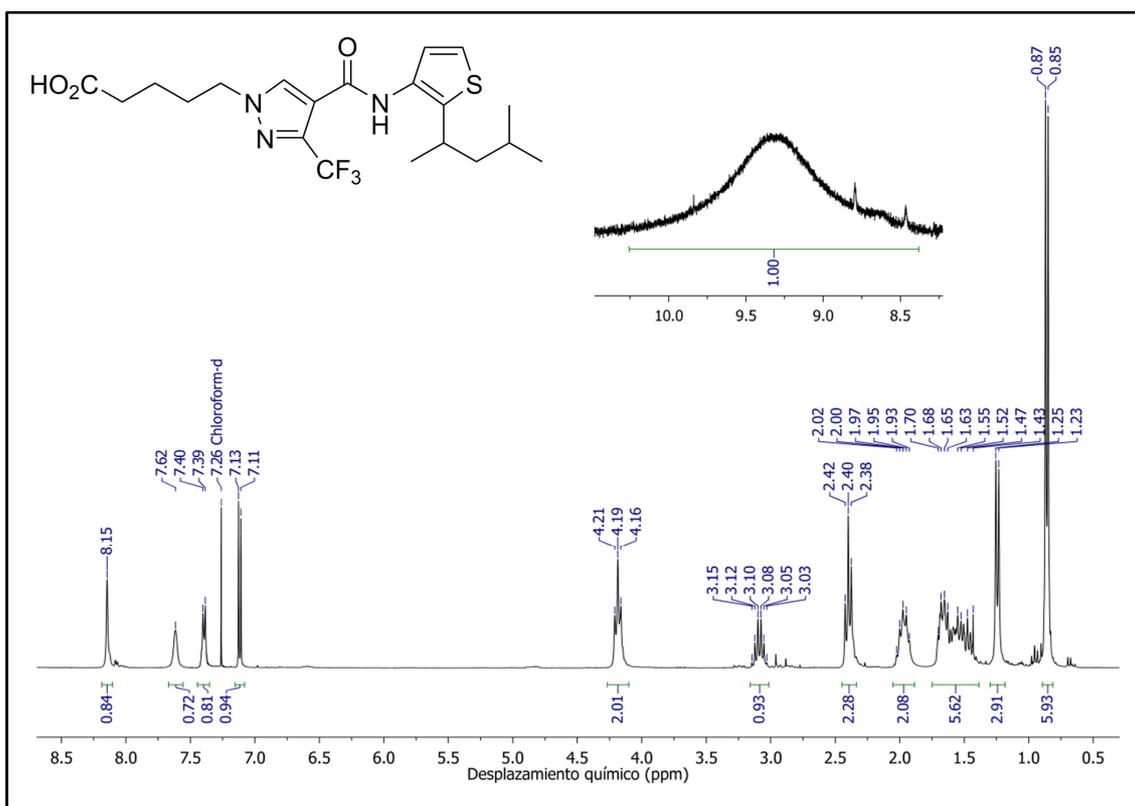
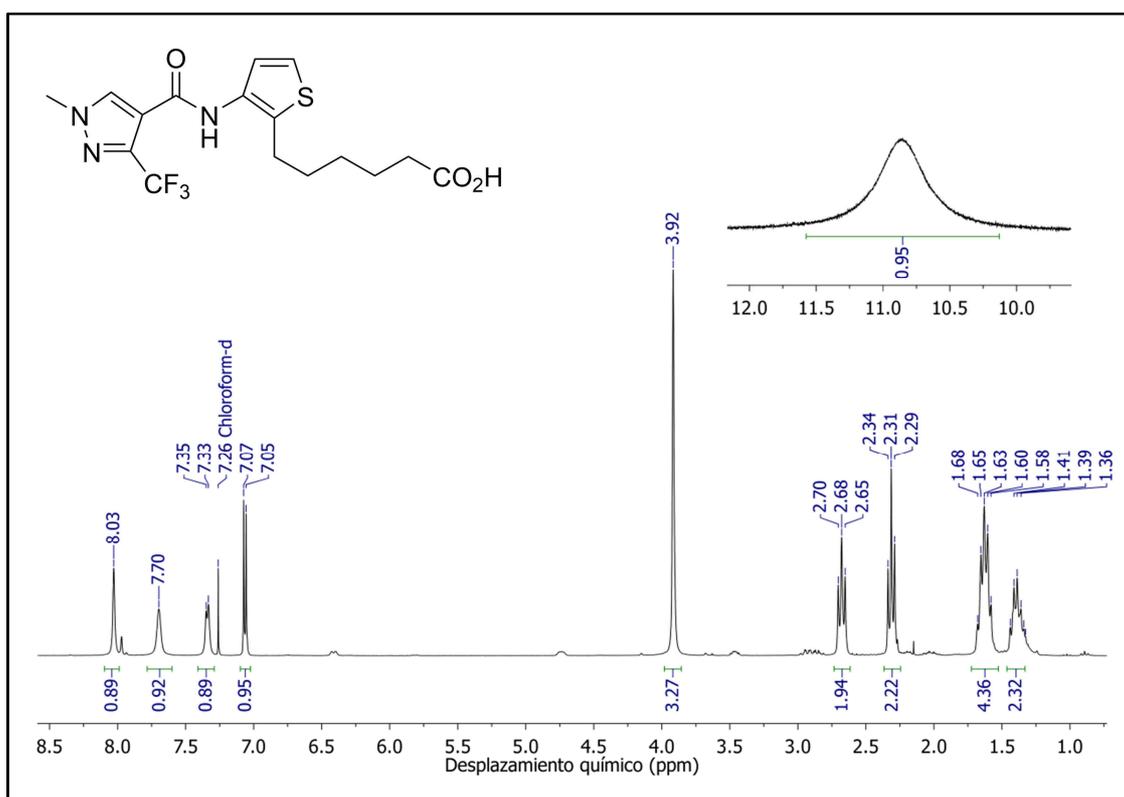


Espectro de RMN-<sup>1</sup>H del hapteno FPha' (**72**) en CDCl<sub>3</sub>

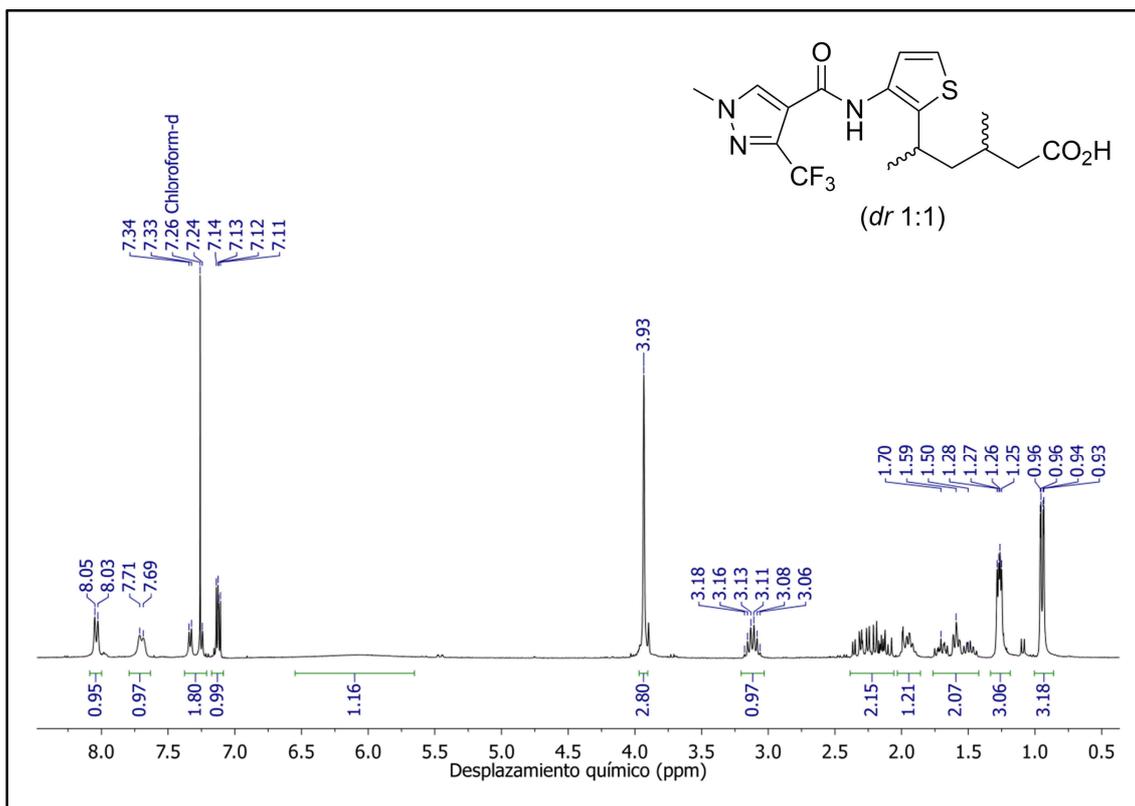


Espectro de RMN-<sup>1</sup>H del hapteno FPhb (**37**) en CDCl<sub>3</sub>

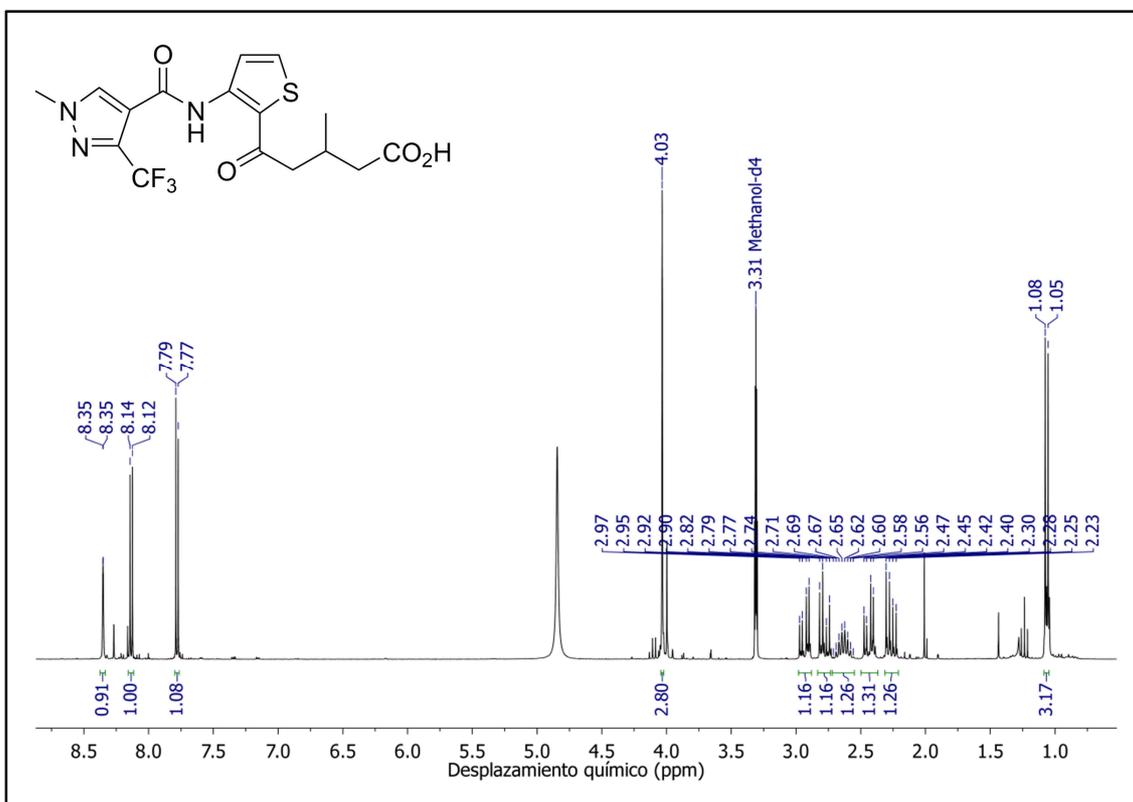


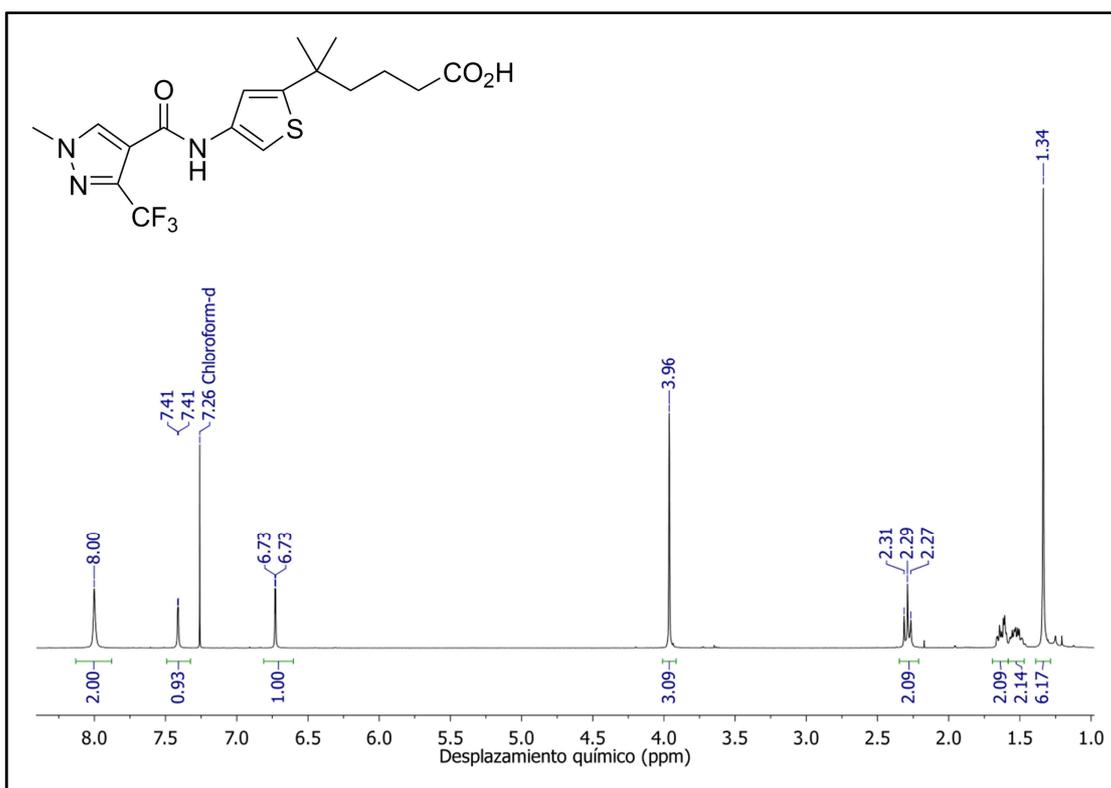
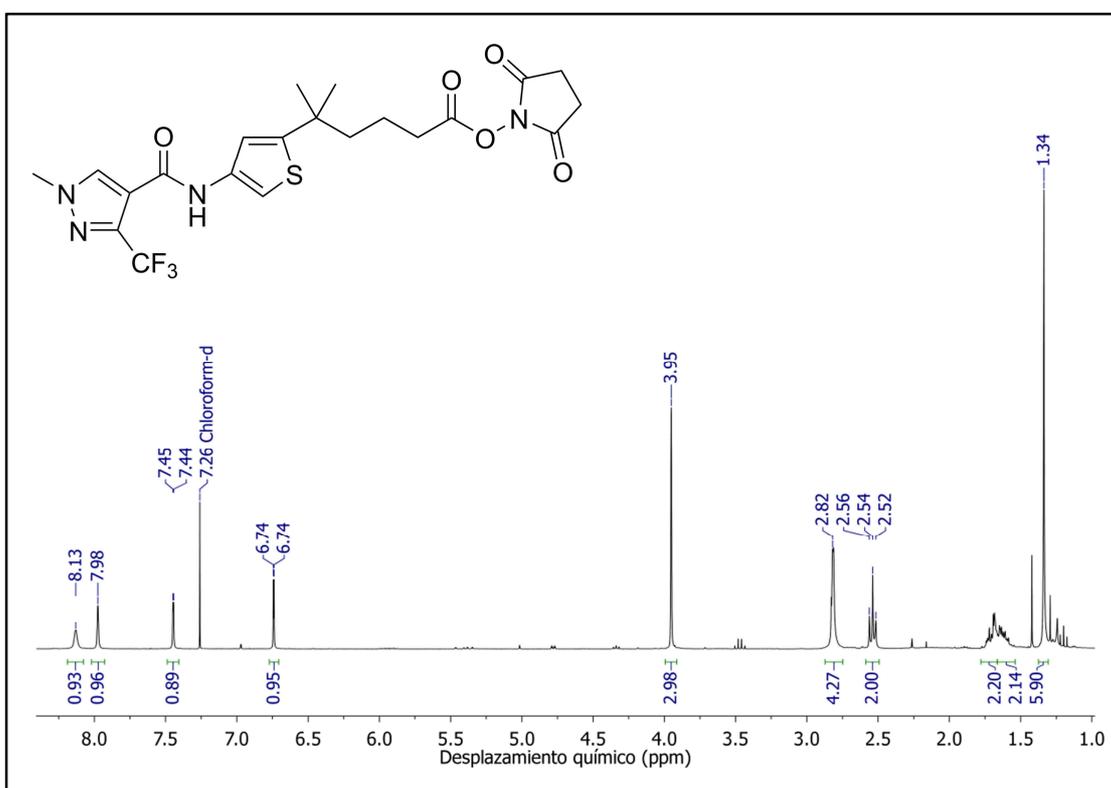
Espectro de RMN-<sup>1</sup>H del hapteno PPa (79) en CDCl<sub>3</sub>Espectro de RMN-<sup>1</sup>H del hapteno PPb (80) en CDCl<sub>3</sub>

Espectro de RMN-<sup>1</sup>H del hapteno P<sub>P</sub>m (**81**) en CDCl<sub>3</sub>



Espectro de RMN-<sup>1</sup>H del hapteno P<sub>P</sub>o (**83**) en MeOH-*d*<sub>4</sub>

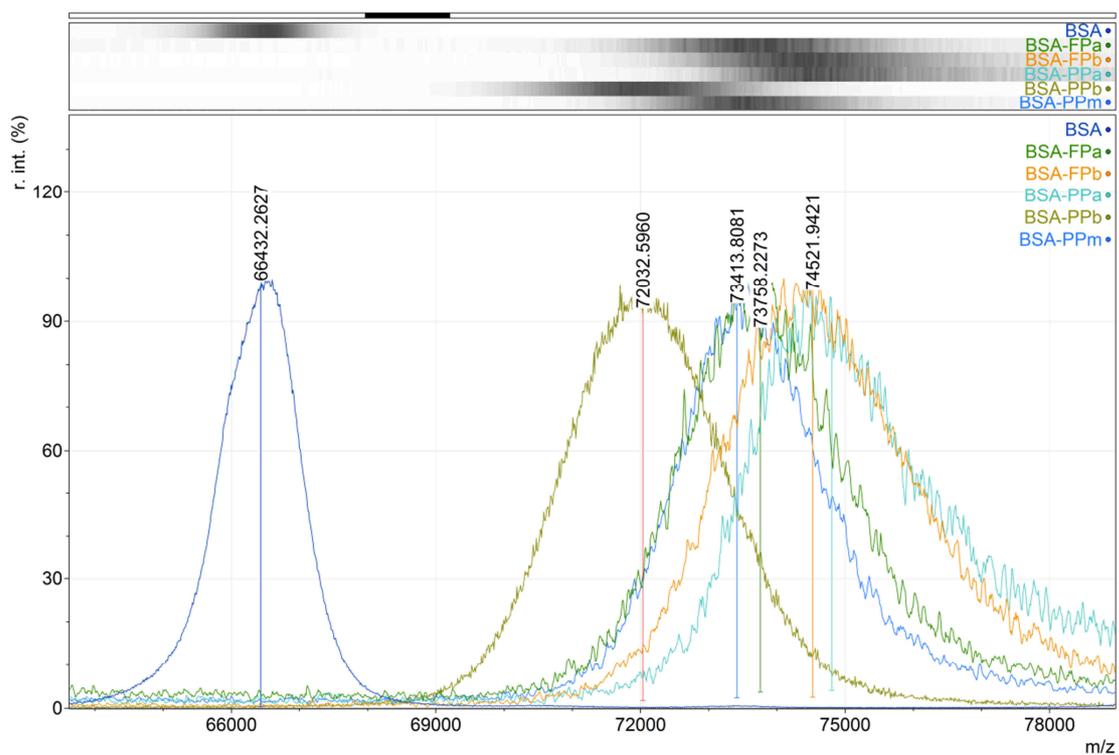


Espectro de RMN-<sup>1</sup>H del hapteno PPd' (**102**) en CDCl<sub>3</sub>Espectro de RMN-<sup>1</sup>H del hapteno PPd' activado (PPd'-NHS, **110**) en CDCl<sub>3</sub>



## ANEXO II. ESPECTROS MALDI-TOF

### Espectros MALDI-TOF de BSA y los conjugados BSA-hapteno preparados



**Tabla AII.1.** Relaciones molares hapteno/proteína (RM) para los conjugados BSA-hapteno obtenidas mediante MALDI-TOF.

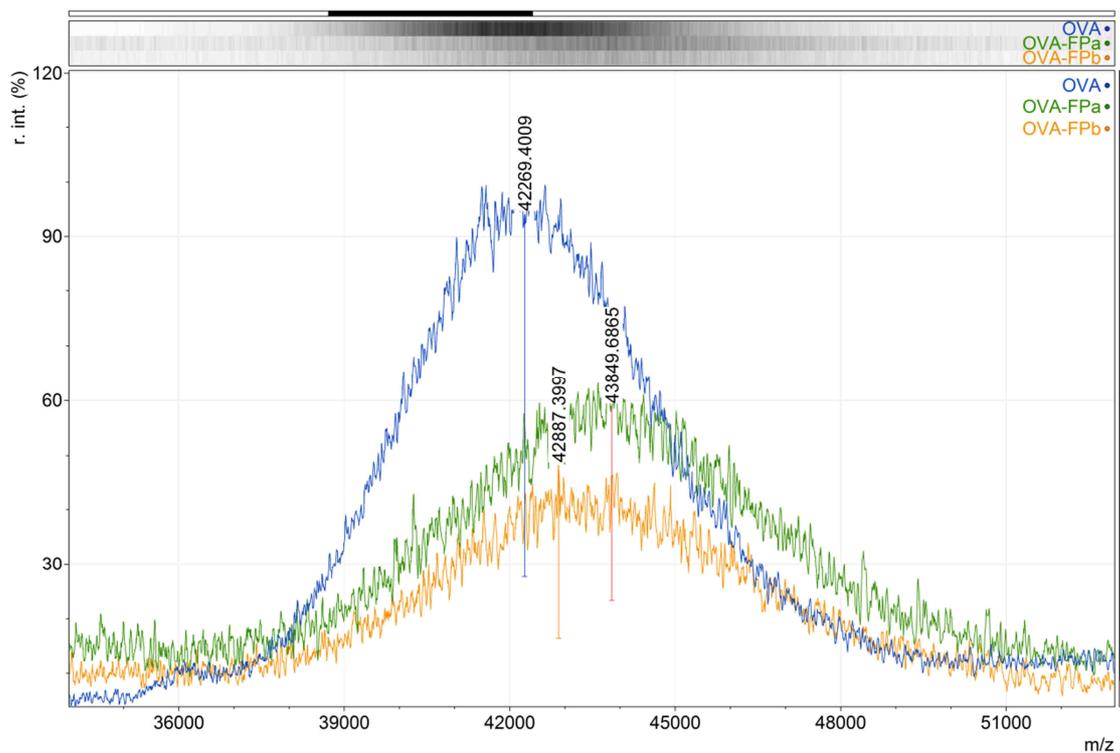
Conjugado	RM <sub>0</sub> <sup>a</sup>	m/z <sup>b</sup>	(m/z) <sub>c</sub> - (m/z) <sub>p</sub> <sup>c</sup>	Δ(m/z) <sup>d</sup>	RM <sup>e</sup>
BSA	-	66432.26	-	-	-
BSA-FPa	24	73758.23	7325.97	460.11	16
BSA-FPb	24	74521.94	8089.68	492.11	16.5
BSA-PPa	24	74800.41	8368.15	427.16	19.5
BSA-PPb	24	72032.60	5600.34	371.10	15
BSA-PPm	24	73413.81	6981.55	385.12	18

<sup>a</sup> Número de moles de hapteno por mol de proteína mezclados al inicio de la conjugación.

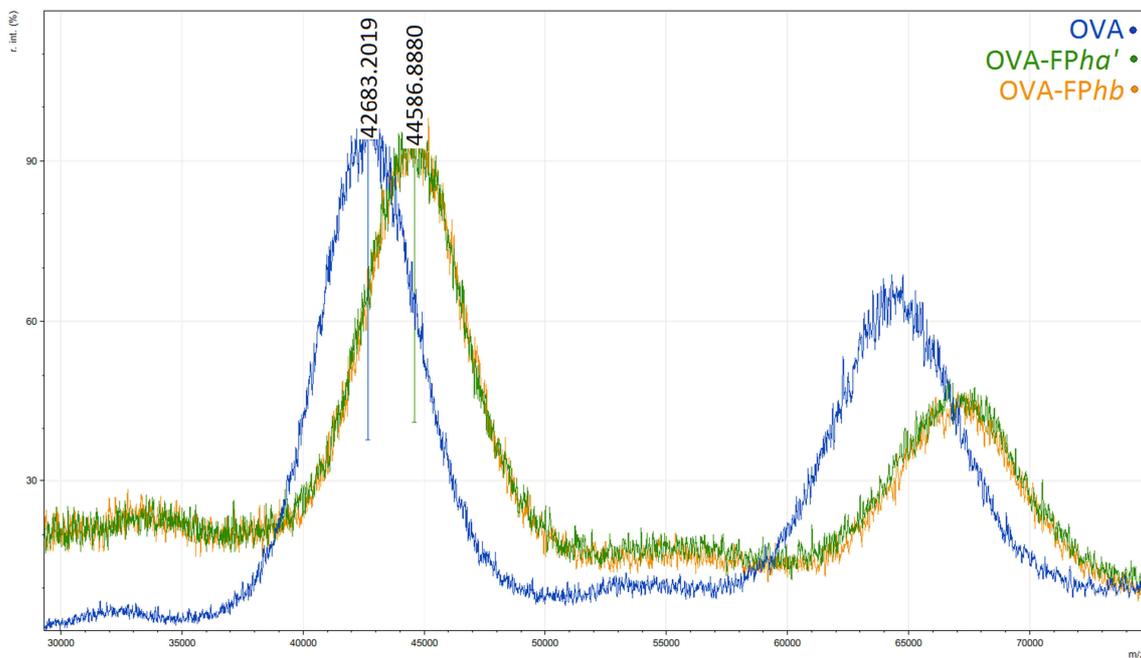
<sup>b</sup> Valor de m/z para la proteína o el conjugado tomado del espectro. <sup>c</sup> Diferencia entre el valor de m/z del conjugado y el de la proteína. <sup>d</sup> Incremento de m/z esperado por molécula de hapteno enlazada. <sup>e</sup> Relación molar calculada según la Ecuación 5.8 (sección 5.5.3).

Espectros MALDI-TOF de OVA y los conjugados OVA-hapteno preparados

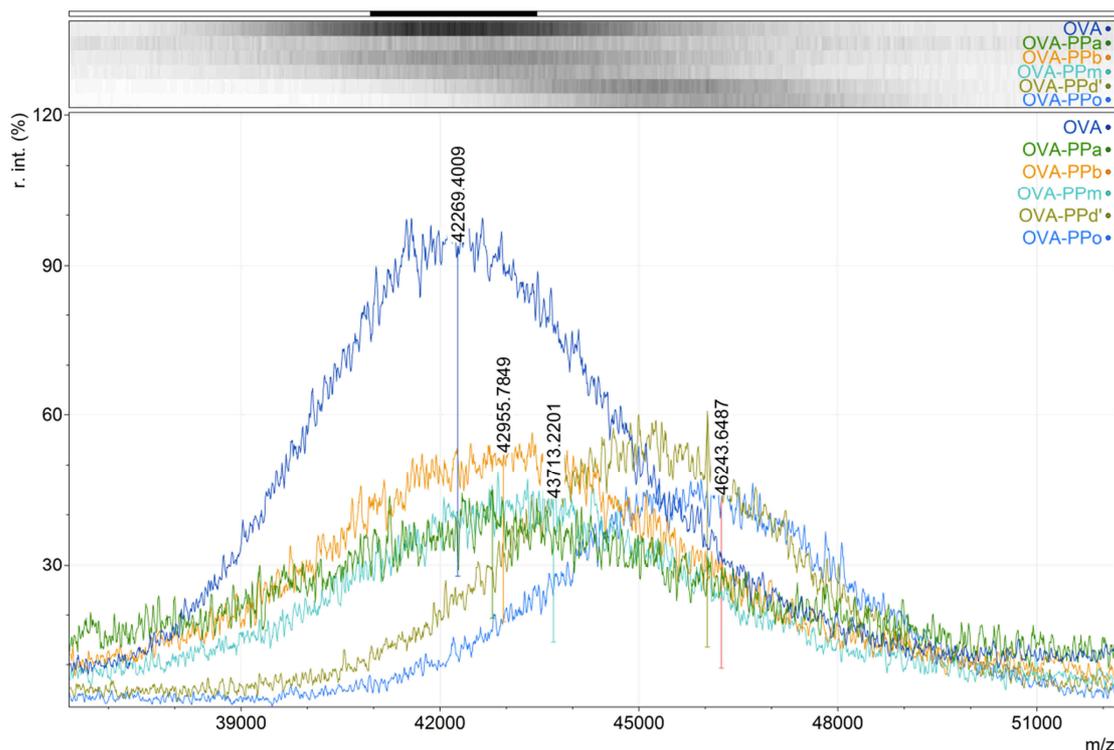
**Conjugados OVA-FP $\alpha$  y OVA-FP $\beta$**



**Conjugados OVA-FP $\alpha'$  y OVA-FP $\beta$**



## Conjugados OVA–hapteno de penthiopyrad



**Tabla AII.2.** Relaciones molares hapteno/proteína (RM) para los conjugados OVA–hapteno obtenidas mediante MALDI–TOF.

Conjugado	RM <sub>0</sub> <sup>a</sup>	<i>m/z</i> <sup>b</sup>	( <i>m/z</i> ) <sub>c</sub> – ( <i>m/z</i> ) <sub>p</sub> <sup>c</sup>	Δ( <i>m/z</i> ) <sup>d</sup>	RM <sup>e</sup>
OVA	-	42269.40	-	-	-
OVA–FPa	8	43849.69	1580.29	460.11	3.5
OVA–FPb	8	42887.40	618.00	492.11	1.5
OVA–PPa	8	42789.99	520.59	427.16	1
OVA–PPb	8	42955.78	686.38	371.10	2
OVA–PPm	8	43713.22	1443.82	385.12	4
OVA–PPd'	8	46031.55	3762.15	385.12	8 <sup>f</sup>
OVA–PPo	8	46243.65	3974.25	385.05	8 <sup>f</sup>
OVA <sup>g</sup>	-	42683.20	-	-	-
OVA–FPba'	8	44586.89	1903.69	424.12	4.5
OVA–FPbb	8	44595.90	1912.70	424.12	4.5

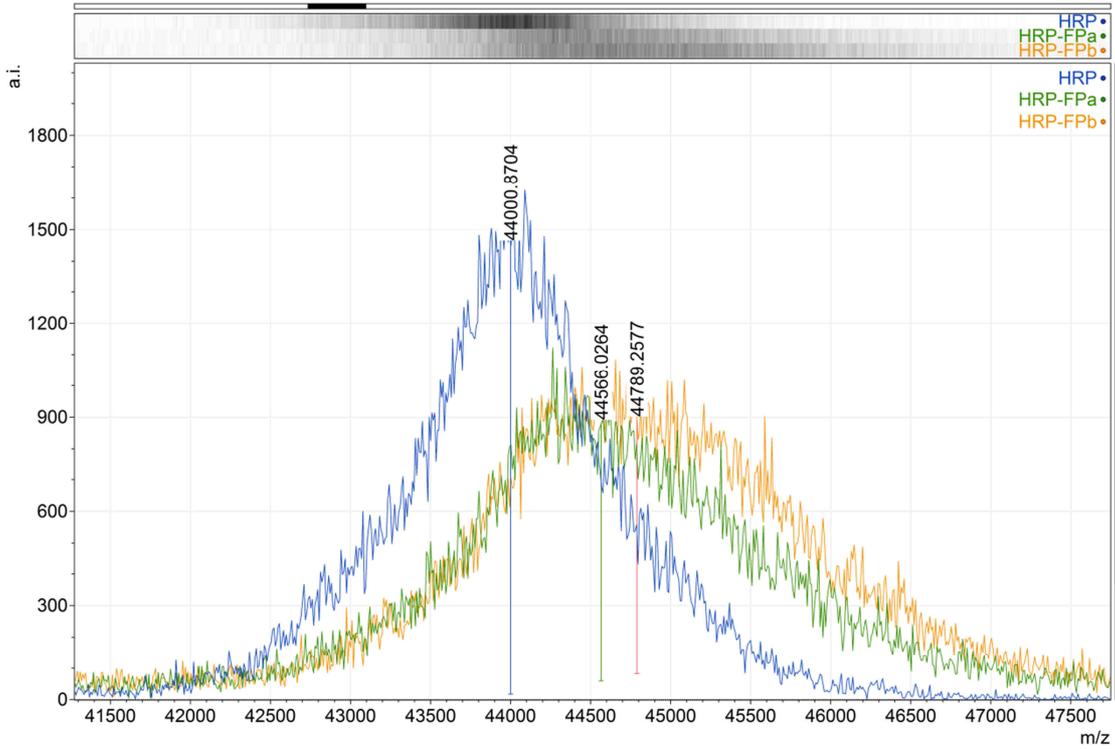
<sup>a</sup> Número de moles de hapteno por mol de proteína mezclados al inicio de la conjugación.

<sup>b</sup> Valor de *m/z* para la proteína o el conjugado tomado del espectro. <sup>c</sup> Diferencia entre el valor de *m/z* del conjugado y el de la proteína. <sup>d</sup> Incremento de *m/z* esperado por molécula de hapteno enlazada. <sup>e</sup> Relación molar calculada según la Ecuación 5.8 (sección 5.5.3).

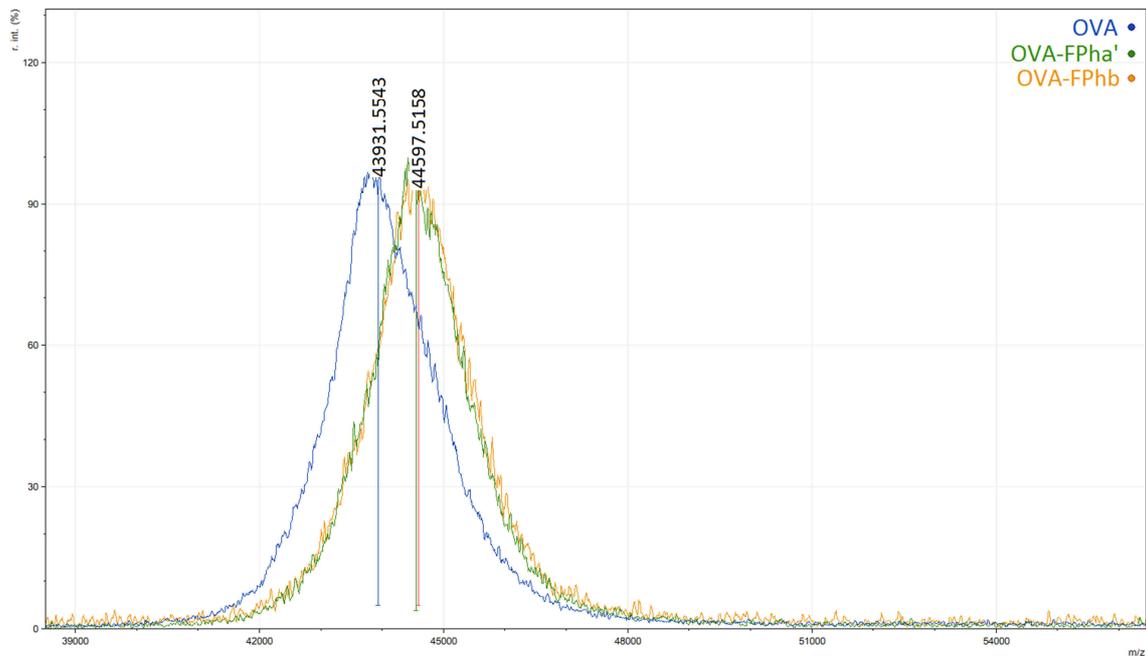
<sup>f</sup> Se tomó el valor de relación molar inicial por proporcionar el cálculo un valor superior a éste. <sup>g</sup> Datos procedentes de un experimento diferente.

Espectros MALDI-TOF de HRP y los conjugados HRP-hapteno preparados

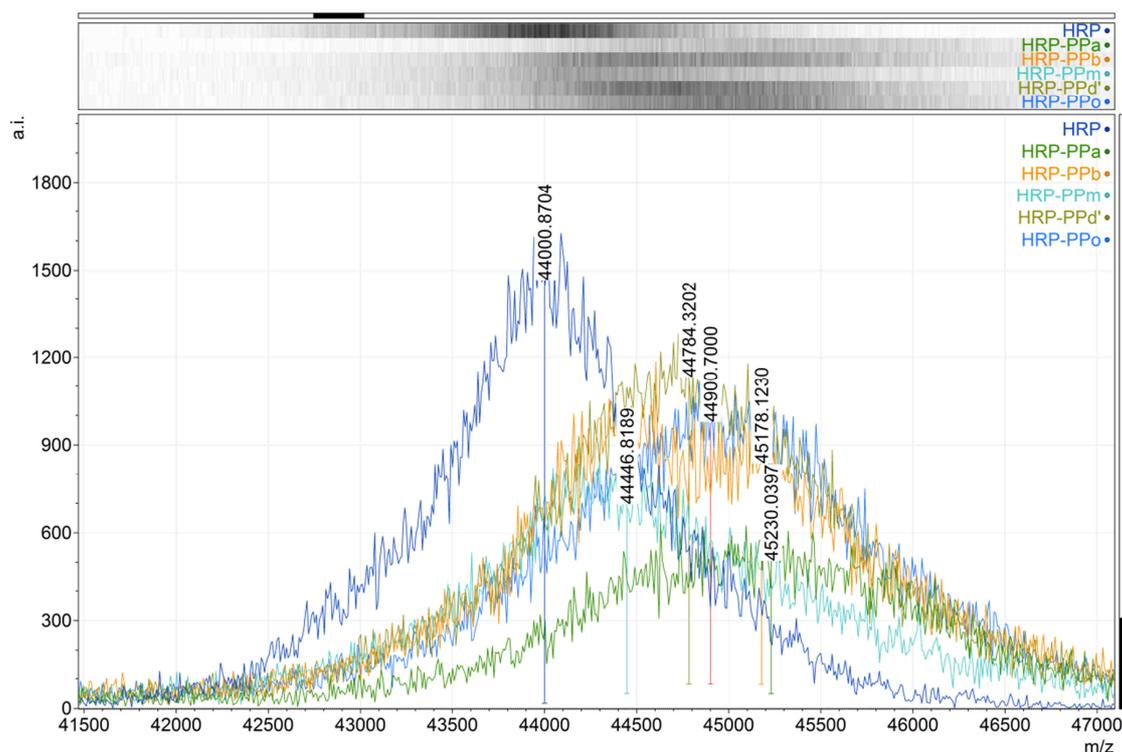
**Conjugados HRP-FPa y HRP-FPb**



**Conjugados HRP-FPha' y HRP-FPhb**



## Conjugados HRP–hapteno de penthiopyrad



**Tabla AII.3.** Relaciones molares hapteno/proteína (RM) para los conjugados HRP–hapteno obtenidas mediante MALDI–TOF.

Conjugado	RM <sub>0</sub> <sup>a</sup>	<i>m/z</i> <sup>b</sup>	( <i>m/z</i> ) <sub>c</sub> – ( <i>m/z</i> ) <sub>p</sub> <sup>c</sup>	Δ( <i>m/z</i> ) <sup>d</sup>	RM <sup>e</sup>
HRP	-	44000.87	-	-	-
HRP–FPa	10	44566.03	565.16	460.11	1
HRP–FPb	10	44789.26	788.39	492.11	1.5
HRP–PPa	10	45230.04	1229.17	427.16	3
HRP–PPb	10	45178.12	1177.25	371.10	3
HRP–PPm	10	44446.82	445.95	385.12	1
HRP–PPd'	10	44784.32	783.45	385.12	2
HRP–PPo	10	44900.70	899.83	385.05	2.5
HRP <sup>f</sup>	-	43931.55	-	-	-
HRP–FPha'	10	44550.40	618.85	424.12	1.5
HRP–FPhb	10	44597.52	665.97	424.12	1.5

<sup>a</sup> Número de moles de hapteno por mol de proteína mezclados al inicio de la conjugación.

<sup>b</sup> Valor de *m/z* para la proteína o el conjugado tomado del espectro. <sup>c</sup> Diferencia entre el valor de *m/z* del conjugado y el de la proteína. <sup>d</sup> Incremento de *m/z* esperado por molécula de hapteno enlazada. <sup>e</sup> Relación molar calculada según la Ecuación 5.8 (sección 5.5.3).

<sup>f</sup> Datos procedentes de un experimento diferente.



## ANEXO III. TABLAS DE DATOS

**Tabla AIII.1.** Resultados obtenidos mediante ELISA competitivo y UPLC–MS/MS para el análisis de extractos de ciruela y de uva procedentes de muestras de campo tratadas con fluopyram.

Matriz	Muestra	Concentración de fluopyram (ng/g) <sup>a</sup>		
		UPLC–MS/MS <sup>b</sup>	FPb#12/HRP–FPb <sup>c</sup>	FPb#12/OVA–FPb <sup>c</sup>
Ciruela	T1D1M1	16.3 ± 0.2	16.7 ± 1.9	16.3 ± 1.6
	T1D1M2	27.6 ± 0.5	26.0 ± 2.5	24.6 ± 1.8
	T1D3M1	n.c. <sup>d</sup>	n.c.	n.c.
	T1D3M2	6.5 ± 0.2	7.7 ± 1.1	6.4 ± 0.4
	T1D5M1	7.4 ± 0.2	7.2 ± 0.9	5.9 ± 0.5
	T1D5M2	24.6 ± 0.2	23.4 ± 2.5	22.3 ± 1.5
	T1D7M1	8.3 ± 0.2	8.8 ± 1.2	10.0 ± 0.5
	T1D7M2	7.5 ± 0.1	6.8 ± 0.5	7.3 ± 0.6
	T2D1M1	116.0 ± 0.2	119.1 ± 12.9	101.3 ± 1.8
	T2D1M2	n.c.	5.1 ± 0.7	n.c.
	T2D3M1	7.0 ± 0.2	7.7 ± 1.0	6.0 ± 0.4
	T2D3M2	31.9 ± 0.8	31.7 ± 3.2	30.4 ± 2.1
	T2D5M1	8.4 ± 0.6	7.9 ± 1.1	6.5 ± 0.5
	T2D5M2	66.5 ± 2.6	53.0 ± 3.6	55.8 ± 1.4
	T2D7M1	135.3 ± 1.0	126.5 ± 10.4	113.4 ± 5.8
	T2D7M2	7.8 ± 0.1	9.6 ± 2.5	6.9 ± 0.7
Uva bobal	T1D1	168.2 ± 3.9	165.1 ± 4.1	153.9 ± 3.6
	T1D3	158.2 ± 3.8	158.5 ± 5.8	159.6 ± 9.1
	T2D1	19.2 ± 0.5	29.3 ± 4.6	23.1 ± 1.4]
	T2D3	187.6 ± 5.3	196.7 ± 32.8	186.1 ± 7.1
Uva garnacha	T1D1	176.5 ± 3.3	171.8 ± 11.6	145.5 ± 5.7
	T1D3	128.6 ± 1.4	136.0 ± 7.4	124.3 ± 6.4
	T2D1	254.8 ± 7.7	299.9 ± 16.9	248.8 ± 13.0
	T2D3	343.3 ± 10.1	371.5 ± 34.1	313.5 ± 16.9
Uva macabeo	T1D1	129.0 ± 1.5	125.3 ± 7.5	119.9 ± 2.7
	T1D3	93.4 ± 3.1	103.9 ± 3.6	81.0 ± 6.7
	T2D1	370.4 ± 21.8	380.4 ± 42.5	350.8 ± 13.6
	T2D3	105.2 ± 5.0	114.4 ± 9.0	96.3 ± 2.2
Uva tempranillo	T1D1	287.1 ± 7.5	296.2 ± 24.1	257.9 ± 20.8
	T1D3	215.8 ± 5.7	213.8 ± 27.0	199.5 ± 6.7
	T2D1	51.4 ± 0.5	56.6 ± 5.0	42.3 ± 2.4
	T2D3	55.4 ± 0.8	58.1 ± 5.5	53.5 ± 3.5

<sup>a</sup> Los valores se expresan como media y desviación estándar de las réplicas indicadas en cada caso. <sup>b</sup> Los resultados son la media de dos réplicas independientes. <sup>c</sup> Los resultados son la media de cinco réplicas independientes. <sup>d</sup> Concentración hallada inferior al límite de cuantificación del método.

**Tabla AIII.2.** Resultados obtenidos por ELISA competitivo y UPLC–MS/MS para el análisis de extractos de ciruela y de uva procedentes de muestras de campo tratadas con penthiopyrad.

Matriz	Muestra	Concentración de penthiopyrad (ng/g) <sup>a</sup>		
		UPLC–MS/MS <sup>b</sup>	PPm#410/HRP–PPm <sup>c</sup>	PPm#410/OVA–PPd <sup>c</sup>
Ciruela	T1D1M1	94.1 ± 0.6	99.6 ± 10.7	77.9 ± 2.3
	T1D1M2	374.1 ± 8.3	364.1 ± 44.5	350.3 ± 11.4
	T1D3M1	10.7 ± 0.1	12.9 ± 1.4	11.2 ± 0.3
	T1D3M2	8.0 ± 0.1	10.2 ± 1.0	n.c. <sup>d</sup>
	T1D5M1	22.5 ± 0.7	26.6 ± 3.4	19.6 ± 1.3
	T1D5M2	17.1 ± 0.5	24.1 ± 1.2	13.0 ± 0.3
	T1D7M1	7.8 ± 0.0	n.c.	n.c.
	T1D7M2	40.9 ± 0.8	42.1 ± 3.8	41.8 ± 3.6
	T2D1M1	27.0 ± 0.0	28.6 ± 3.7	23.6 ± 1.2
	T2D1M2	10.1 ± 0.1	12.5 ± 0.8	n.c.
	T2D3M1	43.1 ± 0.8	51.0 ± 2.2	41.7 ± 3.8
	T2D3M2	32.0 ± 1.0	39.0 ± 6.2	26.5 ± 0.9
	T2D5M1	46.8 ± 0.2	56.5 ± 2.2	46.3 ± 4.1
	T2D5M2	12.3 ± 0.7	15.2 ± 0.5	12.4 ± 1.1
	T2D7M1	104.9 ± 0.9	119.6 ± 13.5	95.2 ± 5.4
	T2D7M2	15.2 ± 0.1	20.7 ± 1.3	13.6 ± 0.3
Uva bobal	T1D1	469.0 ± 13.1	450.4 ± 11.6	486.2 ± 13.0
	T1D3	569.8 ± 1.5	577.1 ± 47.0	602.5 ± 33.0
	T2D1	256.8 ± 2.8	253.7 ± 35.9	214.5 ± 16.8
	T2D3	646.1 ± 16.9	697.4 ± 44.6	536.5 ± 20.1
Uva garnacha	T1D1	293.9 ± 0.3	297.5 ± 39.5	262.3 ± 21.3
	T1D3	419.4 ± 9.1	443.8 ± 55.4	416.6 ± 25.1
	T2D1	555.6 ± 3.2	607.1 ± 49.6	432.2 ± 47.9
	T2D3	204.0 ± 0.6	229.6 ± 21.0	214.6 ± 16.1
Uva macabeo	T1D1	304.6 ± 5.9	300.7 ± 26.1	251.6 ± 7.5
	T1D3	313.0 ± 3.4	312.1 ± 30.6	266.3 ± 15.2
	T2D1	736.9 ± 1.3	893.9 ± 47.1	722.2 ± 56.5
	T2D3	518.5 ± 4.7	618.4 ± 15.8	421.3 ± 38.9
Uva tempranillo	T1D1	666.0 ± 0.9	658.8 ± 46.6	494.2 ± 47.0
	T1D3	437.7 ± 6.2	436.6 ± 34.9	314.1 ± 34.9
	T2D1	597.1 ± 14.6	650.5 ± 16.6	468.9 ± 44.4
	T2D3	734.5 ± 6.3	727.9 ± 44.4	606.4 ± 14.5

<sup>a</sup> Los valores se expresan como media y desviación estándar de las réplicas indicadas en cada caso. <sup>b</sup> Los resultados son la media de dos réplicas independientes. <sup>c</sup> Los resultados son la media de cinco réplicas independientes. <sup>d</sup> Concentración hallada inferior al límite de cuantificación del método.

**Tabla AIII.3.** Concentraciones de fluopyram y penthiopyrad halladas mediante los inmunoensayos desarrollados en vinos procedentes de las muestras de campo de uva tratadas con los fungicidas.<sup>a</sup>

Variedad	Muestra	Concentración de analito (ng/g) <sup>a</sup>			
		Fluopyram		Penthiopyrad	
		Directo	Indirecto	Directo	Indirecto
Bobal	T1D1	170 ± 1	133 ± 5	223 ± 31	220 ± 19
	T1D3	189 ± 6	135 ± 3	334 ± 21	228 ± 15
	T2D1	26 ± 2	24 ± 2	165 ± 17	111 ± 6
	T2D3	198 ± 14	144 ± 11	322 ± 41	241 ± 16
Garnacha	T1D1	184 ± 9	117 ± 3	207 ± 28	124 ± 8
	T1D3	153 ± 9	117 ± 7	238 ± 15	139 ± 9
	T2D1	245 ± 14	167 ± 13	259 ± 50	240 ± 20
	T2D3	431 ± 12	294 ± 17	120 ± 20	73 ± 3
Macabeo	T1D1	122 ± 2	96 ± 5	135 ± 15	90 ± 5
	T1D3	106 ± 9	86 ± 6	235 ± 35	169 ± 13
	T2D1	450 ± 31	373 ± 22	512 ± 26	389 ± 35
	T2D3	144 ± 5	121 ± 2	397 ± 37	273 ± 20
Tempranillo	T1D1	254 ± 12	215 ± 10	376 ± 77	289 ± 13
	T1D3	209 ± 18	171 ± 7	282 ± 35	183 ± 18
	T2D1	71 ± 11	46 ± 5	417 ± 47	224 ± 27
	T2D3	114 ± 11	63 ± 7	648 ± 43	335 ± 21

<sup>a</sup> Los valores están expresados como media y desviación estándar de 5 réplicas independientes.





