



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO

**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS
QUÍMICAS**

“Desarrollo y caracterización de un inmunoabsorbente Sol-Gel dopado con anticuerpos monoclonales anticarbofurano. Aplicación en la determinación del pesticida en aguas superficiales”

TESIS
PARA OPTAR POR EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA

Q.F.B. MARCOS FRANCISCO VILLANUEVA HERNÁNDEZ



TUTOR: Dra. LUZ ELENA VERA ÁVILA

AÑO:2007



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

INTEGRANTES DEL JURADO

<i>Presidente</i>	Dr. Eugenio Octavio Reyes Salas
<i>Vocal</i>	Dr. Miguel Antonio Costas Basín
<i>Secretario</i>	Dra. Araceli Patricia Peña Álvarez
<i>Primer suplente</i>	Dra. Martha Patricia García Camacho
<i>Segundo suplente</i>	Dra. Alma Luisa Revilla Vázquez

El trabajo se realizó en el Laboratorio 115 de Cromatografía de Líquidos, Departamento de Química Analítica. División de Estudios de Posgrado. Facultad de Química. Edificio B. UNAM.

Tutor

Dra. Luz Elena Vera Ávila

Sustentante

Q.F.B. Marcos Francisco Villanueva Hernández.

AGRADECIMIENTOS

Tlazohcamati moyocoyani

Tlazohcamati totolpiotl

A la Universidad Nacional Autónoma de México

A la Dra. Luz Elena Vera Ávila, por su asesoría y dirección durante el desarrollo del presente trabajo, por su enorme apoyo para desarrollarme en la vida profesional.

A la Maestra Rosario Covarrubias, por su invaluable ayuda y sus consejos durante el desarrollo del presente trabajo.

Al Dr. Octavio Reyes Salas, Laboratorio 114. División de Estudios de Posgrado. Facultad de Química. UNAM.

Al H. Jurado, por sus comentarios y consejos hechos respecto al presente trabajo.

A la Dirección de Investigación Científica del CONACYT (Fondo sectorial SEP-CONACYT, Ciencia Básica) por el apoyo financiero otorgado para la realización de este trabajo a través del proyecto 46558: "Desarrollo de nuevos materiales con sitios de reconocimiento específico para la separación de compuestos de interés ambiental o farmacéutico de matrices complejas".

El presente trabajo se desarrolló en el Laboratorio 115 de Cromatografía de Líquidos del Departamento de Química Analítica, División de Estudios de Posgrado, Facultad de Química, UNAM. Bajo la asesoría de la Dra. Luz Elena Vera Ávila y los resultados fueron presentados en los siguientes congresos:

- XI Congreso Latinoamericano de Cromatografía y Ciencias Afines. *“Inmunoadsorbente sol-gel con Anti-carbofurano encapsulado para extracción del pesticida en muestras ambientales”*, del 26 al 30 de Junio de 2006. Mérida, Yucatán.
 - XIX Congreso Nacional de Química Analítica. *“Síntesis y caracterización de un inmunoadsorbente para la extracción selectiva de carbofurano en muestras acuosas”*, del 11 al 13 de Octubre de 2005. Guadalajara, Jalisco.
-

ÍNDICE

RESUMEN	1
I. Introduccción	3
II Objetivos	5
III Antecedentes	6
3.1 Problemática de la contaminación por plaguicidas	6
3.2 Plaguicidas	8
3.3 Carbofurano	10
3.3.1 Destino ambiental	12
3.3.2 Métodos analíticos para la determinación de carbofurano	14
3.4 Cromatografía de Bioafinidad e Inmunoadsorbentes	17
3.5 Inmunoensayos aplicados en pesticidas	20
3.6 Inmunofinidad en extracción en fase sólida	21
3.7 Preparación de inmunoadsorbentes (IAs)	25
3.7.1 Sol-gel	26
3.8 Anticuerpos	31
3.8.1 Reactividad cruzada	36
3.9 Validación	37
IV. Parte experimental	39
4.1 Equipo	39
4.2 Columnas	40
4.3 Materiales, disolventes, reactivos y disoluciones	40
4.4 Muestras	42
4.5 Calibración del rizo inyector	42
4.6 Condiciones cromatográficas	43
4.7 Determinación del volumen de carga en la precolumna de concentración	44
4.8 Anticuerpo anticarbofurano	46
4.9 Preparación del inmunoadsorbente (IA)	46
4.10 Retención no específica	47
4.11 Evaluación del inmunoadsorbente (IA)	49

4.11.1	Concentración de carbofurano	49
4.11.2	Velocidad de flujo	50
4.11.3	Volumen de solución	50
4.11.4	Carga de otros analitos (metabolitos del carbofurano)	50
4.11.5	Estabilidad del inmunoabsorbente (IA)	50
4.12	Metodología Establecida	50
4.13	Aplicación a una muestra real	53
V.	Resultados y discusión	54
5.1	Preparación del inmunoabsorbente (IA) por la técnica sol-gel	54
5.2	Condiciones de análisis	57
5.3	Establecimiento del protocolo de inmunoeextracción	62
5.3.1	Condiciones para minimizar la adsorción no específica	63
5.3.2	Optimización de la elución	64
5.4	Caracterización del comportamiento de retención del inmunoabsorbente	66
5.4.1	Capacidad de enlazamiento	66
5.4.2	Efecto de la velocidad de flujo sobre la retención	67
5.4.3	Volumen de fuga	69
5.4.4	Reactividad cruzada	70
5.4.5	Estabilidad del inmunoabsorbente (IA)	71
5.5	Aplicación del método a una muestra real y evaluación estadística	71
5.5.1	Linealidad del método	73
5.5.2	Precisión y exactitud en condiciones cercanas al límite de detección	75
5.5.3	Límite de detección y límite de cuantificación	77
5.5.4	Selectividad y especificidad del método	79
VI.	Conclusiones	82
VII.	Anexos	84
I.	Fórmulas para la evaluación estadística en el presente trabajo	84
II.	Optimización de la elución en el proceso de inmunoeextracción	88
III.	Parámetros de desempeño en la validación de métodos analíticos y glosario de validación	89
VIII.	Bibliografía	92

ÍNDICE DE TABLAS

3.1	Técnicas de purificación de biomoléculas	17
4.1	Condiciones para la elución en línea de la precolumna y la determinación de carbofurano y sus metabolitos por CLAR-UV.	43
4.2	Variables analizadas en el estudio de retención del carbofurano y sus metabolitos en precolumnas de fase reversa PLRP-S	44
4.3	Variables analizadas en el estudio de retención del carbofurano en precolumna PLRP-S.	45
4.4	Parámetros que se variaron para caracterizar el comportamiento de retención del IS y optimizar el protocolo de inmunoextracción.	51
5.1	Efecto de las condiciones experimentales del proceso sol-gel sobre la actividad del anticuerpo BFNB-67 encapsulado.	57
5.2	Recobro relativo de carbofurano y sus metabolitos en función del volumen de muestra cargado en la precolumna PLRP-S. Muestras: agua con 2% de metanol. Análisis en línea con gradiente de elución acetonitrilo-agua.	58
5.3	Recobro relativo de carbofurano y sus metabolitos para un volumen de muestra de 50 mL con 10% de metanol.	59
5.4	Recobro absoluto de carbofurano en presencia de PBS 0.02 M (pH 7) en la muestra analizada (con 2% de metanol).	61
5.5	Estudio de la reactividad cruzada del anticuerpo anti-carbofurano	70
5.6	Resultados de análisis de 5 muestras fortificadas con diferentes cantidades de carbofurano	74
5.7	Los intervalos de confianza (IC) calculados al umbral de confianza $\alpha=0.05$	74
5.8	Estudio de repetibilidad. Muestras de agua de presa (50 mL) fortificadas a 0.4 ppb de carbofurano.	76
5.9	Parámetros estadísticos y criterios de aceptabilidad para la determinación de carbofurano a niveles de concentración de 0.4 ppb en agua de presa.	77
5.10	Límites de detección (LDM) y de cuantificación (LCM) del método en agua de presa.	78
5.11	Concentraciones de analitos en el agua de presa (50 mL) fortificada para el estudio de selectividad y especificidad del método.	79

ÍNDICE DE FIGURAS

3.1	Carbofurano	11
3.2	Metabolitos del carbofurano	13
3.3	Diagrama que resume la metodología analítica para la preparación de muestra y su posterior análisis por CLAR para determinar N-metilcarbamatos en frutas y vegetales	16
3.4	Principios de separación en purificaciones cromatográficas de biomoléculas	18
3.5	Extracción en Fase Sólida fuera de línea	23
3.6	Precusores de sol-gel: son alcóxidos, formados por un grupo alquilo unido al oxígeno, que a su vez está enlazado con un elemento metálico (Si, Al, Ti, Zr, V, Ta, etc.).	27
3.7	Reacciones clave que involucra el proceso sol-gel	27
3.8	Esquema general para el encapsulamiento de biomoléculas por el método sol-gel	30
3.9	Estructura de una IgG	32
3.10	Representaciones esquemáticas de inmunoglobulinas	33
3.11	Producción de anticuerpos monoclonales	35
3.12	Reactividad cruzada	37
4.1	Dirección de los flujos en la válvula de conmutación del sistema de preconcentración en línea	40
4.2	Procedimiento para la preparación del inmunoadsorbente (IA)	48
5.1	Cromatograma obtenido en el análisis de una muestra sintética con carbofurano y sus metabolitos.	60
5.2	Efecto de la velocidad de flujo sobre la retención de carbofurano en el inmunoadsorbente	68
5.3	Efecto del volumen de muestra cargado en el inmunoadsorbente sobre la retención del carbofurano.	69
5.4	Cromatograma obtenido del análisis de 50 mL de agua de la presa Tenango fortificada con carbofurano	72
5.5	Recuperación de carbofurano en muestras de agua de presa (50 mL) fortificadas a concentraciones de 0.2-4 ppb.	73
5.6	Análisis de efluentes (a) y eluato (b) del cartucho de inmunoextracción. Muestra, agua de presa fortificada con 4 compuestos a la concentración marcada	80

RESUMEN

En el presente trabajo se desarrolló un inmunoadsorbente (IA) para carbofurano por inmovilización de anticuerpos monoclonales anticarbofurano en un soporte de sílice mediante el método sol-gel. Así mismo, se implementó un método analítico para la determinación sensible y selectiva del pesticida en aguas ambientales, utilizando el inmunoadsorbente sintetizado empacado en cartuchos, para la preparación de muestras y un sistema de preconcentración en precolumna de fase reversa y análisis cromatográfico en línea para la separación y cuantificación del analito.

La preparación del biogel se llevó a cabo empleando como precursor el tetraetoxisilano (TEOS) y catálisis ácida. La mezcla de reacción se sonicó en baño de hielo por 30 min y luego se mantuvo bajo agitación suave hasta obtener una fase homogénea, transparente y viscosa. En este punto, el sol se neutralizó con buffer salino de fosfatos (PBS) 0.2 M a pH 7 y en seguida se añadió la solución de anticuerpo (500 µg) en PBS. La gelificación se produjo en menos de 5 min. El gel se fragmentó y lavó exhaustivamente con diferentes solventes. Finalmente se sometió a un secado lento a 4°C hasta pérdida del 50% de su peso inicial. El xerogel resultante se molió y empacó en un cartucho de plástico y este último se almacenó en refrigeración, con el empaque sumergido en PBS, hasta su uso.

Para evaluar el comportamiento del IA fue necesario establecer previamente el método de análisis de los efluentes y eluatos del cartucho. Se optó por desarrollar un método en línea con el fin de alcanzar una alta sensibilidad. Los experimentos realizados mostraron que el volumen de fuga del carbofurano y sus metabolitos en una precolumna (20 x 2 mm, i.d.) de fase reversa polimérica (PLRP-S) era superior a los 100 mL, para soluciones de carga con un contenido de hasta 10% de metanol. La única excepción fue el 3-hidroxicarbofurano que alcanzó a fugarse marginalmente con 100 mL de solución al 10% de metanol. La precolumna cargada se conectó en línea con una columna analítica C-18 (150 x 4.6 mm, i.d.) para la elución y separación de los compuestos de interés por cromatografía de líquidos con detección UV a 280 nm. Se utilizaron fases móviles isocráticas acetonitrilo-agua para el estudio de los compuestos individuales y un gradiente con los mismos solventes para la separación de la mezcla de analitos.

La caracterización del IA se realizó con muestras sintéticas fortificadas con los compuestos de prueba. La composición de las soluciones de carga y lavado del cartucho de inmunoextracción (IE) se determinó con base en el estudio de retención no específica del carbofurano, realizado en un cartucho empacado con gel blanco (no dopado con anticuerpo). Las condiciones finalmente adoptadas para trabajar en el cartucho de IE fueron: (1) Carga con soluciones de analito en metanol-PBS (0.02 M, pH 7) 2:98 (v/v), (2) Lavado con 5 mL de mezcla metanol-PBS (0.02 M, pH 7) 4:96

(v/v), (3) Elución con 8 mL de mezcla metanol-agua 64:36 (v/v). Los estudios realizados variando algunos parámetros experimentales permitieron determinar las principales características del inmunoabsorbente (IA):

- Capacidad inicial (normalizada): 566 ng de carbofurano por mg de anticuerpo encapsulado.
- Volumen de fuga: mayor a 200 mL.
- Efecto de la velocidad de flujo en la carga: la retención del carbofurano disminuye significativamente para flujos superiores a 1 mL/min.
- Reactividad cruzada: El anticuerpo sólo reconoció parcialmente al metabolito 3-hidroxicarbofurano (30% de reactividad cruzada), los demás compuestos ensayados no fueron retenidos.

El protocolo de inmunoextracción derivado de los experimentos anteriores, junto con el método de preconcentración y análisis en línea del eluato del cartucho, constituyen el método analítico que se propone en este trabajo para la determinación de carbofurano, a niveles traza, en muestras de agua. Este método se aplicó a una muestra real, agua de la presa Tenango en el estado de Puebla. La certificación del método con muestras de 50 mL del agua de presa fortificada con el o los analitos condujo a los siguientes resultados:

- Intervalo de linealidad: 10–200 ng de carbofurano equivalente a un intervalo de concentraciones de 0.2-4 ng/mL.
- Precisión y exactitud (determinadas a concentración de 0.4 ng/mL de carbofurano): recobro promedio 104%, coeficiente de variación 10%.
- Límites de detección (LDM) y cuantificación (LCM) del método: LDM = 6.5 ng ó 0.13 ng/mL, LCM = 10.4 ng ó 0.21 ng/mL.
- Selectividad y especificidad: el cromatograma obtenido del análisis de agua de presa fortificada con carbofurano y otros compuestos mostró que estos últimos no están presentes en el eluato del cartucho y que las señales residuales (muy reducidas) de la matriz de la muestra no interfieren en la determinación del pesticida.

En conclusión, los resultados obtenidos confirman que el encapsulamiento sol-gel es actualmente la vía más prometedora para la inmovilización de biomoléculas en soportes sólidos. También se confirman las grandes ventajas que aporta la inmunoextracción en análisis ambientales. Esta técnica de preparación de muestra permite desarrollar métodos analíticos confiables, robustos y altamente sensibles y selectivos.

I. INTRODUCCIÓN

Los carbamatos son una familia de plaguicidas con un amplio espectro de actividad biológica por lo que se utilizan como insecticidas, nematocidas, aracnidas y moluscocidas en muy diversos cultivos. Estos compuestos actúan principalmente como inhibidores de la enzima acetilcolinesterasa, provocando una acumulación de acetilcolina en las uniones nerviosas colinérgicas. Sin embargo, dada su forma de acción, estos pesticidas son sumamente tóxicos, no sólo para las plagas a las que se pretende controlar, sino también para especies no blanco como otras especies de insectos, aves y mamíferos, incluyendo al propio hombre. En efecto, la acumulación de acetilcolina produce fuertes alteraciones en el organismo, las cuales pueden llevar hasta la muerte en casos de exposición prolongada a estos agentes o envenenamiento accidental. No obstante, los carbamatos en general tienen una baja persistencia en el ambiente, son relativamente solubles en agua y no presentan bioacumulación, por ello han sustituido progresivamente a otros pesticidas de mayor impacto ambiental como los organoclorados.

El carbofurano (2,3-dihidro-2,2-dimetil-7-benzofuranil N-metilcarbamato) es probablemente el carbamato más utilizado en México. Sus formulaciones se expenden bajo los nombres comerciales de Brifur, Furadán, Crisfuran, Curaterr, Cristofuran, Pillarfuran y Yaltox. Dentro del grupo de los N-metilcarbamatos, el carbofurano es uno de los más tóxicos para los mamíferos (LD_{50} oral en ratas = 8 mg/Kg), incluyendo al hombre. Considerando que nuestro país tiene una gran extensión de tierras dedicadas a la agricultura y que las condiciones de trabajo en el control de plagas perjudiciales a los cultivos aun no son del todo seguras para los campesinos y sus familias, ni cuidadosas con el ambiente, es imperativo que se establezcan programas serios de monitoreo del pesticida, particularmente en las zonas de alto riesgo.

El método más aceptado para la determinación de trazas de N-metilcarbamatos en agua es el Método EPA 531.1 que está basado en una separación por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (CLAR) seguida por una derivación post-columna en dos etapas, consistente en la hidrólisis del grupo carbamato y la formación de un derivado fluorescente con la metilamina resultante mediante o-ftaldialdehído y mercaptoetanol. La detección posterior del derivado por fluorescencia es muy sensible y bastante selectiva pero, aún así, cuando las muestras son muy complejas se requieren pasos previos de limpieza para evitar interferencias en el análisis. El principal problema de este método es que se requiere de un aditamento (el reactor postcolumna) relativamente sofisticado y costoso, cuyo correcto manejo y operación impone la necesidad de contar con personal altamente especializado. En México, son contados los laboratorios analíticos que tienen el equipo y personal adecuados para aplicar el Método EPA 531.1

En este trabajo se presenta una alternativa interesante para la determinación de compuestos traza en matrices acuosas complejas, que se basa en una preparación de muestra muy selectiva y un análisis cromatográfico con equipo convencional como CLAR-UV. La muestra se procesa por Extracción en Fase Sólida (EFS) empleando un cartucho de inmunoeextracción, el cual aprovecha la alta especificidad de las interacciones biológicas para extraer selectivamente un compuesto particular (o una familia de compuestos). Así, un inmunoabsorbente (IA) está constituido por un soporte sólido en el que se encuentran inmovilizados, física o químicamente, anticuerpos generados contra el compuesto de interés.

El bioencapsulamiento es una técnica basada en el método sol-gel que permite la incorporación de moléculas biológicas en un soporte, como un componente integral de la estructura polimérica que se forma en dicho proceso. Numerosos reportes en la literatura indican que esta técnica permite preservar la actividad biológica de las moléculas en mayor medida que otros métodos de inmovilización, como el anclaje covalente. Los biomateriales sol-gel han encontrado aplicación en muy diversas áreas, entre ellas, medicina, farmacia, alimentos y ambiental.

Aunque los primeros inmunoabsorbentes para contaminantes orgánicos fueron desarrollados desde principios de la década de los 1990's, todavía son muy pocos los anticuerpos que se han generado contra plaguicidas u otros contaminantes. Sin embargo, el alto potencial que presentan los IAs para simplificar enormemente los análisis ambientales, permite preveer un gran desarrollo en el futuro próximo. Por el momento, las investigaciones en este campo a nivel mundial se centran no sólo en la obtención de nuevos anticuerpos, ya sea policlonales o monoclonales, sino también en la puesta a punto de técnicas y procedimientos más eficientes para la inmovilización de estas biomoléculas.

La optimización del proceso de encapsulamiento del anticuerpo, así como del protocolo de inmunoeextracción para el carbofurano, forman parte de la investigación realizada y se describen y discuten a lo largo del trabajo. Los inmunoabsorbentes se prepararon con el anticuerpo monoclonal anticarbofurano, codificado como LIB-BFNB-67, que fue generado por el grupo de Investigación en inmunotecnología de la Universidad Politécnica de Valencia, España, dirigido por el Dr. Angel Montoya Biades.

El inmunoabsorbente fue utilizado para la determinación de trazas de carbofurano en muestras de agua. El método analítico desarrollado para este fin, fue probado en muestras de agua de presa y con estas mismas, fortificadas con carbofurano, se determinaron sus principales parámetros de desempeño. Los excelentes resultados obtenidos con esta compleja matriz, confirman las enormes ventajas que ofrece la inmunoeextracción como método de preparación de muestra y avalan el interés del trabajo desarrollado en este proyecto de investigación.

II. OBJETIVOS

2.1 *Objetivo general*

- Desarrollar un nuevo inmunoabsorbente para carbofurano y caracterizar su comportamiento y efectividad en la extracción en fase sólida del pesticida a partir de muestras acuosas. Aplicar el inmunoabsorbente en el desarrollo de un método analítico para la determinación de trazas de carbofurano en aguas ambientales.

2.2 *Objetivos particulares*

- Adaptar y optimizar el procedimiento de bioencapsulamiento sol-gel para la inmovilización del anticuerpo monoclonal anticarbofurano LIB BFNB-67 en un soporte de sílice, buscando preservar al máximo la actividad del anticuerpo.
- Estudiar el comportamiento de retención del carbofurano y algunos de sus metabolitos en cartuchos empacados con el inmunoabsorbente sintetizado. Optimizar el protocolo de inmunoextracción (fuera de línea) y evaluar la efectividad de este sistema para la recuperación y concentración selectiva del pesticida a partir de muestras acuosas.
- Establecer las condiciones para la carga de los extractos en una precolumna y su análisis en línea por cromatografía de líquidos con detección UV.
- Con los resultados del trabajo anterior, establecer un método analítico basado en la inmunoextracción para la determinación de carbofurano, a muy bajos niveles de concentración, en aguas ambientales.
- Evaluar los principales parámetros de desempeño para la validación del método desarrollado con una matriz acuosa compleja (muestras de agua superficial).

III. ANTECEDENTES

3.1 Problemática de la contaminación por plaguicidas

Los plaguicidas sintéticos han contribuido sustancialmente al mejoramiento de la productividad agrícola en el mundo. Paralelamente, su uso ha tenido efectos adversos que incluyen el deterioro ecológico y el daño a la salud humana. El potencial tóxico de los plaguicidas es su capacidad para destruir plagas, una propiedad deseable para el efectivo control de las mismas pero, a la vez, esta característica los hace potencialmente dañinos para la salud y el medio ambiente¹.

La producción de los cultivos se puede ver muy afectada tras el ataque de parásitos, microorganismos que les producen enfermedades o por la vegetación adventicia que compite por el agua y los nutrientes. La aplicación masiva de abonos y la selección de especies de rápido crecimiento ha contribuido a disminuir las defensas físicas de las plantas ante el ataque de parásitos y enfermedades, conduciendo a la necesidad de incrementar el uso de plaguicidas.

Plaguicida es cualquier sustancia o mezcla de sustancias que se destina a controlar cualquier plaga, incluidos los vectores de enfermedades humanas y de animales, así como las especies no deseadas que causen perjuicio o que interfieran con la producción agropecuaria y forestal².

Los plaguicidas empleados en México son muy variados debido al gran número de plagas y enfermedades propias de los climas tropicales que atacan a los cultivos. Sobresalen los organofosforados, los carbamatos y los derivados del bipiridilo, como el paraquat. Entre los primeros se encuentran los insecticidas diazinon, malatión, metamidofós y metiparatió, así como el fungicida metomilo. Entre los carbamatos destaca el carbofurano^{3,4}.

Algunos de ellos están prohibidos o restringidos en otros países. Es el caso del paraquat y el metilparatió que, sin embargo, en México forman parte de los paquetes tecnológicos recomendados por la Secretaría de Agricultura. De hecho, en algunas regiones donde se cultivan hortalizas y frutales se fumiga hasta tres veces por semana.

Tanto en México como en el resto del mundo, los plaguicidas organoclorados han sido desplazados de manera creciente por compuestos menos persistentes pero de mayor toxicidad aguda, como los carbamatos, los piretroides y los organofosforados⁵.

Los horticultores recurren a plaguicidas de peligrosidad alta en el 96 por ciento de los casos y de peligrosidad extrema en el 25 por ciento de las veces. Para la aplicación de estos productos, se

recurre predominantemente a la bomba manual tipo «mochila» y en menor grado a bombas motorizadas.

Se ha detectado que en el sureste de México existe una marcada falta de lectura de las instrucciones o advertencias en las etiquetas de los tambos y demás empaques donde se expenden los agroquímicos. En consecuencia, el conocimiento sobre los peligros, precauciones y controles preventivos que deben tenerse en torno a los plaguicidas es, en general, insuficiente. Agréguese el escaso empleo de equipo de protección, que va del ocho por ciento en Yucatán al cinco por ciento en Chiapas, porque se considera un gasto innecesario o muy costoso; además, el clima caluroso dominante todo el año no favorece la utilización de dicho equipo. Este conjunto de circunstancias lleva a un alto riesgo de intoxicación.

Así, es común encontrar casos de intoxicación aguda entre los agricultores de la región debido a los accidentes por derrames de la bomba o a la contaminación de los alimentos por falta de higiene o descuidos al fumigar. Se estima que, entre los casos reportados, el 57 por ciento corresponde a Chiapas y el 34 por ciento a Yucatán. Sin embargo, hay muchos otros casos en los que los afectados sólo presentan síntomas de intoxicación de moderados a leves y se tratan con remedios caseros o se automedican, por lo que estos incidentes no constan en los reportes médicos. Sólo los casos graves son registrados oficialmente, con lo cual se favorece el sesgo estadístico de este problema de salud pública.

Las comunidades fronterizas rurales en el norte de México enfrentan también un sinnúmero de problemas ambientales, destacando la contaminación debida a actividades agrícolas de los preciados recursos hídricos superficiales y subterráneos. Algunos habitantes de la región fronteriza padecen problemas crónicos de salud, incluyendo enfermedades de transmisión acuática y enfermedades respiratorias. Dichos problemas pueden estar relacionados con la contaminación del aire, el tratamiento inadecuado de las aguas de consumo y aguas residuales y el manejo deficiente de plaguicidas y sus desechos tóxicos⁶.

Considerando que nuestro país tiene una gran extensión de tierras dedicadas a la agricultura, y por lo tanto los problemas de contaminación ambiental asociados a esta actividad, es imperativo que se establezcan programas serios de monitoreo de los pesticidas, particularmente en las zonas de alto riesgo. Esto conlleva a la necesidad de contar con los suficientes laboratorios, instrumentación y personal capacitado para realizar los numerosos análisis que esta tarea implica. Es de notar que, en general, los métodos establecidos u "oficiales" para la determinación de microcontaminantes orgánicos (como los plaguicidas) son sumamente largos y complicados (p.ej. los métodos de la Agencia Ambiental de E.U., EPA). Para su implementación y aplicación se requiere de personal altamente especializado y, en ocasiones, de instrumentación muy costosa y/o sofisticada.

El desarrollo de métodos más simples y robustos, que puedan ser aplicados por cualquier analista en laboratorios equipados con instrumentación convencional, sería una adecuada respuesta para comenzar a enfrentar la problemática causada por la contaminación por plaguicidas, al menos en lo que se refiere a su componente analítica.

3.2 Plaguicidas

Un plaguicida es una sustancia o mezcla de sustancias que se destina a controlar cualquier plaga, incluidos los vectores que transmiten enfermedades humanas y de animales, las especies no deseadas que causen perjuicio o que interfieran con la producción agropecuaria y forestal, por ejemplo, las que causan daño durante el almacenamiento o transporte de los alimentos u otros bienes materiales, así como las que interfieran con el bienestar del hombre y de los animales. Se incluyen en esta definición las sustancias defoliantes y las desecantes.

Los plaguicidas pueden clasificarse de acuerdo con los siguientes criterios: ^{2,7,8}

- Concentración: Ingrediente activo, Plaguicida técnico, Plaguicida formulado.
- Organismos que controlan: Insecticidas, Acaricidas, Bactericidas, Rodenticidas o Roedoricidas, Nematicidas, Avicidas, Herbicidas, Fungicidas, Molusquicidas, etc.
- Modos de acción: De contacto, Repelentes, De ingestión, Defoliantes, Fumigantes.
- Composición química: Organoclorados, Organofosforados, Carbamatos, Tiocarbamatos, Triazinas, Compuestos de cobre, Piretroides, Organoazufrados, Arsenicales, Derivados de cumarina, Derivados de urea, Dinitrocompuestos, Organometálicos, etc.
- Presentación de formulaciones: Sólidos, Líquidos y Gases.
- Uso al que se destinan: Agrícola, Urbano, Pecuario, Industrial, Forestal, Doméstico.

La clasificación de los plaguicidas atiende a diversos aspectos dependiendo del criterio tomado en cuenta. Por ejemplo, según el destino de su aplicación pueden considerarse:

- a. Pesticidas de uso fitosanitario o productos fitosanitarios: los destinados a su utilización en el ámbito de la sanidad vegetal o el control de vegetales, específicos post-cosecha y simientes
- b. Pesticidas de uso ganadero: los destinados a su utilización en el entorno de los animales o en actividades relacionadas con su explotación.
- c. Pesticidas de uso en la industria alimentaria: los destinados a tratamientos de productos o dispositivos relacionados con la industria alimentaria.

- d. Pesticidas de uso ambiental: los destinados al saneamiento de locales u otros establecimientos públicos o privados.
- e. Pesticidas de uso en higiene personal: aquellos preparados útiles para la aplicación directa sobre el hombre.
- f. Pesticidas de uso doméstico: cualquier preparado destinado para aplicación por personas no especialmente calificadas en viviendas o locales habitados.
- g. Protectores de maderas, fibras y derivados

Las formulaciones o preparados pueden clasificarse según el estado de presentación o sistema utilizado en su aplicación, características que determinan en buena medida la facilidad de penetración en el organismo del individuo expuesto. Según este criterio se pueden considerar los grupos:

- a. Gases o gases licuados.
- b. Fumigantes y aerosoles.
- c. Polvos con diámetro de partícula inferior a 50 μ .
- d. Sólidos, excepto los cebos y los preparados en forma de tabletas.
- e. Líquidos.
- f. Cebos y tabletas.

Atendiendo a su grado de peligrosidad para las personas, los pesticidas se clasifican según se cita en el Real Decreto 3349/83 de España de la siguiente forma⁹:

1. En cuanto a su grado de toxicidad, en las siguientes categorías:

- a. De baja peligrosidad, los que por inhalación, ingestión y/o penetración cutánea no entrañan riesgos apreciables.
- b. Nocivos, los que por inhalación, ingestión y/o penetración cutánea puedan entrañar riesgos de gravedad limitada.
- c. Tóxicos, los que por inhalación, ingestión y/o penetración cutánea puedan entrañar riesgos graves, agudos o crónicos, e incluso la muerte.
- d. Muy tóxicos, los que por inhalación, ingestión y/o penetración cutánea puedan entrañar riesgos extremadamente graves, agudos o crónicos, e incluso la muerte.

2. En cuanto a otros efectos:

- a. Corrosivos, los que en contacto con tejidos vivos pueden ejercer sobre ellos una acción destructiva.

- b. Irritantes, los no corrosivos que, por contacto directo, prolongado o repetido con la piel o las mucosas, pueden provocar una reacción inflamatoria.
- c. Fácilmente inflamables, aquellos plaguicidas:
 - Que a la temperatura normal al aire libre y sin aporte de energía pueden calentarse e incluso inflamarse.
 - En estado sólido, que pueden inflamarse fácilmente por la breve acción de una fuente inflamable y que continúan quemándose o consumiéndose después de retirar la fuente inflamable.
 - En estado líquido, que tengan un punto de inflamación inferior a 21°C.
 - Gaseosos, que son inflamables al aire libre a la presión normal.
 - Que en contacto con el agua o el aire húmedo desprenden gases fácilmente inflamables en cantidades peligrosas.
- d. Explosivos, los que pueden explosionar bajo efecto de una llama o que son más sensibles a los choques o a la fricción que el dinitrobenceno.

La clasificación toxicológica de los plaguicidas en las categorías de baja peligrosidad, nocivos, tóxicos o muy tóxicos se realiza dependiendo básicamente de su toxicidad aguda, expresada en DL₅₀ (dosis letal para el 50% de los individuos de prueba) por vía oral o dérmica para la rata, o en CL₅₀ (concentración letal para el 50% de los individuos de prueba) por vía respiratoria para la rata, de acuerdo con una serie de criterios que se especifican en el indicado Decreto, atendiendo principalmente a las vías de acción más importantes de cada compuesto⁹.

3.3 Carbofurano

El carbofurano (2,3-dihidro-2,2-dimetil-7-benzofuranil N-metilcarbamato) es probablemente el carbamato más utilizado en México. Dentro del grupo de los N-metilcarbamatos, el carbofurano es uno de los más tóxicos para los mamíferos (DL₅₀ oral en ratas = 8 mg/Kg), incluyendo al hombre. La Fig. 3.1 muestra la estructura de este pesticida.

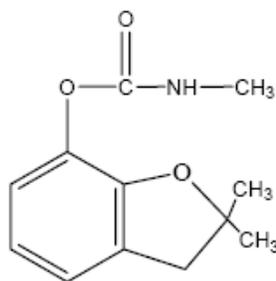


Fig. 3.1 Carbofurano

El carbofurano es un carbamato de amplio espectro que actúa como insecticida, acaricida y nematicida. Es aplicado en forma granular o en forma aérea como solución concentrada acuosa.

Tiene una densidad relativa igual a 1.180 a 20 °C. Es soluble en agua, acetona, acetonitrilo, benceno, ciclohexanona, dimetilformamida, dimetilsulfóxido y 1-metil-2-pirrolidona, pero poco soluble en xileno y éter de petróleo. No es corrosivo. Se descompone al calentarse produciendo gases tóxicos incluyendo a los óxidos de nitrógeno.

El carbofurano tiene la fórmula empírica $C_{12}H_{15}NO_3$ y su peso molecular es de 221.26 g/mol. Es un sólido blanco sin olor, con un punto de fusión de 153 –154 °C, su presión de vapor es 8.3×10^{-6} mm Hg (25°C). Es menos estable en medio alcalino que en medio ácido y se degrada a temperaturas superiores a 130 °C.

Las formulaciones que contienen carbofurano, sólo o en mezcla con otros pesticidas, se venden en México bajo los siguientes nombres comerciales: ANAFUR 350, ANAFUR 5G, ARBODAN TÉCNICO, CARABINA 350/FURAN 350, CARBOFURAN TÉCNICO, CONVOY 350 L, CONVOY 3G, CONVOY 5% G, CONVOY TECNICO 75%, CUFURAN 5%, CUFURAN L 350, CUFURAN TÉCNICO, CURATER 5GR, CURATER 3 GR, CURATER 4F, CURATER 75, FURADAN 75% CONCENTRADO, FURADAN 10 G, FURADAN 300 TS, FURADAN 350 L / FUGAZ 350 L, FURADAN 3G, FURADAN 5G Y/O VEX Y/O FUGAZ, FURADAN CONCENTRADO 80%, INTERFURAN 3-G, INTERFURAN 300 TS, INTERFURAN 350, INTERFURAN 5G, INTERFURAN TECNICO 98%, MASTIN 350 SC, MASTIN 5G, VELFURAN 350-L, VELFURAN 3G, VELFURAN 5G/ CARBINA 5G/ FUTURAN 5G y VELFURAN.

En México el carbofurano se clasifica como de tipo toxicológico II (moderadamente tóxico), tal vez por que no se ha demostrado la existencia de bioacumulación o efecto mutagénico, y con una persistencia de nivel 2 (4 a 8 semanas). Se usa principalmente como insecticida y como acaricida y tiene un No. de CAS 1563-66-2¹⁰.

Se puede adquirir en varias presentaciones comerciales dependiendo de su uso:

Agrícola.- Para aplicación al suelo, como granulado en equivalentes en gramos de ingrediente activo (I.A./kg o L) de 30, 50 y 100; como solución concentrada acuosa en equivalentes en gramos de ingrediente activo de: 350 y como suspensión acuosa en equivalentes en gramos de ingrediente activo de 350, 360, 399 y 500. Para tratamiento de semilla para siembra, como suspensión acuosa en equivalentes en gramos de ingrediente activo de 300 y 315.

Industrial.- Para uso exclusivo en plantas formuladoras de plaguicidas agrícolas, como polvo técnico en equivalentes en gramos de ingrediente activo de 750, 850, 950 y 980 y como sólido técnico en equivalentes en gramos de ingrediente activo de 950, 970 y 980. Para uso exclusivo en plantas formuladoras de plaguicidas, como sólido técnico en equivalentes en gramos de ingrediente activo de 980.

3.3.1 Destino ambiental

El carbofurano sufre una hidrólisis a 7-fenolcarbofurano como uno de los principales productos de degradación en agua y sedimentos; otros productos de degradación hidrolítica incluyen el 3-hidroxi-7-fenolcarbofurano y el 3-ceto-7-fenolcarbofurano. La ruptura hidrolítica en agua incrementa con un aumento del pH. La fotólisis directa y la fotooxidación (vía radicales hidroxilo) contribuyen a su remoción en los cuerpos de agua (ríos, lagos y el mar). La volatilización, adsorción a sólidos suspendidos o sedimentos y la bioconcentración en organismos acuáticos (moluscos y peces) son destinos ambientales menores para este plaguicida.

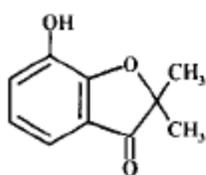
En el suelo el carbofurano es moderadamente persistente (vida media de 30 a 120 días) y tiene una movilidad variable dependiendo de la textura. En suelos franco arenosos, franco limosos y limo arcillosos es muy móvil; en suelos franco arcillo-limosos es moderadamente móvil y en suelos orgánicos ligeramente móvil. Por lo anterior, se considera un peligro significativo de contaminación para las aguas subterráneas. En suelos, el carbofurano sufre una degradación química (hidroxilación y oxidación) dando como metabolitos el 3-hidroxicarbofurano, el 3-cetocarbofurano y el 7-fenolcarbofurano; otros estudios indican una degradación microbiana como una importante ruta de degradación del carbofurano en suelos neutros. La hidrólisis y la biodegradación son mecanismos relevantes de remoción de este compuesto, siendo la primera más rápida en ambientes alcalinos, mientras que la segunda se acelera en suelos previamente tratados con plaguicidas.

En el aire o en la atmósfera, el carbofurano se presenta como partículas, es sujeto a una fotooxidación en fase vapor debido a una presión de vapor baja reaccionando con radicales hidroxilo, con una vida media de 13 horas. Las partículas son físicamente removidas por precipitación húmeda y seca. En el aire la fotólisis directa es también un proceso importante de remoción de este compuesto¹¹.

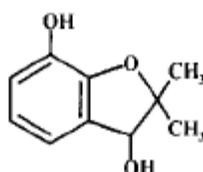
El carbofurano puede ingresar al organismo de los mamíferos por vía oral, cutánea o por inhalación. Es un irritante cutáneo y ocular, causando lacrimosis, miosis, visión borrosa, espasmos del músculo ciliar, disnea, mareos, náuseas, vómito, diarrea y cefalea.

El estudio del metabolismo del carbofurano indica que puede degradarse formando diversos compuestos (Fig. 3.2).

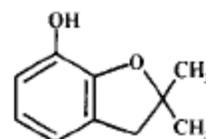
Mediante la hidrólisis del éster carbamato genera los metabolitos:



3-ceto-7-fenolcarbofurano

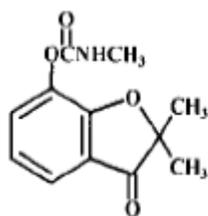


3-hidroxi-7-fenolcarbofurano

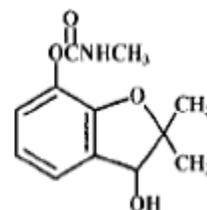


7-fenolcarbofurano

Mediante la oxidación del carbono 3 produce los siguientes metabolitos:



3-cetocarbofurano



3-hidroxicarbofurano

Fig. 3.2 Metabolitos del carbofurano

3.3.2 Métodos analíticos para la determinación de carbofurano

El método más aceptado para la determinación de trazas de N-metilcarbamatos en agua es el Método EPA 531.1 basado en el método de Krause, en el que se desarrolla una separación por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (CLAR) seguida por una derivación post-columna en dos etapas, consistente en la hidrólisis del grupo carbamato con una solución alcalina (NaOH) y la formación de un derivado fluorescente con la metilamina resultante mediante o-ftaldialdehído y mercaptoetanol. La detección posterior del derivado por fluorescencia es muy sensible y bastante selectiva pero, aún así, cuando las muestras son muy complejas se requieren pasos previos de limpieza para evitar interferencias en el análisis. El principal problema del método EPA es que se requiere de un aditamento (el reactor postcolumna) relativamente sofisticado y costoso, cuyo correcto manejo y operación impone la necesidad de contar con personal altamente especializado. En México, son contados los laboratorios analíticos que tienen el equipo y personal adecuados para aplicar el Método EPA 531.1. Los límites de detección para el análisis de agua están en la vecindad de 1-4 ng de carbamato, equivalente a 2.5-10 ppb^{12,13}.

Cuando se trabaja con muestras vegetales y frutas, el método involucra la extracción de los carbamatos con volúmenes apreciables de disolvente y grandes cantidades de muestra. Posteriormente se requiere de una limpieza del extracto obtenido mediante una serie de extracciones líquido-líquido con diversos disolventes orgánicos o por extracciones sólido-líquido con varios cartuchos. Finalmente la muestra se analiza como se indicó en el párrafo anterior. Todo este proceso es largo y tedioso y dificulta el análisis de una gran cantidad de muestras. En la Figura 3.3 se presenta, a modo de ilustración, un diagrama de bloques describiendo el tratamiento de la muestra para la determinación de N-metilcarbamatos.

A continuación se mencionan algunos otros métodos para determinación de carbofurano o en general de N-metilcarbamatos.

Métodos colorimétricos.- Uno de ellos consiste en una reacción de hidrólisis para producir fenoles con posición *para* libre, en la cual se acopla un reactivo diazo generando un producto colorido¹⁴. Otro método se basa en la hidrólisis alcalina de los carbamatos para liberar metilamina, la cual se hace reaccionar con una solución de nitroprusiato de sodio en medio acetona dando un compuesto de color púrpura, cuya absorbancia se mide a 530 nm. Para este último método se reportan límites de detección de 0.804 a 2.68 ppm¹⁵.

Métodos electroquímicos.- La hidrólisis alcalina de carbamatos produce derivados fenólicos electroactivos, lo que ha permitido la determinación de algunos de estos pesticidas por voltamperometría anódica. La aplicación de la voltamperometría diferencial de pulsos a muestras de

agua, en presencia de ácido perclórico, genera una señal de oxidación definida, con un pico a potencial de 688 mV para el derivado fenólico del carbofurano. Con este método se obtuvo una curva de calibración lineal en el intervalo de concentraciones de 1-30 mg/L y un límite de detección de 0.78 mg/L para carbofurano¹⁶.

Métodos que aplican la quimioluminiscencia y el análisis por inyección en flujo (FIA).- La reacción del luminol con KMnO_4 en medio alcalino se ha empleado para determinar directamente el carbofurano en agua en un sistema FIA. El método está basado en el aumento de la emisión de luz producida por la oxidación del luminol en presencia de carbofurano. Se reporta un límite de detección de 0.02 $\mu\text{g/mL}$ ¹⁷.

Cromatografía de gases (CG).- Esta técnica se ha utilizado para la determinación de carbofurano y otros carbamatos en muestras de papa, optimizando previamente los parámetros experimentales para minimizar la degradación de los analitos¹⁸. La limpieza del extracto obtenido de la muestra se realizó por extracción líquido-líquido (ELL) y la preconcentración por EFS; el eluato del cartucho se analizó por CG con detector de ionización de flama y detector de nitrógeno-fósforo. Los límites de detección del método fueron de 50-210 $\mu\text{g/kg}$ con el detector de ionización de flama y de 41-53 $\mu\text{g/kg}$ con el detector más selectivo de nitrógeno-fósforo. También se ha empleado CG-EM (espectrometría de masas) para detectar e identificar algunos carbamatos y sus productos de degradación, entre ellos el carbofurano, en un estudio sobre la fotodegradación de 7 pesticidas de esta familia¹⁹.

Cromatografía de líquidos.- Se ha reportado el acoplamiento en línea de la extracción en fase sólida con CLAR para la determinación de carbamatos en aguas superficiales. La detección se llevó a cabo directamente con un detector UV con arreglo de diodos o bien por derivación post-columna y detección de fluorescencia; los límites de detección en ambos casos fueron de 3-4 $\mu\text{g/L}$ ²⁰.

Inmunoensayos.- El uso de anticuerpos monoclonales anticarbofurano para la determinación de este pesticida en diversas matrices mediante inmunoensayos (ELISA), ha sido reportado por el grupo del Dr. Montoya. Esta técnica se utilizó para determinar carbofurano en jugos de fruta sin ningún pretratamiento de la muestra; los recobros obtenidos fueron de 107-115% con coeficientes de variación <15%. En otro trabajo, se aplicó la técnica para la determinación del carbofurano en frutas y legumbres; previamente, los extractos de las muestras fueron tratados mediante varios pasos de ELL con diversos disolventes. Se obtuvieron recobros de 60-90% con coeficientes de variación de 2.1-25%, dependiendo de la muestra analizada^{21,22}. Otros investigadores han utilizado los mismos anticuerpos monoclonales (producidos por el grupo del Dr. Montoya) para determinación de carbofurano en jugos de frutas y en extractos de comida para bebé. Mediante ELISA con detección quimioluminiscente lograron alcanzar límites de detección de 0.03 ng/mL²³.

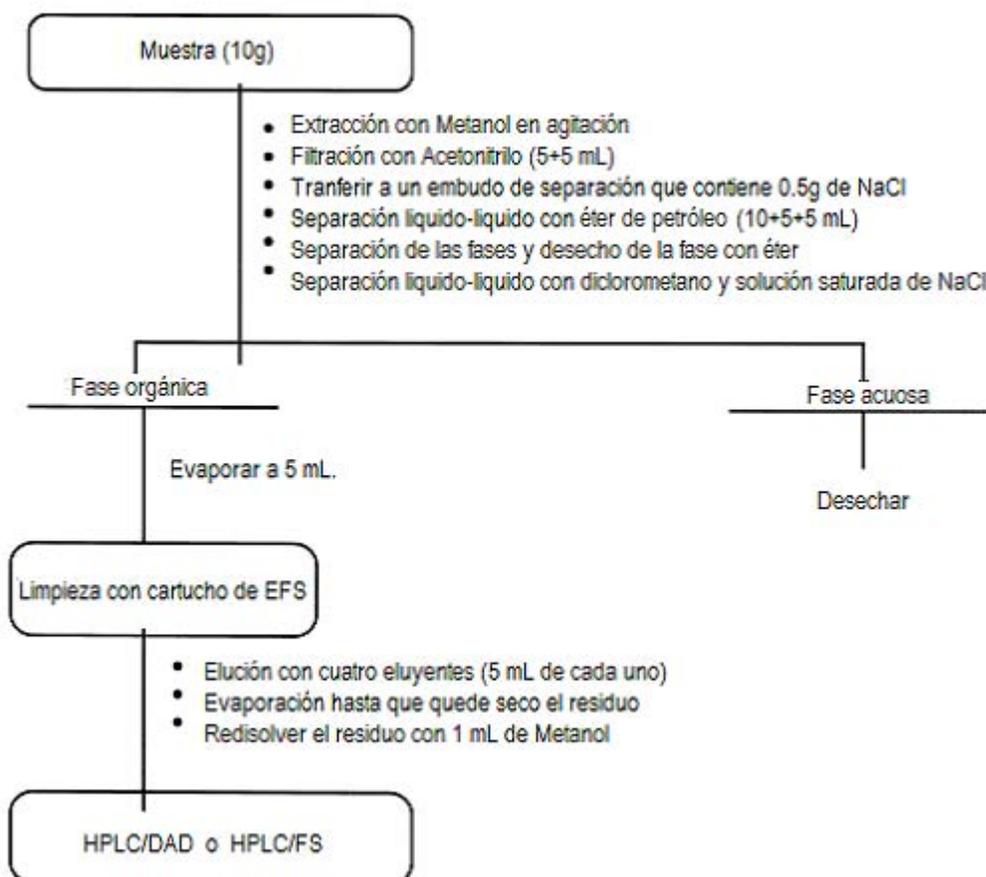


Fig. 3.3 Diagrama que resume la metodología analítica para la preparación de muestra y su posterior análisis por CLAR para determinar N-metilcarbamatos en frutas y vegetales (modificado de la referencia 12)

3.4 Cromatografía de Bioafinidad e Inmunoadsorbentes

Un inmunoadsorbente (IA) está constituido por un soporte sólido en el que se encuentran inmovilizados, física o químicamente, anticuerpos generados contra un determinado compuesto de interés. En general, los IAs son empacados en cartuchos o precolumnas y se utilizan para la preparación de muestra por extracción en fase sólida (EFS), operación que en este caso recibe el nombre de inmunoextracción (IE). La retención de los analitos en estos novedosos adsorbentes involucra interacciones biológicas del tipo antígeno-anticuerpo, las cuales se caracterizan por una alta afinidad y una gran selectividad hacia un compuesto particular o, en ocasiones, hacia una familia de compuestos estructuralmente relacionados. Estas características han permitido diseñar métodos en los cuales la extracción, concentración y limpieza de las muestras son llevadas a cabo en el mismo paso²⁴⁻²⁶.

Las separaciones por inmunoafinidad forman parte de un grupo de métodos conocidos genéricamente como cromatografía de afinidad o de bioafinidad. Los antecedentes de la cromatografía de bioafinidad se remontan a los años 1960's con los trabajos de Porath²⁷ y otros investigadores, quienes inmovilizaron proteínas en geles blandos (agarosa, sephadex) como un medio para aislar y purificar péptidos, enzimas, ácidos nucleicos y otras macromoléculas de extractos de tejido o de fluidos biológicos.

El aislamiento y la purificación de biomoléculas son de gran interés en áreas como medicina, biología, bioquímica, biotecnología, etc. Aunque varias técnicas cromatográficas, basadas en diferentes propiedades de las biomoléculas (ver Tabla 3.1), han sido utilizadas para este fin, es evidente que la cromatografía de afinidad sobresale entre ellas por la alta selectividad de las interacciones puestas en juego en el mecanismo de separación. En la Fig. 3.4 se muestra esquemáticamente el proceso de separación de biomoléculas con las diferentes técnicas cromatográficas.

Tabla 3.1 Técnicas de purificación de biomoléculas

Propiedad	Técnica
Bioreconocimiento (ligando específico)	Cromatografía de afinidad
Carga	Cromatografía de intercambio iónico
Tamaño	Filtración en gel (exclusión)
Hidrofobicidad	Cromatografía de interacción hidrofóbica Cromatografía de fase reversa

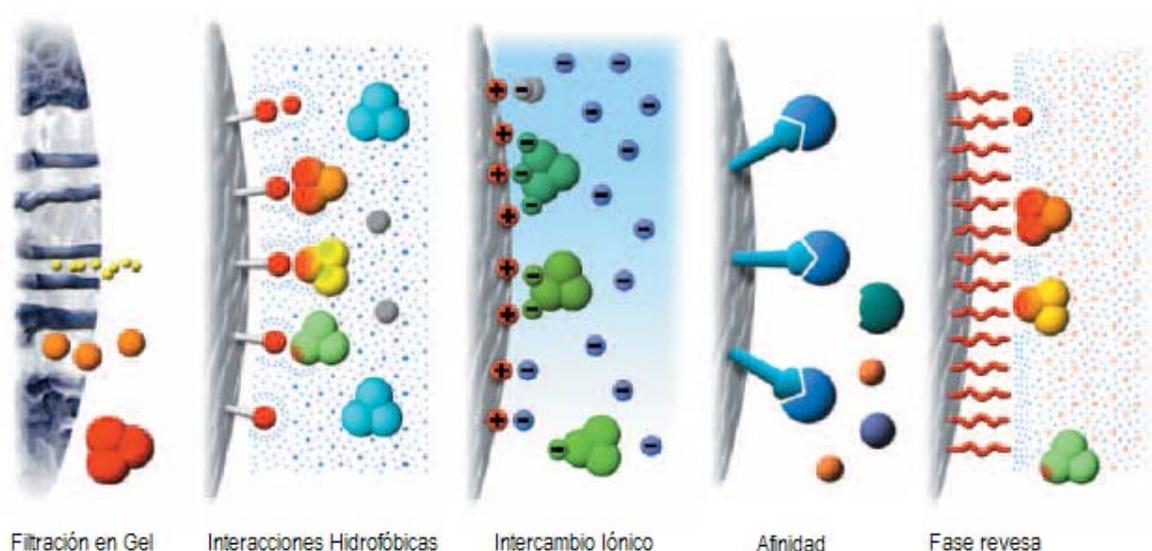


Fig. 3.4 Principios de separación en purificaciones cromatográficas de biomoléculas (obtenido de la referencia 28)

La cromatografía de afinidad separa proteínas, sustratos, antígenos y otras moléculas biológicas mediante una interacción reversible entre la molécula de interés (P) y un ligando específico (L) unido a un soporte cromatográfico (M). La técnica ofrece alta selectividad y por ende alta resolución. La molécula P se puede aislar con base en su función biológica o su estructura química. Esta poderosa técnica permite separar las biomoléculas activas o nativas de las desnaturalizadas de una misma sustancia; también permite aislar sustancias presentes a muy bajas concentraciones en grandes volúmenes de muestra y separarlas de otros contaminantes de la matriz, recuperando la proteína o sustancia de interés en forma pura y concentrada. La técnica es ideal para purificar y concentrar, permite ahorrar tiempo y trabajo cuando se requiere obtener una cierta cantidad de un compuesto particular con un alto grado de pureza. Sin embargo, sólo puede ser usada cuando se tienen disponibles los ligandos específicos para la molécula de interés.

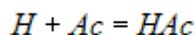
Las interacciones biológicas entre el ligando L y la molécula P son el resultado de la combinación de diversas fuerzas de atracción, como fuerzas electrostáticas, interacciones hidrofóbicas, fuerzas de Van der Waals y/o formación de puentes de hidrógeno. Para eluir la molécula enlazada del medio de afinidad, esas interacciones de unión deben ser revertidas, ya sea de forma específica, usando otro ligando competitivo, o no específica, por cambio de pH, cambio de fuerza iónica o cambiando la polaridad del medio.

Una buena purificación de afinidad requiere de un ligando bioespecífico, que pueda ser unido covalentemente o por otro medio a un soporte sólido. El ligando inmovilizado (M-L) deberá mantener su afinidad específica por la molécula de interés. Una vez que esta última ha sido enlazada (M-L-P), se lleva a cabo un lavado para desalojar la matriz de la muestra y eluir otros componentes retenidos débilmente por interacciones no específicas con el soporte o el propio ligando, sin que se afecte la unión específica de interés. La desorción de la molécula P se lleva a cabo cambiando adecuadamente las condiciones que favorecen la unión con el ligando, permitiendo así que la molécula se recupere en forma activa, purificada y concentrada^{28,29}.

Algunas interacciones típicas frecuentemente usadas en cromatografía de afinidad son:

- Enzima – sustrato, inhibidor, cofactor.
- Anticuerpo – antígeno, virus, célula.
- Lectina – polisacárido, glicoproteína, receptor en la superficie celular, célula.
- Acido nucleico – secuencia de base complementaria, histonas, ácido nucleico polimerasa, ácido nucleico unido a una proteína.
- Hormona, vitamina – receptor, proteína acarreadora
- Iones metálicos – proteínas nativas con histidina, cisteína y/o residuos de triptofano en su superficie.

En el caso particular de los inmunoabsorbentes (interacción anticuerpo-antígeno), el principio fundamental aplicado a toda inmunoreacción está basado en la ley de acción de masas. La reacción de enlazamiento puede ser visualizada como una reacción de formación de un complejo entre el antígeno o hapteno en solución (H) y el anticuerpo inmovilizado en el soporte (Ac), representada por la siguiente ecuación:³⁰



la constante de afinidad (K_{aff}) determina el cociente de concentraciones entre el hapteno ligado y el hapteno libre (coeficiente de distribución del hapteno, D_H) y se representa por:

$$K_{aff} = \frac{[HAc]}{[H][Ac]} = \frac{D_H}{[Ac]}$$

De acuerdo con esta ecuación, la retención de un analito (el hapteno) en un cartucho o precolumna de inmunoextracción está determinada por la constante de afinidad del complejo analito-anticuerpo y por la concentración de anticuerpo activo inmovilizado en el soporte. Para alcanzar altos factores de preconcentración en un cartucho o precolumna de IE se requiere una alta constante de afinidad, que

permite percolar grandes volúmenes de muestra sin que se fugue el analito, y una alta concentración de anticuerpo activo en la fase estacionaria, que determina la capacidad de enlazamiento del inmuoadsorbente en masa de analito.

3.5 Inmunoensayos aplicados en pesticidas ^{31,32}

Los métodos no cromatográficos para detectar residuos de pesticidas consisten en una gran variedad de técnicas, basadas en procesos biológicos y físicos. Las técnicas biológicas incluyen inmunoensayos, biosensores, bioensayos, ensayos con enzimas y reacciones de polimerasa en cadena (PCR). Las técnicas físicas pueden dividirse en espectrofométricas y voltamperométricas.

El concepto de inmunoensayo fue descrito por primera vez en 1945 cuando Landsteiner sugirió que los anticuerpos se pueden unir selectivamente a pequeñas moléculas (haptenos) si éstas son conjugadas a grandes moléculas acarreadoras. Este concepto hapteno-específico fue explorado por Yalow y Berson en los años 1950's y resultó un inmunoensayo cuando fue aplicado para monitorear insulina en humanos. Este fue un trabajo pionero que impulsó un rápido avance de los métodos inmunoquímicos para uso clínico.

La primera aplicación basada en tecnología inmunológica para pesticidas no fue reportada sino hasta los años 1970's, cuando Centeno y Johnson desarrollaron anticuerpos selectivos para malation. En 1972, Engvall y Perlman introdujeron el uso de enzimas como marcadores para inmunoensayos y propusieron el término ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) para denominar la técnica. Esta se basa en la detección de un antígeno inmovilizado sobre una fase sólida mediante anticuerpos que directa o indirectamente participan en otra reacción cuyo producto, por ejemplo un compuesto colorido, puede ser medido espectrofotométricamente. En 1980, Hammock y Mumma pusieron en evidencia el potencial de ELISA para la detección de contaminantes agroquímicos y ambientales. Desde entonces el uso de los inmunoensayos en el análisis de pesticidas se ha incrementado dramáticamente. La tecnología de los inmunoensayos ha llegado a ser la metodología analítica primaria para la detección de productos que contienen organismos genéticamente modificados (OGMs).

Algunas ventajas de la tecnología de los inmunoensayos:

- Límites de detección bajos.
- Alta selectividad para el analito de interés
- Se pueden analizar simultáneamente un gran número de muestras
- Se reduce la preparación de muestra
- Efectividad para diferentes tipos de muestras.

- Cantidades pequeñas de muestra.
- Adaptabilidad para un determinado uso.

Como todo método analítico, la tecnología de los inmunoensayos tiene sus limitaciones:

- Interferencia de la matriz de la muestra
- Reactividad cruzada para compuestos análogos del analito de interés
- Poca aplicabilidad para determinaciones multianalitos.
- Tiempos largos para el desarrollo de los métodos

La inmunoafinidad es una herramienta versátil que puede ser utilizada en diferentes formatos para una rápida y selectiva detección (ELISA) o bien aislamiento, concentración y purificación (IAs) de los analitos de interés. Hoy, gracias al enorme desarrollo de la inmunología se pueden generar, en principio, anticuerpos contra cualquier sustancia. Por ello, los métodos basados en inmunoafinidad son más y más comunes en una gran cantidad de aplicaciones: análisis de pequeñas moléculas, incluyendo fármacos y pesticidas, identificación de plagas y especies benéficas, caracterización de la calidad de las cosechas, detección de OGMs, detección de enfermedades y también para llevar a cabo monitoreos para el bioterrorismo. Asimismo, los anticuerpos pueden reconocer quelatos de iones metálicos, lo que podría ser usado para desarrollar inmunoensayos para Cd(II), Hg(II), Pb(II) y Ni(II), ampliando el campo de aplicación³³.

Los inmunoensayos se basan en la reacción de un analito o antígeno (Ag) con un anticuerpo (Ac) específico dando un producto (Ag-Ac) que puede ser medido.

3.6 Inmunoafinidad en extracción en fase sólida ³⁴⁻³⁸

La medición de trazas de compuestos orgánicos, como fármacos, aditivos en alimentos, pesticidas y otros contaminantes a muy bajas concentraciones en muestras biológicas y ambientales, es una tarea muy importante en la química analítica. A pesar de los notables avances en instrumentación analítica, como los detectores sumamente sensibles y en algunos casos muy selectivos con que se cuenta en las principales técnicas de separación (CLAR, CG y electroforesis capilar), es común constatar que la preparación de muestra es un paso limitante en todos los métodos cuando se trabaja con matrices complejas (sangre, plasma, suero, orina, tejido, aire, agua de río o presa, suelo, sedimento, etc.). Por ello, una gran parte de las investigaciones actuales en el área está dirigida a la optimización del tratamiento de la muestra. Entre las técnicas de preparación de muestra se incluyen: extracción líquido-líquido, extracción en fase sólida (EFS), precipitación de proteínas,

extracción con soxhlet, digestión con microondas, extracción con fluido supercrítico, filtración, homogeneización, diálisis, sonicación y muchas otras.

El registro de nuevos pesticidas requiere de métodos analíticos sensibles y altamente fiables para determinar la distribución de residuos de pesticidas y sus metabolitos en suelo, agua y cultivos. A diferencia del agua potable, las matrices ambientales son más complejas y contienen muchos compuestos que pueden interferir en la detección, identificación y/o cuantificación del pesticida o pesticidas en estudio. La EFS es una técnica muy popular para eliminar interferencias y recuperar el analito de interés con un gasto mínimo de solvente orgánico.

El principio de la EFS es similar al de la extracción líquido-líquido (ELL), ya que ambas se basan en el reparto o distribución de los solutos entre dos fases inmiscibles. En el caso de la EFS una de las fases es un líquido (la muestra) y la otra es un sólido (el adsorbente). Esta técnica de tratamiento de muestra permite la concentración y purificación de analitos en muestras líquidas (aunque también se utiliza para muestras en fase vapor). La EFS consiste de tres o cuatro pasos sucesivos (Fig. 3.5). En el primero, el adsorbente es acondicionado usando un solvente apropiado, seguido por otro solvente similar al de la matriz de la muestra. Este paso es crucial ya que permite la humectación de la fase estacionaria y la solvatación de sus grupos funcionales; además, se remueven posibles impurezas que contenga el adsorbente o el contenedor de éste y se desalojan burbujas de aire presentes en los intersticios del lecho, llenando los lugares vacíos con solvente.

El segundo paso consiste en la carga de la muestra líquida, la cual es percolada a través de la columna, cartucho o disco que contiene al adsorbente. Dependiendo del formato usado, la cantidad de adsorbente y su fuerza de interacción con los analitos de interés, se pueden pasar volúmenes de muestra desde algunos mL hasta 1 L, ya sea por gravedad, con ayuda de una bomba o usando vacío. La velocidad de flujo de muestra debe ser lo bastante lenta para permitir una retención eficiente de los analitos, pero suficientemente rápida para evitar un excesivo tiempo de análisis. Durante este paso los analitos son concentrados en el adsorbente.

El tercer paso (opcional) consiste en realizar un lavado del adsorbente, con un solvente apropiado que tenga una fuerza de elución baja, para eliminar componentes de la muestra que hayan sido retenidos débilmente y así disminuir los efectos de matriz.

El último paso consiste en la elución de los analitos de interés, la cual puede ser en línea o fuera de línea. En la EFS en línea, el adsorbente de granulometría muy fina ($\leq 10 \mu\text{m}$) está empacado en una columna de pequeñas dimensiones (precolumna), la cual se coloca en una válvula de conmutación que a su vez está insertada entre el inyector y la columna analítica del cromatógrafo de líquidos. Al rotar la válvula de conmutación, los compuestos retenidos son desorbidos y enviados a la columna cromatográfica para su separación y determinación. En la EFS fuera de línea (cartuchos y discos), la

elución se realiza con un solvente de fuerza suficientemente alta para lograr la desorción y recuperación cuantitativa de los analitos en el mínimo volumen de solvente. Por otra parte, modulando adecuadamente la fuerza de éste, se puede evitar desorber compuestos interferentes de la muestra fuertemente retenidos, lo que también coadyuva a disminuir los efectos de matriz. El extracto obtenido es posteriormente inyectado en el cromatógrafo para su análisis.

Ambas modalidades de la EFS presentan ventajas y desventajas. La EFS en línea permite alcanzar mayor precisión, exactitud y sensibilidad en los análisis porque la manipulación de la muestra es menor y todo el extracto es analizado; además, con esta modalidad es posible automatizar completamente el análisis desde la preparación de muestra hasta el tratamiento de datos. Su principal desventaja es que el adsorbente de EFS debe ser compatible con la fase móvil utilizada en la separación. En general, la puesta a punto de métodos en línea es más complicada pero el método generado es más rápido, robusto y confiable. La EFS fuera de línea es más simple y flexible en cuanto a la elección del disolvente de elución, permite realizar análisis repetidos del extracto de la muestra para comprobar resultados, pero obviamente se pierde sensibilidad pues sólo se inyecta una pequeña alícuota del eluato en cada análisis.

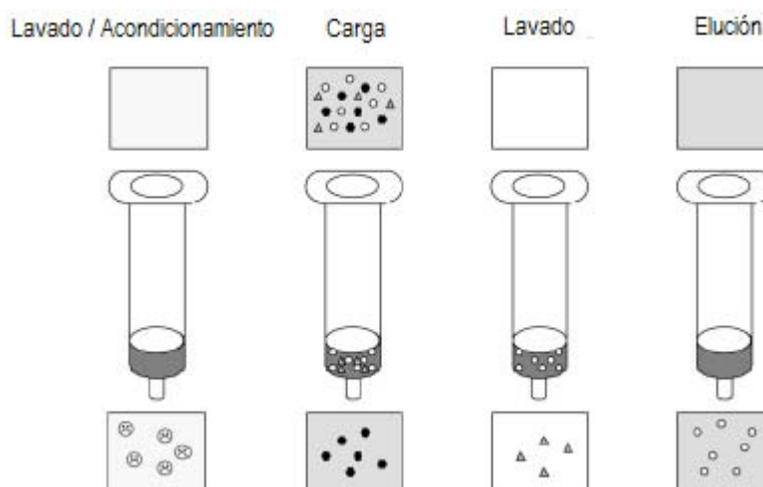


Fig. 3.5 Extracción en Fase Sólida fuera de línea³⁷.

Los adsorbentes comúnmente utilizados en EFS (sílice, fases reversas, resinas de intercambio iónico) tienen generalmente una gran capacidad de muestra pero son poco selectivos. Por ello, en años recientes se ha tenido gran interés en inmovilizar anticuerpos en soportes sólidos como un medio para proporcionar alta selectividad al proceso de preparación de muestra por EFS. Un protocolo de inmunoeextracción es similar al de la EFS convencional; sin embargo, dada la naturaleza del adsorbente, se requieren condiciones particulares en cada etapa del proceso. A continuación se mencionan los pasos y condiciones genéricas del proceso de IE.

- Acondicionamiento: buffer acuoso de pH cercano a 7 y fuerza iónica relativamente alta.
- Carga de muestra: a velocidades de flujo moderadas. La muestra debe ser fundamentalmente acuosa y se le debe añadir un buffer con las condiciones marcadas en el punto anterior
- Lavado: con agua o buffer. En ocasiones se añade una pequeña proporción de un disolvente orgánico polar
- Elución: con buffer acuoso de pH ácido (2-3) o con mezclas agua – disolvente orgánico o buffer – disolvente orgánico.
- Regeneración: lavados con agua y el buffer de acondicionamiento. Muchos reportes en la literatura recomiendan dejar el IA en reposo, sumergido en el buffer salino de pH 7, durante al menos 1 hora antes de someterlo a un nuevo ciclo de IE.

Cuando no está en uso, el cartucho o precolumna debe ser almacenado manteniendo el IA inmerso en el buffer salino de pH 7 y de preferencia en refrigeración (4 °C).

La IE se trabaja preferentemente fuera de línea puesto que las fases móviles usadas en CLAR son demasiado agresivas para los anticuerpos. No obstante, algunos investigadores han reportado métodos de análisis para hidrocarburos poliaromáticos, triazinas y fenilureas utilizando sistemas IE – CLAR en línea. En estos trabajos se han empleado sistemáticamente anticuerpos policlonales unidos por anclaje químico a un soporte rígido (sílice de pequeña granulometría)³⁹⁻⁴¹.

Independientemente de la modalidad utilizada, la inmunoeextracción combinada con las técnicas cromatográficas ha permitido el desarrollo de métodos extremadamente sensibles y selectivos, y a la vez relativamente simples, para la determinación de compuestos traza en extractos complejos de plantas o sedimentos, así como en fluidos biológicos y aguas ambientales^{36,38-42}. Sin embargo, son muy pocos los inmunoabsorbentes que han sido hasta ahora comercializados.

3.7 Preparación de inmunoabsorbentes (IAs) ⁴²⁻⁴⁵

La inmovilización de biomoléculas en un soporte sólido es un proceso sumamente delicado debido a que estas frágiles entidades pueden desnaturalizarse fácilmente perdiendo sus propiedades y actividad característica. Aunque los primeros reportes sobre la síntesis de biomateriales aparecieron desde hace unas décadas, las investigaciones continúan para tratar de mejorar las técnicas que se han ido desarrollando, de modo a preservar en mayor medida la configuración terciaria de las biomoléculas, y por tanto su actividad, durante el proceso de inmovilización.

Hasta ahora, el método más utilizado para la preparación de IAs ha sido por enlazamiento covalente del anticuerpo al soporte sólido. El soporte más popular es la sílice, ya que puede ser fácilmente derivatizada para introducir grupos de anclaje mediante los cuales se puede enlazar al ligando funcional (el anticuerpo); adicionalmente, la sílice presenta buena estabilidad mecánica a altas presiones y está comercialmente disponible en diferentes granulometrías. Otros soportes que también han sido empleados para preparar IAs son las esferas de vidrio de poro controlado y los geles blandos como agarosa y celulosa. Estos últimos han sido ampliamente utilizados en cromatografía de afinidad pero presentan poca estabilidad mecánica y sólo pueden ser trabajados a muy bajas presiones. Un material de soporte óptimo debe poseer las siguientes características: ser de fácil activación para permitir el acoplamiento, ser estable química y mecánicamente, ser hidrofílico para minimizar las interacciones no específicas, tener un tamaño de partícula uniforme y ser macroporoso.

En general, los anticuerpos se inmovilizan mediante el establecimiento de enlaces químicos covalentes con el soporte sólido activado (p.ej. sílice aldehído) y un grupo reactivo del ligando que esté lo más lejos posible de su sitio activo. Los grupos funcionales en los ligandos que pueden ser usados para el acoplamiento incluyen aminas, sulfhidrilo, hidroxilo o carbonilo. También es posible enlazar los anticuerpos mediante grupos aldehído generados por oxidación de los residuos carbohidrato con enzimas apropiadas o con periodato. Estos grupos aldehído pueden reaccionar con soportes de sílice que contienen grupos amino. El método es recomendado para la inmovilización orientada de los anticuerpos u otras glicoproteínas ⁴⁶⁻⁴⁹.

Los métodos para la inmovilización física de anticuerpos en superficies inorgánicas, orgánicas o poliméricas incluyen: 1) adsorción física sobre la superficie, 2) atrapamiento en membranas semipermeables y 3) encapsulamiento en microesferas poliméricas o en hidrogeles.

Entre todos los métodos mencionados, la adsorción física es probablemente la menos utilizada en la actualidad pues presenta el problema de sangrado de la biomolécula y por lo tanto baja estabilidad

del IA. El enlazamiento químico, a pesar de su popularidad, es el que presenta mayor riesgo de desnaturalización del anticuerpo por las condiciones relativamente agresivas a que son sometidas las biomoléculas durante la o las reacciones químicas que comprende el proceso y dificultades para controlar su correcta orientación (salvo en el caso de la inmovilización orientada). La consecuencia de esto es que se requiere utilizar una cantidad importante de biomolécula (del orden de decenas de mg) para asegurar que el biomaterial presente un grado de actividad significativo. Dado que algunas biomoléculas son muy difíciles de obtener y por lo tanto de alto costo y/o limitada disponibilidad, ha sido necesario buscar otras alternativas más eficientes para su inmovilización.

En los métodos de atrapamiento en membranas y de encapsulamiento en polímeros o hidrogeles no existe un procedimiento general aplicable a todas las biomoléculas por lo que el protocolo de inmovilización debe ser optimizado para cada nueva molécula de interés, lo cual significa una intensa labor.

La ruta más novedosa y prometedora para la inmovilización de anticuerpos, y en general de biomoléculas, es el encapsulamiento en hidrogeles. Este método involucra atrapar al componente biológico en matrices inorgánicas de silicato u otros óxidos metálicos, o bien materiales híbridos orgánico-inorgánico, formados a temperatura ambiente a través de un proceso llamado sol-gel. Este proceso se realiza a temperatura ambiente, bajo condiciones menos agresivas para las biomoléculas y con una mínima manipulación de éstas. Lo anterior ha permitido sintetizar biomateriales con un grado de actividad satisfactorio empleando cantidades de biomolécula del orden de un miligramo o menores ⁵⁰⁻⁵³.

3.7.1 Sol-gel ^{45,54,55}

La química del sol-gel provee una herramienta muy versátil para la síntesis de biomateriales. Las interacciones entre la biomolécula y la solución coloidal (el sol) determinan el grado en el cual aquella retiene su actividad nativa al producirse la gelificación y el consecuente encapsulamiento en los poros del material. Esta técnica simple permite obtener una gran variedad de biomateriales apropiados para una gran diversidad de aplicaciones. Entre las aplicaciones más destacadas se encuentran los biosensores electroquímicos y ópticos, las fases estacionarias para separación de enantiómeros por cromatografía de afinidad, los inmunoabsorbentes para EFS, los agentes de liberación controlada, la biosíntesis en fase sólida y también es una matriz extraordinaria para estudios biofísicos.

El proceso sol-gel usualmente involucra la hidrólisis catalizada de un precursor (Fig. 3.6), formándose un sol acuoso (coloide en el que la fase dispersante es un líquido y la fase dispersa un sólido) al condensar las especies hidrolizadas; el crecimiento de las cadenas poliméricas en el medio de reacción conduce posteriormente a la formación de una gran red macromolecular que coalesce dando lugar a la formación de un gel (la fase dispersa es un líquido y el medio dispersor un sólido). La Fig. 3.7 muestra un esquema general de las dos reacciones clave (hidrólisis – condensación) que involucra el proceso sol-gel.

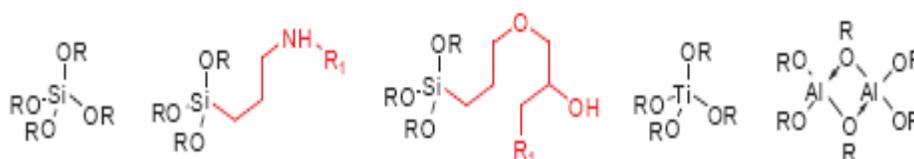


Fig. 3.6 Precursores de sol-gel: son alcóxidos, formados por un grupo alquilo unido al oxígeno, que a su vez está enlazado con un elemento metálico (Si, Al, Ti, Zr, V, Ta, etc.). Ej. Tetraalcóxidosilanos, Trialcoxialquilsilanos, Alcoximetallatos.

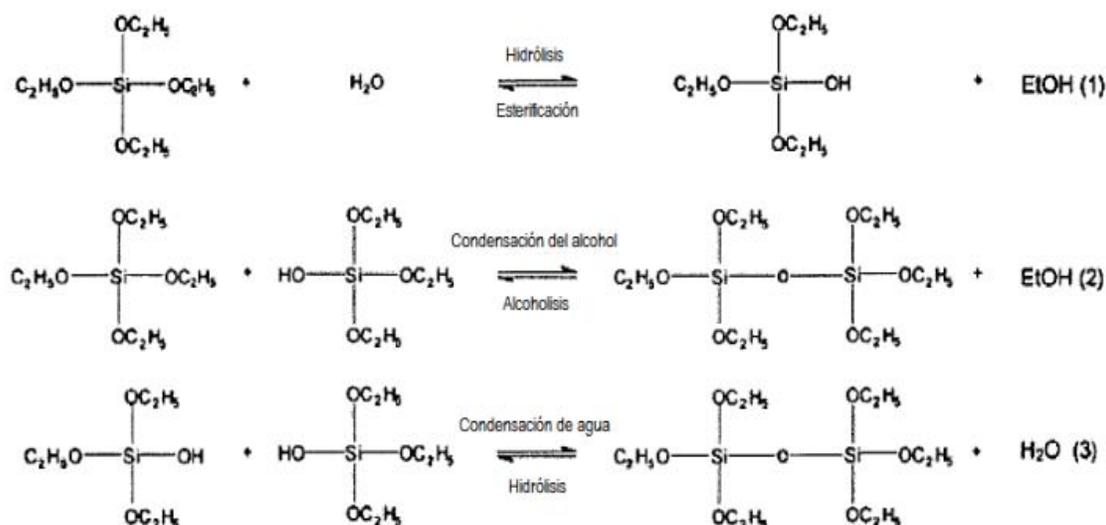


Fig. 3.7 Reacciones clave que involucra el proceso sol-gel

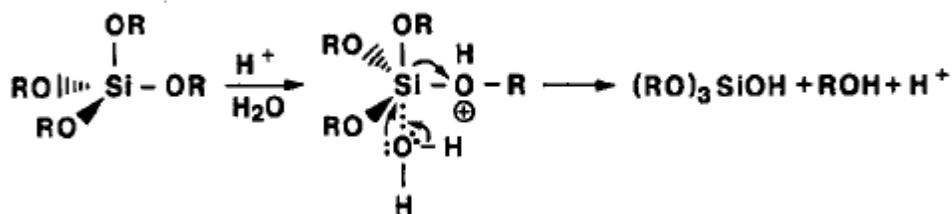
Las reacciones de hidrólisis son llevadas a cabo usando catalizadores que pueden ser ácidos, bases o iones (fluoruros, acetatos, carbonatos, etc.), o bien, bajo la acción de la luz (fotopolimerización). La velocidad de hidrólisis depende del tipo de precursor, la cantidad de agua y el tipo de catalisis.

En medios ácidos, las reacciones de hidrólisis son significativamente más rápidas que las reacciones de condensación y estas condiciones son favorables para la formación de polímeros lineales. Las investigaciones reológicas de la catálisis ácida en sol-gel han permitido constatar que la viscosidad y la elasticidad se incrementan con el tiempo, lo cual es típico de la formación de polímeros lineales. El mismo fenómeno se observa en la catálisis con fluoruro. Por el contrario, en la catálisis básica la velocidad de condensación es más rápida que la velocidad de hidrólisis, lo que crea condiciones altamente favorables para la formación de estructuras poliméricas ramificadas. Otra diferencia significativa es que en la catálisis ácida (o con fluoruro) el gel resultante es altamente poroso y posee una área superficial grande, mientras que en la catálisis básica el material posee baja porosidad y se reduce drásticamente el área superficial. El pH tiene una influencia determinante en el tiempo de gelación.

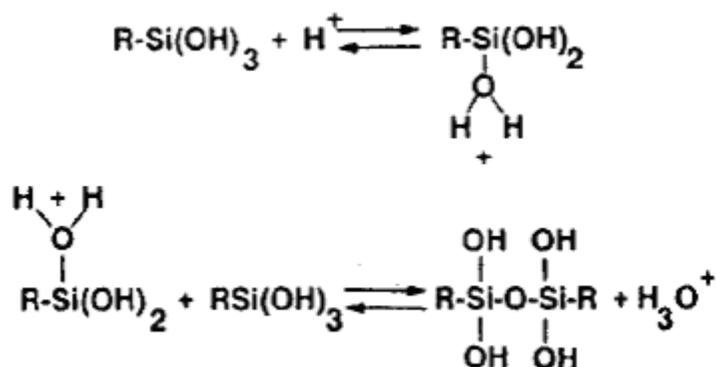
A continuación se ilustran los mecanismos de reacción propuestos para la hidrólisis y condensación en el proceso sol-gel catalizado por ácidos y bases⁵⁴.

I. Catálisis ácida

a) Mecanismo de hidrólisis (rápida):

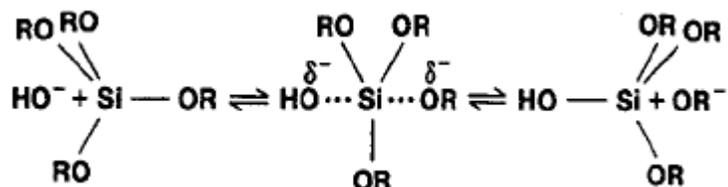


b) Mecanismo de condensación (lenta):

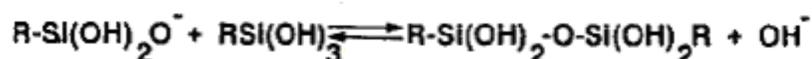
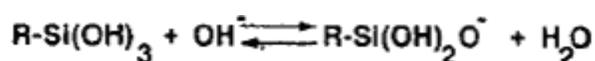


II. Catálisis básica

a) Mecanismo de hidrólisis (lenta):



b) Mecanismo de condensación (rápida):



La gelación o gelificación se refiere a la solidificación de la solución coloidal que cambia del estado líquido (sol) a un estado sólido (gel). El tiempo requerido para que la viscosidad del sol aumente hasta la obtención del hidrogel, como una estructura tridimensional porosa llena de líquido, se le conoce como tiempo de gelificación. Es en este momento cuando las moléculas dopantes (p.ej. los anticuerpos) quedan inmovilizadas físicamente dentro de estos poros del gel.

Como se observa en la catálisis ácida, el medio dispersante al final de la hidrólisis estará constituido por un poco de agua, una fuerte proporción de alcohol y una alta concentración de H^+ . Estas condiciones no son apropiadas para las biomoléculas por lo que, antes de adicionar el anticuerpo al medio, se debe añadir una solución buffer a $\text{pH} \approx 7.0$ para evitar su desnaturalización. La adición del buffer neutraliza el medio y diluye el alcohol; además, el aumento de la fuerza iónica y el cambio de pH aceleran las reacciones de condensación, promoviendo la rápida formación de grandes oligómeros. Durante esta etapa la biomolécula es rodeada por la red polimérica, quedando encapsulada en los poros al producirse la gelificación. El tiempo para obtener el hidrogel depende de varios factores experimentales, desde la proporción inicial de los reactivos, el tipo y velocidad de agitación, la temperatura, la concentración y tipo de sales, el pH del medio, el tipo de catalizador, e incluso el tamaño y forma del recipiente donde se esté llevando a cabo el proceso.

Una vez formado el gel con la biomolécula en los poros, viene una etapa de maduración en la que hay una reestructuración y densificación de la red polimérica, el grado de entrecruzamiento aumenta y la estructura se consolida, el gel se contrae y parte del líquido es expulsado de los poros. Por otra

parte, durante el secado el gel continúa encogiéndose y sus poros se comprimen, lo que puede afectar seriamente a la biomolécula atrapada en ellos. Para evitar un excesivo colapso de los poros es necesario realizar un secado sumamente lento, dando tiempo a que el esqueleto sólido del material se refuerce y consolide hasta llegar al estado de xerogel. Además se debe evitar la pérdida total de líquido (buffer) en los poros, puesto que éste es necesario para solvatar al anticuerpo y mantenerlo en su configuración plegada.

El diagrama de la Fig. 3.8 muestra en forma resumida las diferentes etapas del proceso sol-gel.

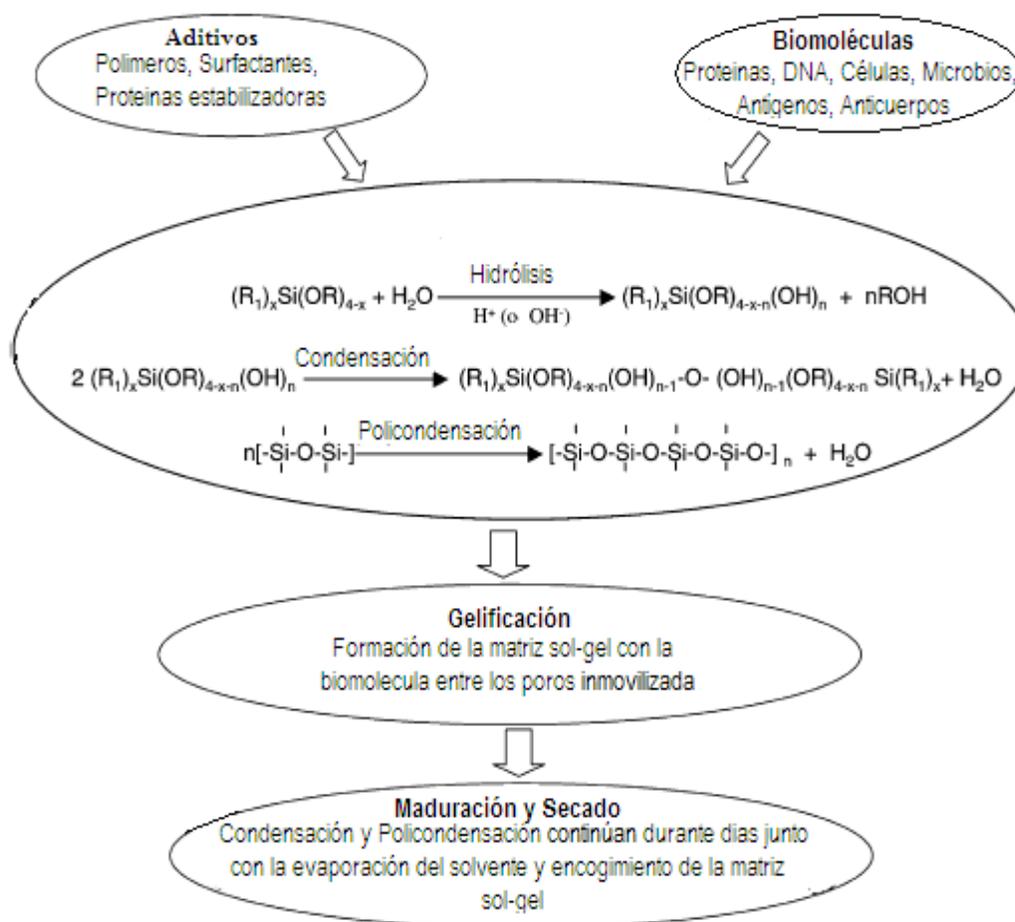


Fig. 3.8 Esquema general para el encapsulamiento de biomoléculas por el método sol-gel (modificado de la referencia 45).

3.8 Anticuerpos

Los anticuerpos o inmunoglobulinas (IgG) son glicoproteínas (proteínas unidas a azúcares) secretadas por un tipo particular de células, los plasmocitos. Los plasmocitos son el resultado de la proliferación y diferenciación de los linfocitos B (glóbulos blancos responsables de la respuesta humoral, es decir, de la producción de anticuerpos) que han sido activados. Durante la respuesta humoral, las inmunoglobulinas secretadas se adhieren al agente patógeno permitiendo que otros glóbulos blancos puedan localizarlo y destruirlo con mayor rapidez. Su propósito es reconocer cuerpos extraños invasores como las bacterias y virus para mantener al organismo libre de ellos.

Virtualmente toda molécula ajena a un determinado organismo se comporta frente a éste como un antígeno. Se pueden diferenciar dos características primordiales en un antígeno: por una parte, la inmunogenicidad o capacidad que presenta una molécula para generar una respuesta inmune en un organismo dado y, por otra parte, la antigenicidad o particularidad del antígeno que hace que éste sea reconocido por un determinado anticuerpo. Ambas propiedades pueden o no estar presentes en un determinado antígeno. Las moléculas de tamaño pequeño (haptenos o péptidos) son poco inmunogénicas y por ello se asocian a proteínas transportadoras de alto peso molecular para inducir una respuesta inmune adecuada. A la región del antígeno reconocida por un anticuerpo se le denomina epítipo o determinante antigénico. Un antígeno puede presentar un número variable de epítipos de estructura única o repetitiva. La complejidad estructural de las proteínas favorece que éstas presenten por lo general un número elevado de epítipos distintos, mientras que los ácidos nucleicos y los polisacáridos, dada su repetitividad estructural, poseen un número escaso de epítipos diferentes.

Cada molécula de anticuerpo está compuesta por cuatro cadenas polipeptídicas (tetrapéptido) unidas por puentes disulfuro (-S-S-). Las cuatro cadenas, iguales dos a dos, se clasifican en:

Cadenas ligeras L.- Están compuestas por alrededor de 220 aminoácidos, con dos regiones, una variable de 110 aminoácidos en el extremo amino-terminal y una constante de 110 aminoácidos en el extremo carboxi-terminal. Existen dos clases de cadenas ligeras (κ y λ), que pueden ser diferenciadas por antisueros específicos.

Cadenas pesadas H (α , β , μ , δ , ϵ).- Están formadas por 440 aminoácidos, excepto dos tipos que tienen 550 aminoácidos. Al igual que en las ligeras se diferencian dos regiones, una variable de 110 aminoácidos en el extremo amino-terminal y una constante de 330-440 aminoácidos en el extremo carboxi-terminal.

Cada tipo de cadena tiene un dominio variable (VH y VL, respectivamente) y otro constante (CH y CL) determinados por la secuencia de aminoácidos. Los dominios variables están unidos a los constantes por regiones J (de Joining, unión).

Las dos cadenas pesadas H se unen entre ellas mediante dos puentes disulfuro y cada una de ellas, a su vez, se une a una cadena ligera L mediante otros puentes disulfuro, a nivel del extremo carboxi-terminal de la cadena ligera, adquiriendo así una forma de Y (Fig. 3.9). Cada brazo de la Y, o fragmento Fab (de antigen binding fragment), se une al antígeno de forma independiente, o sea que el anticuerpo es bivalente. El resto de la molécula, o fragmento Fc (porque cristaliza con facilidad), no participa en la unión con el antígeno sino que es reconocido por los receptores celulares específicos, contribuyendo así al proceso mediante el cual el antígeno es destruido.

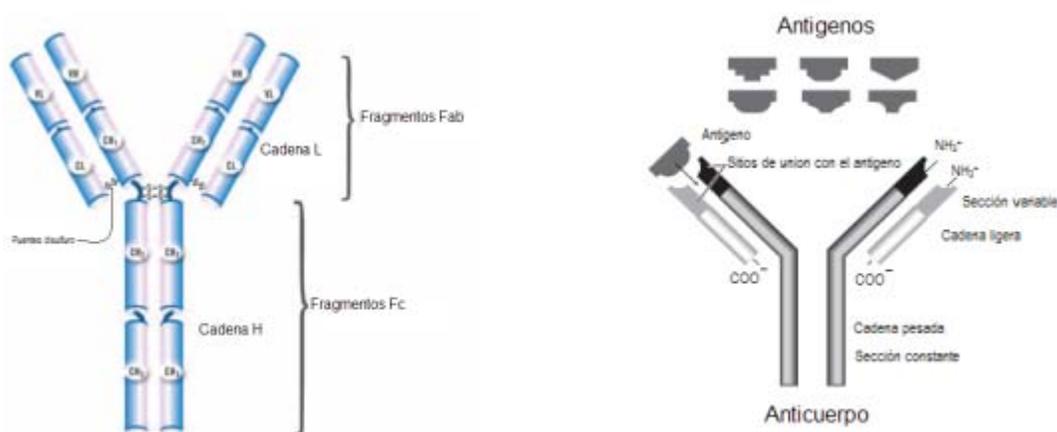


Fig. 3.9 Estructura de una IgG (obtenida de National Human Genome Research Institute, National Institutes of Health, USA)

En el ser humano existen cinco clases de anticuerpos (Fig. 3.10), conocidos por el nombre de inmunoglobulinas (Ig):

- La IgG es la más abundante, representa el 80% del total de inmunoglobulinas. Puede atacar a cualquier tipo de patógeno, por ejemplo virus, bacterias y hongos, bloqueando sus toxinas. Tiene cuatro subtipos, IgG₁, IgG₂, IgG₃ e IgG₄.

- IgA representa alrededor del 15 al 20% de las inmunoglobulinas de la sangre. Actúa contra patógenos que entran en contacto con la superficie corporal, ingeridos o inhalados. Existen dos formas, IgA₁ e IgA₂.
- IgM es una inmunoglobulina que puede detectar el tipo de ABO sanguíneo de una persona. También es importante en el diagnóstico de fase aguda de distintas infecciones.
- IgD constituye alrededor del 1% en la membrana plasmática de los linfocitos B. Participa en el desarrollo de células de memoria en los linfocitos B.
- IgE es una inmunoglobulina que se encuentra en la membrana de los basófilos y del mastocito. Participa en las reacciones de hipersensibilidad y en la respuesta a parásitos.

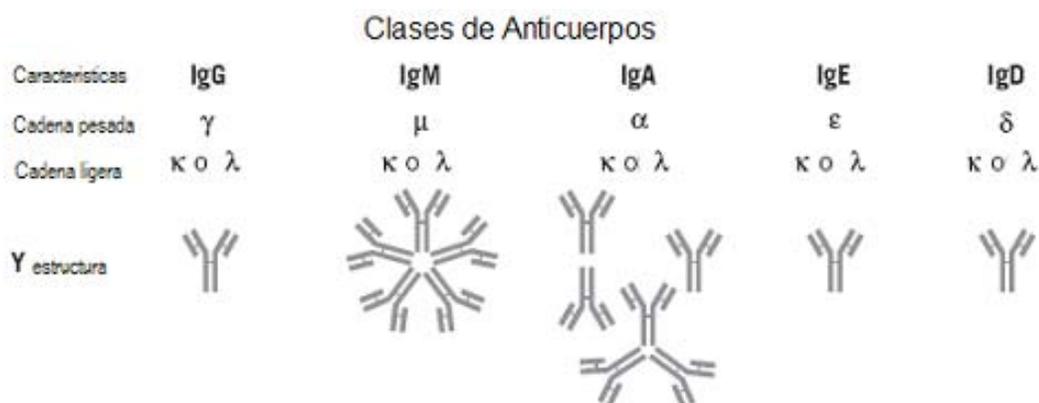


Fig. 3.10 Representaciones esquemáticas de inmunoglobulinas

Las inmunoglobulinas IgG son los anticuerpos utilizados en la preparación de inmunoabsorbentes. Sin embargo, dado que los posibles analitos de interés (pesticidas y otros contaminantes orgánicos, fármacos, etc.) son moléculas pequeñas no inmunogénicas, la generación de anticuerpos capaces de reconocerlos es un proceso largo, difícil y no siempre exitoso, lo que se refleja en el alto costo y baja disponibilidad de esta materia prima. De hecho, en la mayor parte de los trabajos reportados sobre inmunoabsorbentes, se han empleado anticuerpos producidos por algún grupo de investigación ya que es muy difícil adquirirlos comercialmente. Aún más, la variedad de anticuerpos que han logrado producirse en laboratorios de investigación o que están disponibles en alguna casa comercial es muy escasa. Predominantemente, se trata de anticuerpos contra algunos miembros de la familia de las triazinas (atrazina, simazina) o de las fenilureas (isoproturón, clortolurón, diurón), o bien contra hidrocarburos poliaromáticos (pireno)^{40,47,48,53,56,57}. Estos anticuerpos pueden ser

policlonales o monoclonales. En principio, los anticuerpos policlonales presentan una reactividad cruzada alta, reconociendo a diferentes compuestos con estructura similar a la del antígeno que les dio origen, mientras que los anticuerpos monoclonales son específicos para dicho antígeno. No obstante, cuando la molécula antigénica es un analito pequeño, aún los anticuerpos monoclonales presentan cierto grado de reactividad cruzada.

Si una sustancia extraña (un antígeno) se inyecta en el cuerpo de un ratón o un humano, algunas de las células B de su sistema inmune se transformarán en células plasmáticas y empezarán a producir anticuerpos que se unirán a ese antígeno. Cada célula B produce un solo tipo de anticuerpo, pero diferentes linfocitos B producirán anticuerpos estructuralmente diferentes que se unen a distintas partes del antígeno. Esta mezcla fisiológica natural de anticuerpos es conocida como "anticuerpos policlonales". De manera genérica, para obtener anticuerpos policlonales que reconozcan a compuestos pequeños se requieren los siguientes pasos: ^{26,31,45}

- i. Diseño y síntesis del hapteno (molécula del analito modificada, de modo que pueda unirse convenientemente a la proteína acarreadora mediante un grupo funcional apropiado)
- ii. Conjugación del hapteno con una proteína acarreadora grande (p.ej. albúmina sérica bovina) para producir el inmunógeno.
- iii. Inmunización del animal huésped (ratón, conejo, mono, etc.) para una subsiguiente generación de anticuerpos
- iv. Extracción del suero
- v. Aislamiento y purificación de la fracción inmunoglobulínica IgG, que contiene algunos anticuerpos contra el analito (la mayor parte de las IgG reconoce alguna región de la molécula de la proteína acarreadora).
- vi. Determinación de actividad (con respecto al analito) de la fracción IgG purificada.

Los anticuerpos monoclonales son proteínas idénticas producidas por una célula híbrida producto de la fusión de un clon de linfocitos B, descendiente de una sola y única célula madre, y una célula plasmática tumoral. A diferencia de los anticuerpos policlonales, cuya actividad y características varían de lote a lote, los anticuerpos monoclonales se pueden producir repetidamente con características idénticas porque se generan a partir de clones que proceden de una sola célula madre. En principio es posible producir anticuerpos monoclonales que se unan específicamente con cualquier molécula con carácter antigénico. Este fenómeno es de gran utilidad en bioquímica, biología molecular y medicina.

Para producir anticuerpos monoclonales, primero se extraen células B del bazo de un animal que ha sido expuesto al antígeno. Estas células B son fusionadas con células tumorales de mieloma múltiple (un tipo de cáncer) que pueden crecer indefinidamente en cultivo celular. Esta fusión hace a

las membranas celulares más permeables. Las células fusionadas híbridas, llamadas hibridomas, pueden multiplicarse rápida e indefinidamente y pueden producir gran cantidad de anticuerpos. Los hibridomas son separados y cultivados para obtener diferentes colonias, cada una de las cuales produce un sólo tipo de anticuerpo. Los anticuerpos de diferentes colonias son analizados para conocer su capacidad de unirse a un antígeno determinado, por ejemplo mediante pruebas ELISA. Con base en los resultados de las pruebas, se seleccionan y clonan los hibridomas que produzcan los anticuerpos más efectivos. Posteriormente, los anticuerpos monoclonales pueden ser producidos en cultivos celulares conforme se requieran. Cuando las células de un hibridoma son inyectadas en cultivos de tejidos producen tumores que sintetizan un fluido rico en anticuerpos llamado líquido ascítico. En la Fig. 3.11 se muestra en forma simplificada el proceso descrito

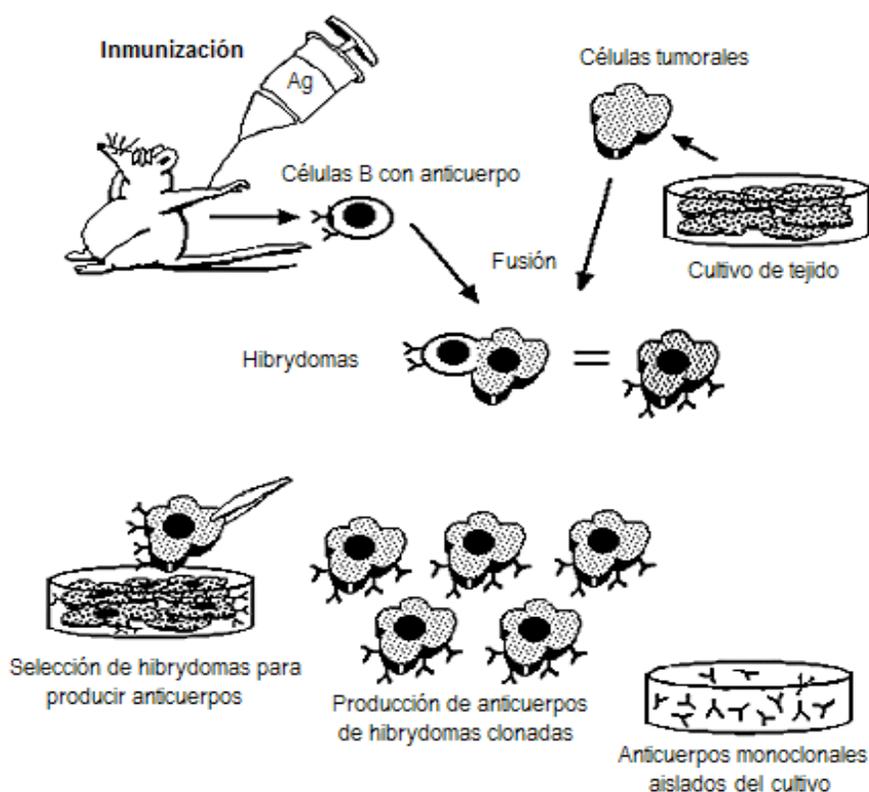


Fig. 3.11 Producción de anticuerpos monoclonales (modificada de referencia 58)

Actualmente, se tiene la tecnología necesaria para la producción de anticuerpos en ausencia de inmunización del animal. Es la denominada tecnología de los anticuerpos recombinantes. Los avances en ingeniería genética han facilitado en gran medida la manipulación genética para la producción, identificación y conjugación de fragmentos de anticuerpos recombinantes, obteniéndose nuevos anticuerpos multivalentes y multiespecíficos.

3.8.1 Reactividad cruzada ^{30,59}

Dependiendo de la estructura del compuesto de interés (tamaño, forma, grupos químicos, etc.) y de la manera como éste se conjuga con la proteína acarreadora para formar el inmunógeno, los anticuerpos generados podrán ser más o menos específicos para este compuesto. Así, un compuesto que posea varios grupos funcionales polares muy característicos y que se conjugue dejando dichos grupos expuestos, lo más lejos posible del sitio de unión a la proteína, generará anticuerpos muy específicos. Por otro lado, si el compuesto se conjuga de modo que el grupo funcional característico de la familia química a la que pertenece quede expuesto (p.ej. el grupo carbámico del carbofurano), entonces los anticuerpos generados podrán reconocer a otros miembros de la misma familia. Esta propiedad de los anticuerpos que les permite reconocer a compuestos de estructura similar a la del hapteno recibe el nombre de reactividad cruzada.

Si el anticuerpo reconoce un sólo compuesto, es conocido como monoespecífico, pero si reconoce varios compuestos de la misma familia, es un anticuerpo selectivo de grupo (Fig. 3.12).

Aunque podría pensarse que la reactividad cruzada es una propiedad indeseable, ésta puede aprovecharse en el diseño de métodos analíticos para la determinación simultánea de varios analitos de la misma familia. Por ejemplo, se han utilizado inmunoabsorbentes con anticuerpos policlonales anti-isoproturón o antiatrazina para la inmunoextracción simultánea de varios herbicidas fenilurea o varias triazinas, respectivamente, a partir de muestras de agua de río y extractos de sedimento ³⁹. Así mismo, un IA con anticuerpos policlonales antipireno sirvió para diseñar un método de preconcentración aplicable a un grupo de hidrocarburos aromáticos polinucleares ⁴⁰.

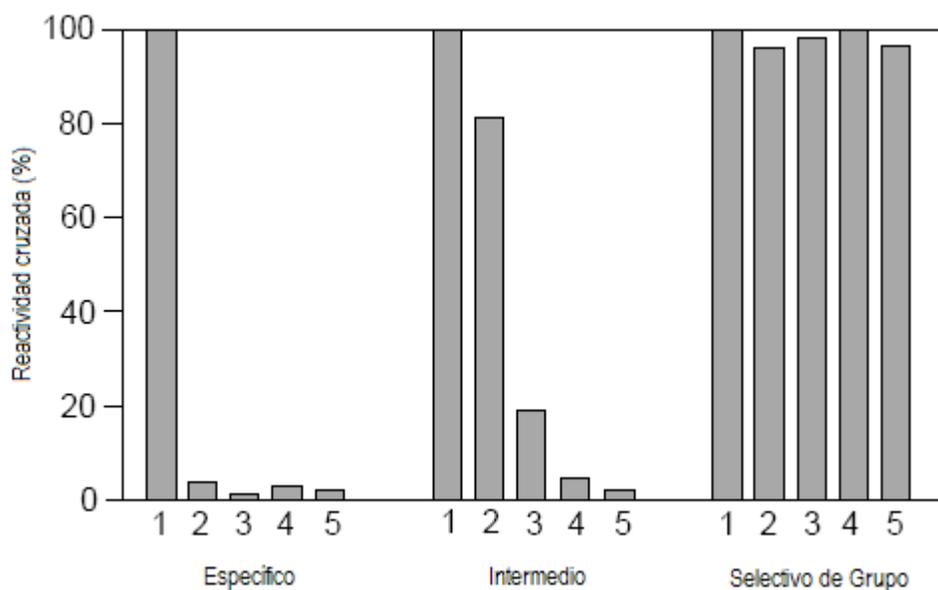


Fig. 3.12 Reactividad cruzada: anticuerpos específicos, intermedios y selectivos de grupo. Los anticuerpos fueron producidos con el hapteno del compuesto 1. Los compuestos 2 a 5 pertenecen a la misma familia química del compuesto 1 (obtenida de la referencia 30)

3.9 Validación ⁶⁰⁻⁶⁷

Una parte muy importante en el desarrollo de métodos analíticos es llevar a cabo su validación, ya que por cuestiones éticas se debe demostrar que el método es capaz de realizar su objetivo, particularmente si los resultados del análisis inciden o están relacionados con la salud pública. Una vez optimizados los métodos, hay una reducción de costos y/o reducción de tiempos que beneficia económicamente a los laboratorios, permitiendo cumplir con los sistemas de calidad de cada firma o laboratorio y con las normas regulatorias que estén involucradas.

La validación de métodos analíticos es el proceso por el cual se demuestra, por estudios de laboratorio y métodos estadísticos, que la capacidad del método satisface los requisitos para las aplicaciones analíticas deseadas. En el anexo III se muestran algunos parámetros de desempeño para la validación de métodos analíticos y se presenta un glosario de definiciones de los términos comúnmente utilizados en la validación de métodos analíticos. Dependiendo de lo que se quiere analizar se requerirá o no evaluar un parámetro particular.

La organización mundial de la salud y algunos grupos de investigación en el área⁵⁸ han establecido criterios de validación (además de los que se han descrito) específicamente para métodos que involucran inmunoensayos. Estos criterios han sido evaluados por la FDA (Administración de Fármacos y Alimentos) de los Estados Unidos para su aplicación a los nuevos métodos desarrollados con base en pruebas ELISA. Los parámetros que se recomiendan para la validación de este tipo de métodos son los siguientes ^{31,68-72}

- Reactividad cruzada con analitos similares
- Reactividad cruzada con analitos diferentes
- Falso negativo / Falso positivo
- Eficiencia en la extracción (para muestras de suelo con pruebas en kits)
- Datos que demuestren el desempeño del método con muestras de matrices ambientales, de acuerdo con los métodos analíticos estándar SW-846 de la Agencia de Protección Ambiental (EPA) de los Estados Unidos.

IV PARTE EXPERIMENTAL

4.1 Equipo

- Cromatógrafo de líquidos. Constituido por: bomba cuaternaria Polymer Laboratories modelo LC-1150, inyector Rheodyne 7125, detector UV de λ variable Spectromonitor 3200 (Thermo Separation Products) e integrador Hewlett-Packard modelo 3396-II.
- Degasificador de fase móvil en línea , Jones Chromatography modelo 7600.
- Potenciómetro (Corning, modelo 220) con electrodo combinado de vidrio calomel (Cole Palmer, modelo 60648).
- Baño de ultrasonido (Sonicor, modelo SC-100)
- Purificador y desionizador de agua nanopure (Barnstead Thermolyne, modelo 04747).
- Balanza analítica (Ohaus), modelo AP210S, capacidad: 210 g con precisión de 0.1 mg.
- Sistema para empacado de columnas a alta presión (Haskel, modelo 29426)
- Montaje para preconcentración de muestra por Extracción en Fase Sólida (EFS) en línea, constituido por: bomba isocrática Eldex modelo SC-100 y válvula de conmutación Rheodyne 7000 de 6 puertos. La precolumna de concentración se coloca entre los puertos 1 y 4; la bomba isocrática para carga de muestra se conecta al puerto 5 y la salida de desechos es por el puerto 6. El acoplamiento con el cromatógrafo de líquidos se realiza a través de los puertos 2 y 3 que se conectan respectivamente con el inyector y la columna analítica. La figura 4.1 muestra un esquema de la válvula de conmutación señalando la dirección de los flujos en sus dos posiciones.
- Montaje para limpieza de muestra por inmunoextracción, constituido por una bomba isocrática Eldex modelo SC-100, que alimenta la muestra y los solventes de lavado y elución, a flujo controlado, al cartucho de inmunoextracción. Para evitar la compactación del biomaterial sol-gel y el consecuente aumento de presión en el cartucho, el flujo se realiza

en forma ascendente. Las soluciones percoladas son transferidas al recipiente colector mediante un tubo de teflón colocado en la parte superior del cartucho; este tubo trabaja por efecto de sifón vaciando el líquido que emerge del empaque, al ajustar apropiadamente las alturas relativas del cartucho y el recipiente.

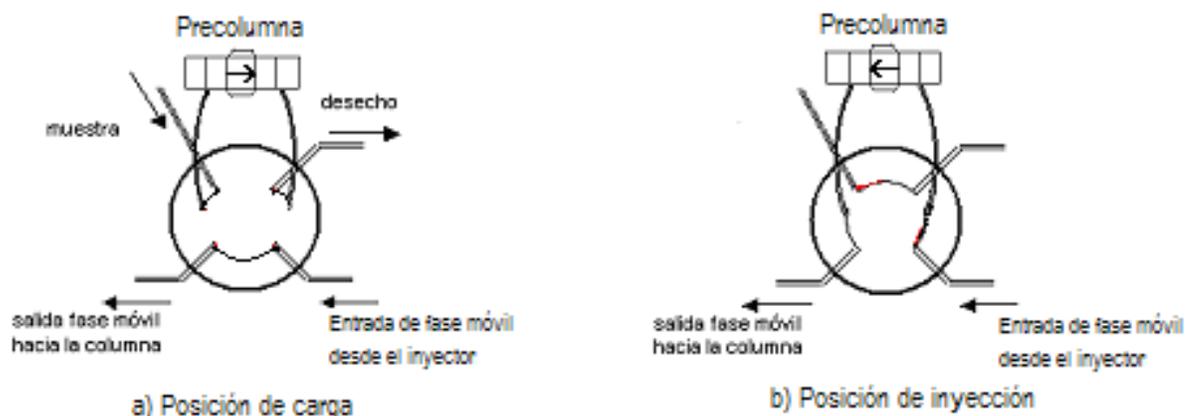


Fig. 4.1 Dirección de los flujos en la válvula de conmutación del sistema de preconcentración en línea.

4.2 Columnas

- Columna analítica: columna (150 x 4.6 mm, d.i.) empacada con fase reversa Hypersil ODS de 5 μm , Thermo-Hypersil-Keystone.
- Precolumna de concentración (20 x 2 mm, d.i.) empacada en el laboratorio con fase reversa polimérica de estireno divinilbenceno PLRP-S de 10 μm (Polymer Laboratories).
- Cartucho de inmunoextracción: jeringa de plástico de 8 mL (10 mm d.i.), empacada con inmunoabsorbente sol-gel. Volumen del lecho húmedo, aproximadamente 3 mL (en presencia de PBS 0.02M).

4.3 Materiales, disolventes, reactivos y disoluciones:

- Filtros de acero inoxidable, 1 cm de diámetro, 1 mm de espesor, 2 μm de diámetro de poro.

-
- Micropipetas de tamaño variable con intervalo de 5-50 μL y 50-200 μL (Scorex, modelo DST-100C).
 - Jeringa de 100 μL para cromatógrafo de líquidos (Hamilton 80665).
 - Tubos Centricon YM-30, Amicon Bioseparations, Millipore.
 - Sistema de filtración de vidrio con capacidad para 250 mL, Millipore, modelo OM027
 - Membranas de nylon, 47 mm de diámetro con poro de 0.45 μm , Chromatography Research Supplies.

 - Metanol grado HPLC, de J.T. Baker.
 - Acetonitrilo grado HPLC, de J.T. Baker.
 - Ácido clorhídrico, grado reactivo, de J.T. Baker.
 - Agua grado reactivo tipo I.

 - Ácido cítrico, grado reactivo, de J.T. Baker.
 - Ácido perclórico 69-72%, de J.T. Baker.
 - Tetraetoxisilano, grado reactivo, de Fluka.
 - Hidróxido de sodio, lentejas, grado reactivo, de J.T. Baker.
 - Fosfato monobásico de sodio, grado reactivo, de J.T. Baker.
 - Fosfato dibásico de sodio dodecahidratado, grado reactivo, de J.T. Baker.
 - Cloruro de potasio, grado reactivo, de J.T. Baker.
 - Cloruro de sodio, grado reactivo, de J.T. Baker.
 - Anticuerpos monoclonales (Mab) anti-carbofurano BFNB-67, adquiridos bajo forma de una suspensión de 1 mg de Mab en 0.5 mL de solución al 50% de saturación con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ($\approx 2 \text{ M}$). Desarrollado y producido por el Dr. Ángel Montoya Viades, de la Universidad Politécnica de Valencia.
 - Carbofurano (2,3-dihidro-2,2-dimetil-7-benzofuranil-N-metilcarbamato) 99% (Chem Service).
 - 7-fenolcarbofurano (2,3-dihidro-2,2-dimetil-7-benzofuranol) 98% (Chem Service)
 - 3-hidroxicarbofurano (2,3-dihidro-2,2-dimetil-3-hidroxi-7-benzofuranil-N-metilcarbamato) 99% (Chem Service).
 - 3-cetocarbofurano (2,3-dihidro-2,2-dimetil-3-oxo-7-benzofuranil-N-metilcarbamato) 99% (Chem Service).
 - 3-ceto-7-fenolcarbofurano (2,3-dihidro-2,2-dimetil-3-oxo-7-benzol) 99% (Chem Service).

 - Buffer salino de fosfatos (PBS 0.2 M). Se preparó mezclando 17.91g de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, 6.06g de NaH_2PO_4 , 1.01g de KCl y 40.03g de NaCl, se diluyó a un volumen de 250 mL con agua pura, finalmente se aforó a 500 mL con agua destilada y desionizada. A partir de este
-

buffer se prepararon soluciones de PBS de menor concentración, según lo requerido en los diferentes experimentos, ajustando el pH a 7 con NaOH en solución saturada. Todas las soluciones de PBS se almacenaron en refrigeración a 4 °C. El buffer concentrado (0.2 M), se renovó al menos cada 4 semanas y los buffers más diluidos se renovaron cada tercer día.

- Soluciones de almacenamiento y estándares de trabajo de los analitos: se prepararon soluciones de 500 mg/L de cada analito en acetonitrilo, pesando la cantidad apropiada y disolviendo en la fase orgánica. Estas soluciones fueron almacenadas en congelación a -20 °C. A partir de las soluciones concentradas se prepararon estándares de trabajo de los analitos solos o en mezcla, en agua-metanol 80:20 (v/v), a concentraciones menores según lo requerido en los experimentos. Los estándares de trabajo se almacenaron en refrigeración a 4°C y se renovaron al menos cada 2 semanas.

4.4 Muestras

Muestras de agua de la presa Tenango (Estado de Puebla), conservadas en refrigeración a 4°C. Las muestras se fortificaron con una cantidad conocida de los compuestos de interés, para desarrollar y optimizar a partir de ellas el método analítico.

4.5 Calibración del rizo inyector.

Para evaluar correctamente la recuperación de los analitos en cada etapa del desarrollo del método, fue necesario calibrar el rizo del inyector. La calibración se realizó mediante una valoración ácido-base.

Se preparó una solución relativamente concentrada de HClO₄ en agua (\approx 0.2 M) y una alícuota de ésta se diluyó y valoró con NaOH 0.1 M, siguiendo el curso de la reacción por potenciometría. En seguida, con el inyector y la válvula de conmutación en la posición de carga (ver Fig. 4.1a), se desconectó la columna analítica y se colocó un vaso de precipitados de 50 mL a la salida del tubo. El rizo del inyector se llenó completamente con la solución de HClO₄. Posteriormente, se rotó el inyector a la posición de inyección y, por medio de agua grado reactivo enviada por la bomba del cromatógrafo, se desalojó el ácido del rizo. El paso de agua a través del rizo se mantuvo hasta recuperar aproximadamente 30 mL en el vaso de precipitados. Esta solución fue valorada con la misma solución de NaOH 0.1 N antes utilizada. La determinación se realizó por triplicado obteniendo un volumen del rizo de $14 \pm 0.5 \mu\text{L}$.

4.6 Condiciones cromatográficas.

La Tabla 4.1 resume las condiciones cromatográficas establecidas para los diferentes estudios realizados a lo largo de este trabajo.

Tabla 4.1 Condiciones para la elución en línea de la precolumna y la determinación de carbofurano y sus metabolitos por CLAR-UV.

CONDICIONES CROMATOGRÁFICAS	
Columna	(150 x 4.6 mm, d.i.) empacada con fase reversa Hypersil ODS de 5 μ m
Flujo	1 mL/min
f.m. (con gradiente)	ACN-H ₂ O (de 7:93 a 43:57, v/v)
f.m. (isocrático)	ACN-H ₂ O (10:90, 15:85, 20:80 y 23:77, v/v)
λ	254nm, 280nm

El gradiente de elución fue diseñado para la separación del carbofurano y sus 4 metabolitos. Los solutos dieron buena respuesta en el detector UV a 280 nm, a excepción del 3 ceto-carbofurano, el cual pudo detectarse con mayor sensibilidad a 254 nm. Esta separación se utilizó durante el estudio de condiciones de carga en la precolumna de fase reversa (sección 4.7).

Para los estudios de reactividad cruzada del inmunoabsorbente (sección 4.10.4) se trabajó con cada analito por separado. En este caso, la determinación del compuesto en cuestión se realizó en condiciones isocráticas, ajustando la composición de la fase móvil para obtener un tiempo de retención entre 10 y 20 minutos.

Las proporciones acetonitrilo-agua de la fase móvil isocrática, marcadas en la Tabla 4.1, corresponden a las condiciones finalmente utilizadas según lo siguiente:

Acetonitrilo-Agua (v/v)	Analito(s)
10:90	3-hidroxicarbofurano
15:85	3-ceto-7-fenolcarbofurano
20:80	3-cetocarbofurano
23:77	Carbofurano y 7-fenolcarbofurano

La cuantificación de los compuestos examinados en los diferentes estudios se realizó por calibración externa, utilizando áreas de pico. En todos los casos, los estándares de comparación fueron inyectados en el sistema acoplado en línea (precolumna PLRP-S / columna analítica), para mantener condiciones similares a las del análisis de las muestras. Estas últimas, fueron primero tratadas en el

cartucho de inmunoextracción, para aislar selectivamente el analito de la matriz; posteriormente el eluato completo de dicho cartucho fue cargado en una precolumna de fase reversa y analizado en línea.

4.7 Determinación del volumen de carga en la precolumna de concentración.

Con el objeto de dar un seguimiento al ó los analitos ensayados durante la caracterización del inmunoabsorbente y el establecimiento del protocolo de inmunoextracción, las soluciones percoladas a través del cartucho fueron posteriormente cargadas en una precolumna de fase reversa para su análisis en línea por CLAR. Por tal motivo, fue necesario estudiar previamente el comportamiento de los analitos en dicha precolumna bajo diferentes condiciones.

Para evaluar la retención de los analitos en la precolumna polimérica, ésta se cargó mediante una bomba auxiliar (Fig. 4.1) con diferentes volúmenes y composiciones de soluciones con carbofurano y sus metabolitos (Tabla 4.2).

Tabla 4.2 Variables analizadas en el estudio de retención del carbofurano y sus metabolitos en precolumnas de fase reversa PLRP-S

Variable	Condición estudiada
Volumen de carga (mL)	5, 10, 25, 50 y 100
% de metanol en la carga	2 y 10
Mezcla de analitos	Cantidad adicionada (ng)
carbofurano	200
3-hidroxicarbofurano	200
7-fenolcarbofurano	200
3-ceto-7-fenolcarbofurano	100
3-cetocarbofurano	600

Primero se realizaron ensayos con soluciones de carga al 2% de metanol en agua pura. Las soluciones fueron preparadas de manera que el volumen cargado (5-100 mL) contuviera siempre la misma cantidad de carbofurano (200 ng) y sus metabolitos: 3-hidroxicarbofurano, 7-fenolcarbofurano (200 ng), 3-ceto-7-fenolcarbofurano (100 ng) y 3-cetocarbofurano (600ng).

Luego se realizaron ensayos aumentando a 10% el contenido de metanol en la solución acuosa y manteniendo el volumen de carga en 50 mL.

Después de cada carga, la precolumna se conectó en línea con la columna analítica (rotando la válvula de conmutación a la posición de inyección) y los solutos retenidos fueron eluidos por un gradiente de fase móvil acetonitrilo-agua, diseñado para obtener una buena resolución de los 5 compuestos y un tiempo de análisis menor a 25 minutos.

Posteriormente se trabajó sólo con el carbofurano, modificando la matriz de la muestra por adición de buffer y variando la cantidad de analito cargada (Tabla 4.3).

Tabla 4.3 Variables analizadas en el estudio de retención del carbofurano en precolumna PLRP-S.

Variable	Condición estudiada
Volumen de carga (mL)	25
Solución de carga (% de metanol)	PBS 0.02 M (2%)
masa de carbofurano adicionada (ng)	100 y 150

Después de cada carga, la precolumna se conectó en línea con la columna analítica (rotando la válvula de conmutación a la posición de inyección) y el soluto retenido fue eluido por una fase móvil isocrática acetonitrilo-agua de composición adecuada para obtener un tiempo de retención menor a 20 minutos

Las áreas de los picos obtenidos en todos los ensayos antes descritos se compararon, para determinar si había fuga de los analitos al modificar alguna de las variables estudiadas.

4.8 Anticuerpo anti-carbofurano

La materia prima para la preparación del inmuoadsorbente que se utilizó en este trabajo con resultados satisfactorios provino del Grupo de Investigación en Inmunotecnología de la Universidad Politécnica de Valencia, España dirigido por el Dr. Angel Montoya Biades. Este grupo ha desarrollado una técnica eficiente para la producción de anticuerpos monoclonales y cuenta con clonas seleccionadas y bien probadas, a partir de las cuales puede generar anticuerpos contra diversos compuestos, garantizando propiedades y actividad reproducible de lote a lote ²¹.

El grupo del Dr. Montoya proporcionó, a manera de prueba, una pequeña cantidad de 4 diferentes anticuerpos monoclonales (Mab) anti-carbofurano. Estos fueron ensayados en un trabajo previo ⁷⁴, eligiendo el anticuerpo codificado como LIB-BFNB-67 por su alta afinidad hacia el analito y porque demostró ser menos frágil que los otros tres Mabs. Cabe mencionar que los ensayos realizados en dicho trabajo, pusieron de manifiesto que la actividad de los anticuerpos monoclonales en el estado libre (en solución) era muy superior a la de cualquier otro anticuerpo policlonal probado con anterioridad para otros pesticidas. Sin embargo, también se detectó la gran fragilidad de los Mabs comparados con los anticuerpos policlonales. En efecto, en los inmuoadsorbentes preparados en trabajos anteriores con anticuerpos policlonales, se había logrado preservar entre el 20 y el 40% de su actividad nativa durante el proceso de encapsulamiento; además, los cartuchos empacados con esos IAs pudieron utilizarse repetidamente en más de 30 ciclos adsorción-desorción, sin pérdida significativa de afinidad por el pesticida correspondiente^{50,51,73}. Por el contrario, los 4 Mabs anti-carbofurano que fueron encapsulados utilizando la misma técnica, sólo preservaron menos del 10% de su actividad nativa. Adicionalmente, durante ensayos preliminares de inmuoextracción se observó que los Mabs no toleraban los eluyentes a base de mezclas acetonitrilo-agua, que se habían podido utilizar sin problemas con anticuerpos policlonales. De hecho, aún con eluyentes más suaves se notó una pérdida de actividad ligera pero progresiva en cada ciclo de adsorción-desorción. El inmuoadsorbente con el Mab LIB-BFNB-67 fue el que mostró menor pérdida de actividad durante esos ensayos.

4.9 Preparación del inmuoadsorbente (IA)

Previo a la preparación del inmuoadsorbente, fue necesario acondicionar el anticuerpo adquirido que se encontraba en forma de un precipitado suspendido en una solución saturada de sal. Dichas condiciones eran necesarias para su preservación durante el transporte desde el lugar de fabricación hasta el laboratorio.

La suspensión con el anticuerpo monoclonal (Mab) se colocó en el compartimiento superior de un tubo Centricon YM-30, añadiendo algunos mililitros de agua pura y centrifugando a 2500 rpm, hasta que la mayor parte del líquido atravesó la membrana del compartimiento pasando a la sección inferior. Dicha membrana tiene poros que permiten el paso de sustancias de tamaño inferior a 30000 Da cuando el tubo es sometido a la fuerza de centrifugación. El percolado se desechó y el retenido, constituido por el anticuerpo (≈ 150000 Da) y sales residuales, se lavó varias veces con agua pura centrifugando cada vez. Finalmente el retenido se suspendió en 1mL de PBS y se transfirió cuidadosamente con una pipeta pasteur a un vial. El Mab en PBS se almacenó en refrigeración a 4°C hasta su uso.

La inmovilización del anticuerpo monoclonal en un soporte de sílice se llevó a cabo por el método sol-gel, utilizando tetraetoxisilano (TEOS) como precursor y catálisis ácida ⁵⁵. El TEOS con un poco de agua y HCl se sometió a ultrasonido en baño de hielo por 30 min., luego se dejó proceder la hidrólisis a temperatura ambiente y bajo agitación hasta obtener una fase (un sol) perfectamente homogénea y ligeramente viscosa. En este punto, el sol fue neutralizado con un buffer salino de fosfatos (PBS) e inmediatamente después se agregó una alícuota de solución del Mab en PBS. La gelificación se produjo en menos de 5 min. El gel obtenido se fragmentó y lavó abundantemente con agua, mezcla metanol-agua y finalmente PBS. El secado del material se realizó a baja temperatura (4°C), cuidando que la evaporación del líquido contenido en los poros fuera muy lenta, y controlando el peso del gel para evitar un secado demasiado extensivo. El xerogel final se molió en mortero y se empacó en una jeringa de plástico, colocando filtros de acero inoxidable en ambos extremos del lecho para retenerlo (ver Fig. 4.2).

4.10 Retención no específica

Antes de evaluar el comportamiento de retención del inmuoadsorbente (IA), fue necesario determinar condiciones apropiadas para evitar la retención no específica del carbofurano en el soporte de sílice. Este estudio se realizó con un gel blanco, es decir, un gel preparado de la misma manera que el IS pero sin adicionar el anticuerpo. El cartucho de gel blanco se cargó con 25 mL de una solución de carbofurano en PBS 0.02M, añadiendo a ésta proporciones crecientes de MeOH (entre 0 y 10% v/v). Posteriormente se realizó la elución con una mezcla agua-acetonitrilo 35:65, v/v, con el objeto de desorber completamente el carbofurano que hubiera quedado retenido durante la carga. Los eluatos de cada ensayo se analizaron por inyección directa en el CLAR-UV.

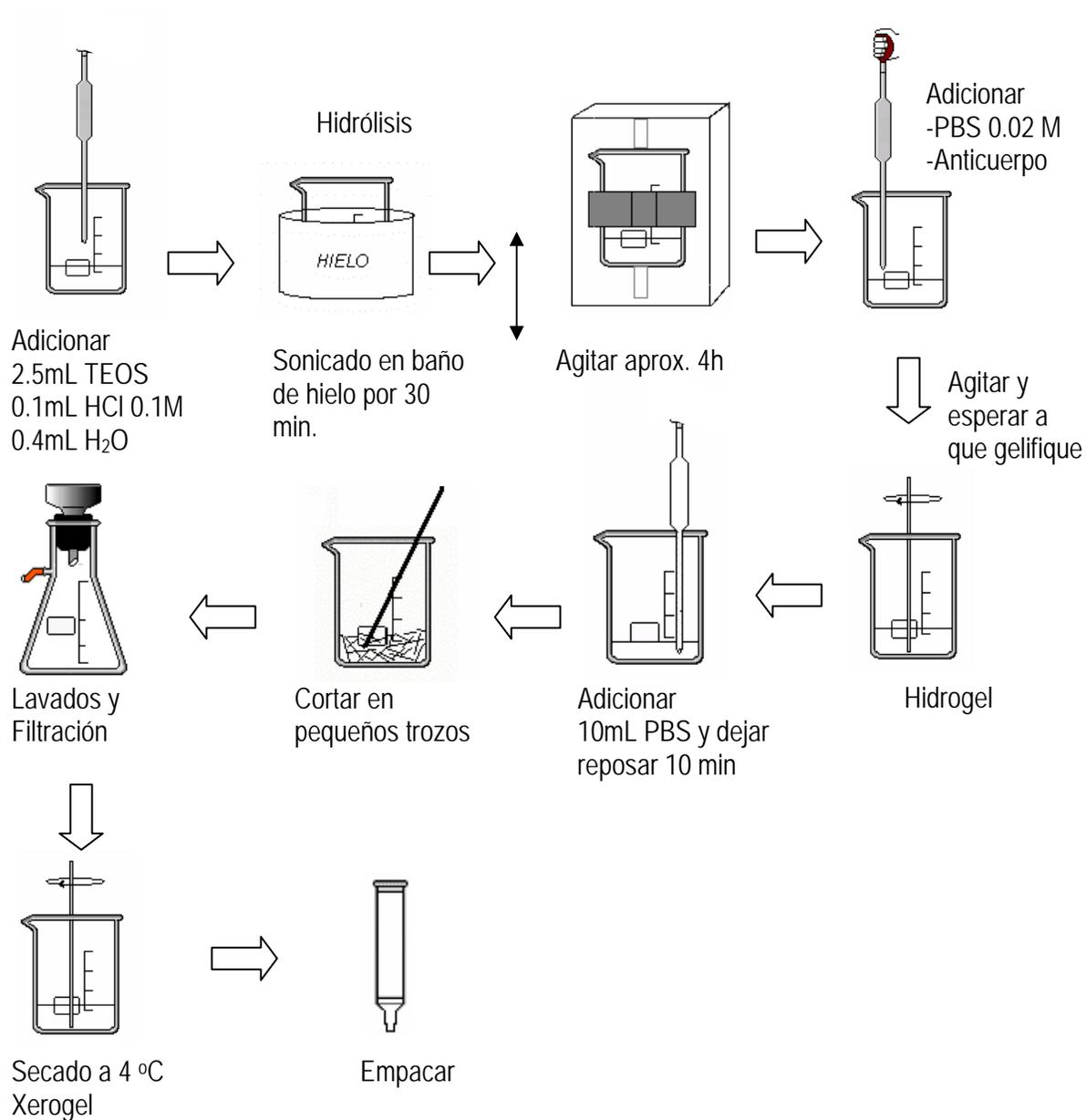


Fig 4.2 Procedimiento para la preparación del inmunoadsorbente (IA)

4.11 Evaluación del inmunoabsorbente (IA)

En la Tabla 4.4 se presenta un resumen de todos los parámetros experimentales que se analizaron, así como sus intervalos de variación, para caracterizar el comportamiento de retención del inmunoabsorbente preparado y para poder establecer las condiciones experimentales definitivas del protocolo de inmunoeextracción.

Primeramente se trabajó sobre la elución del analito-antígeno (es decir el carbofurano) para asegurar que todo el compuesto retenido fuera desorbido cuantitativamente en esta etapa.

Se probaron diferentes composiciones y volúmenes de mezclas: ácido cítrico 0.01M-metanol (diferentes proporciones) y metanol (MeOH)-H₂O (diferentes proporciones). Los efluentes (muestra más lavado) y eluatos del cartucho con IA se cargaron en precolumnas de fase reversa y se analizaron en línea por CLAR-UV. De esta manera fue posible conocer la cantidad de carbofurano retenido en el cartucho (por diferencia entre la cantidad cargada y la cantidad determinada en los efluentes), así como la cantidad que se logró desorber con cada conjunto de condiciones de elución probadas (por medio de la cantidad de analito determinada en los eluatos).

Al finalizar cada ciclo de EFS, el IA se regeneró con 15 mL de buffer salino de fosfatos (PBS) y el cartucho se guardó en refrigeración a 4 °C hasta su siguiente uso.

Una vez determinadas las condiciones óptimas de elución, se procedió a evaluar el comportamiento de retención del IA. Se realizaron diversos experimentos variando diferentes parámetros durante la etapa de carga del cartucho con la solución de analito. Los parámetros analizados fueron: 1) concentración de carbofurano, 2) velocidad de flujo, 3) volumen de solución y 4) carga de otros analitos.

4.11.1 Concentración de carbofurano

Para evaluar la capacidad de enlazamiento del carbofurano por el anticuerpo encapsulado se realizaron ensayos utilizando como solución de carga PBS 0.02 M al 2% de metanol con cantidades variables de carbofurano. El volumen cargado se mantuvo constante y la masa de carbofurano se incrementó progresivamente hasta 300 ng.

4.11.2 Velocidad de flujo

Para evaluar la cinética de formación del complejo se ensayaron diferentes velocidades de flujo durante la carga del cartucho, desde 0.67 hasta 2.88 mL/min, variando la velocidad en el equipo y midiendo el tiempo con un cronómetro.

4.11.3 Volumen de solución

Para evaluar el volumen de fuga del analito se cargaron diferentes volúmenes de solución, desde 25 hasta 200 mL.

4.11.4 Carga de otros analitos (metabolitos del carbofurano)

Se evaluó la reactividad cruzada del anticuerpo realizando la carga de metabolitos del carbofurano: 7-fenolcarbofurano, 3-hidroxicarbofurano, 3-cetocarbofurano, 7-fenol-3-hidroxicarbofurano y 7-fenol-3-cetocarbofurano y de un compuesto de otra familia, el 2,4-diclorofenol.

4.11.5 Estabilidad del inmunoadsorbente (IA)

A lo largo de los estudios antes mencionados se intercalaron de vez en cuando experimentos para determinar capacidad de enlazamiento del anticuerpo con el objeto de evaluar la estabilidad del IA en función del tiempo y el número de ciclos de inmuoextracción realizados en el mismo cartucho.

4.12 Metodología establecida

A partir de los resultados obtenidos en los numerosos experimentos realizados, descritos en las secciones anteriores, se diseñaron las condiciones finales para el análisis del carbofurano. La metodología establecida se describe a continuación y consiste básicamente de dos etapas:

La primera es la etapa de inmuoextracción: la muestra a analizar, previamente preparada para favorecer las interacciones analito-anticuerpo y disminuir la retención no específica de otros compuestos presentes en ella, se percola a través del cartucho de inmuoextracción (IE); el cartucho se lava para eliminar impurezas que hayan podido quedar adsorbidas en el soporte de sílice; finalmente, el carbofurano retenido se eluye con un solvente capaz de disociar el complejo analito-anticuerpo sin provocar un daño irreversible a la biomolécula. En esta etapa se colectan, por una

Tabla 4.4 Parámetros que se variaron para caracterizar el comportamiento de retención del IA y optimizar el protocolo de inmunoeextracción.

Vol.de carga (mL)	Vel. de carga (mL/min)	Elución en el IA (composición de fase % ó v/v)	Vol. de elución (mL)	Analito	Masa adicionada (ng)
25	0.67				50
50	1	Ac. cítrico 0.01M	25 y 50		100
100	1.67			carbofurano	150
150	2.88	Ac. cítrico 0.01M-(% de metanol)			200
200		4	25 y 50		300
		10	15, 25, 35 y 50	3-hidroxicarbofurano	100
		15	25	7-fenolcarbofurano	100
		16	25	3-ceto-7-fenolcarbofurano	100
		20	25	3-cetocarbofurano	100
		24	10	2.4 diclorofenol	101
		32	10		
		40	5		
		52	5		
		60	5		
		64	5		
		H ₂ O-(% de metanol)			
		64	3, 5, 7, 7.5, 8 y 15		
		76	3		

parte, los efluentes del cartucho durante la carga de muestra y el lavado, y por otra parte, el eluato que contiene al carbofurano que fue extraído. Estas dos fracciones son posteriormente analizadas con el objeto, en el caso de los efluentes, de dar un seguimiento lo más completo posible al proceso.

La segunda es la etapa de concentración y análisis en línea: la fracción colectada (previamente diluida con agua en el caso del eluato) se carga en una precolumna de fase reversa; la precolumna se coloca en una válvula de conmutación insertada entre el inyector del CLAR y la columna analítica;

mediante la rotación de la válvula, los compuestos retenidos en la precolumna son transferidos por la fase móvil hacia la columna para su separación y análisis.

Las condiciones experimentales empleadas en estas 2 etapas se detallan a continuación.

-Inmunoextracción:

- 1) Acondicionamiento del cartucho de inmunoextracción: 10 mL de PBS 0.02 M
- 2) Carga: Un volumen conocido de la muestra de agua a analizar se filtra a través de una membrana de nylon 66 con poro de 0.45 micras para eliminar sólidos suspendidos, luego se le adiciona una alícuota de PBS concentrado y una alícuota de metanol (MeOH) de manera que se obtenga una concentración 0.02 M del buffer y un contenido de 2% (v/v) del disolvente orgánico.
- 3) Lavado: 5 mL de mezcla PBS 0.02M-MeOH 96:4 (v/v)
- 4) Elución: 8 mL de mezcla MeOH-agua 64:36 (v/v)
- 5) Reacondicionamiento del cartucho: 15 mL de agua (destilada y desionizada) y 15 mL de PBS 0.02M, almacenar en el refrigerador a 4°C al menos 2 horas.

-Concentración y análisis en Línea:

- a) Carga en precolumna y lavado. Con el objeto de alcanzar una máxima sensibilidad en la determinación del carbofurano (Cb), el eluato completo obtenido se diluye a 50 mL con agua pura y se carga en la precolumna (20 x 2 mm, d.i., empacada con fase reversa polimérica PLRP-S), después ésta se lava con 5 mL de agua pura.
- b) Acondicionamiento de la columna analítica. Mientras se realizan las operaciones anteriores en una sección del circuito en línea ocupando la bomba isocrática auxiliar, en la otra parte del circuito se acondiciona la columna analítica (150 x 4.6 mm d.i.), empacada con fase reversa Hypersil ODS de 5 μ m, con la fase móvil (ACN-H₂O 23:77, v/v) enviada por la bomba del cromatógrafo a flujo de 1 mL/min (ver Fig.4.1a).
- c) Elución y análisis. Una vez terminadas las operaciones simultáneas (a) y (b), la válvula de conmutación se rota y el analito es eluido de la precolumna por la fase móvil (ver Fig. 4.1b), transferido a la columna para su separación y finalmente al detector UV (λ =280nm) para su determinación y cuantificación. Inmediatamente después del análisis del carbofurano presente en el eluato de inmunoextracción, se inyecta un estándar de carbofurano en el sistema acoplado precolumna-columna como referencia. Las áreas de los picos del carbofurano en la muestra analizada y en el estándar se comparan para realizar la cuantificación del analito (estandarización externa).

- d) Lavado del sistema de concentración y análisis. Al terminar el análisis de una muestra, la válvula de conmutación se rota a la posición de carga, y mediante la bomba auxiliar y la bomba del cromatógrafo se hace pasar acetonitrilo puro (10 a 15 mL) por la precolumna y columna, respectivamente. Posteriormente, la precolumna se acondiciona con 15 a 20 mL de agua pura (bomba auxiliar, válvula en posición de carga), quedando así todo el sistema listo para el siguiente ciclo de análisis. El flujo se hace pasar a 1 mL/min.

4.13 Aplicación a una muestra real

El método se aplicó a una muestra real; agua proveniente de la presa Tenango en el Estado de Puebla. En un frasco de vidrio ámbar, perfectamente lavado y seco, se colectaron aproximadamente 4L de agua. Al llegar al laboratorio, se estimó el volumen de muestra por comparación con un frasco idéntico al que se le fueron agregando volúmenes conocidos de agua hasta alcanzar el mismo nivel. Con este dato se calculó el volumen de metanol que debía añadirse a la muestra para tener un contenido de $\approx 2\%$ de disolvente orgánico. El metanol se añadió en el mismo frasco ámbar que contenía al agua de presa y la mezcla se homogenizó por agitación. Posteriormente, la muestra fue filtrada a través de una membrana de nylon 66 con poro de 0.45 μm . El filtrado se repartió en varios matraces aforados y éstos se guardaron en refrigeración a 4°C.

Cabe señalar que también se verificó el volumen de muestra original con el propio frasco de muestreo, en el cual se había marcado el nivel del líquido antes de realizar cualquier operación. Con la adición de metanol a la muestra original se buscó evitar pérdidas del analito (en caso de que estuviera presente) por adsorción en las paredes del frasco de muestreo o en la membrana de filtración. Además el metanol evita la descomposición de la muestra durante su almacenamiento.

A un volumen de 50 mL de la muestra se le añadió un alícuota apropiada de PBS concentrado para tener una concentración 0.02M del buffer. Esta muestra se analizó de acuerdo con el método desarrollado.

V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Preparación del inmuoadsorbente (IA) por la técnica sol-gel.

Una de las partes sustanciales del presente trabajo fue modificar y ajustar la técnica sol-gel que se utilizaba anteriormente para adaptarla al encapsulamiento de una biomolécula más frágil, el Mab LIB-BFNB-67.

Las modificaciones realizadas a la técnica sol-gel desarrollada en trabajos previos utilizando TEOS como precursor y catálisis ácida ^{74,76} se enlistan a continuación y se justifican posteriormente:

1. Incremento en el grado de hidrólisis del precursor (TEOS) previo a la incorporación del anticuerpo al sol. Para lograr este propósito, después del sonicado de la mezcla de reacción inicial (precursor + catalizador + agua), el sol se sometió a agitación continua y controlada durante varias horas (ver como referencia la Fig. 4.2).
2. Modificación de las condiciones de lavado del material obtenido después de la gelificación. El hidrogel fragmentado se lavó con 25 mL de los solventes siguientes en el orden indicado: agua, metanol-agua 50:50 (v/v), solución acuosa de glicerol al 5%, PBS 0.02M. Al terminar el último lavado, el material se dejó durante 10 min en el aparato de filtración al vacío antes de pesarlo.
3. Prolongación del tiempo de secado del gel y control de la uniformidad de secado de las partículas, sin alterar el grado de pérdida de humedad. Para ello, el hidrogel se colocó en un vaso de precipitados perfectamente cubierto con una tela de malla abierta doblada y se dejó en refrigeración a 4°C para hacer más lenta la disipación de humedad. Diariamente se revolvieron los fragmentos del gel con una espátula para evitar un mayor secado de las partículas que quedaban en la capa superficial.

La experiencia adquirida en el encapsulamiento de biomoléculas por sol-gel, ha mostrado que los 3 puntos anteriores son críticos para la preservación de actividad.

La hidrólisis del precursor debe ser lo más completa posible puesto que el TEOS y las especies de éste parcialmente hidrolizadas son sumamente nocivas para las biomoléculas ⁷⁵. Aunque en presencia de un catalizador ácido se favorecen las reacciones de hidrólisis, se ha demostrado que una fracción del TEOS y sus especies parcialmente hidrolizadas persiste en el sol aún después de varias horas de reacción ⁷⁶.

Por otra parte, aún cuando las reacciones de hidrólisis iniciales generan un poco de etanol, que actúa como cosolvente, éste no es suficiente para lograr homogenizar perfectamente a la mezcla. La persistencia de dos fases hace muy lento el proceso de hidrólisis por lo que se requiere de agitación para favorecer el contacto más íntimo entre la fase TEOS y la fase ácida. Sin embargo, una agitación muy fuerte puede dar lugar a la formación de núcleos de condensación cerca de las paredes del recipiente, resultando en una gelificación temprana y no homogénea; por el contrario una agitación muy suave prolonga excesivamente el tiempo requerido para la hidrólisis.

Para optimizar las condiciones de agitación del sol durante la etapa de hidrólisis se optó por utilizar un agitador mecánico tipo Burrell con brazos laterales, de modo a mantener una agitación continua y controlada. Se prepararon numerosos geles blanco (es decir no dopados con anticuerpo), variando la velocidad de agitación y la distancia del recipiente con respecto al centro del agitador, ya que la posición en el brazo determina la amplitud de la oscilación. Finalmente se establecieron las siguientes condiciones:

- Velocidad de agitación moderada (posición 2 del agitador mecánico).
- Recipiente colocado a 50 cm del centro del agitador.
- Tiempo de agitación aproximadamente 3.5 h. Se determina por la apariencia del sol; éste debe ser perfectamente transparente y homogéneo, con una consistencia ligeramente viscosa y elástica, y no debe percibirse el olor característico del TEOS.

Bajo estas condiciones, el sol gelifica en menos de 5 minutos cuando se le añade una alícuota de PBS 0.1 M, pH 7. La gelificación debe ser homogénea e instantánea; es decir, no parte de un punto específico y se propaga, sino que al mismo tiempo toda la solución se transforma en gel. En ocasiones, cuando se prepara un material dopado, se observa la aparición de pequeños puntos blancos en el interior del gel recién formado. Esto es un mal signo pues significa que el anticuerpo no quedó bien encapsulado en los poros del gel y probablemente se desnaturalizó. Hemos comprobado que esos geles no muestran prácticamente ninguna afinidad por el analito-antígeno en ensayos de inmunoextracción. Aunque no se sabe exactamente la razón de este comportamiento, pues no pueden hacerse pruebas de ensayo y error con una materia prima tan costosa, se sospecha que en dichos casos el sol estaba demasiado avanzado y la gelificación era inminente al momento de añadir la solución de anticuerpo.

Una vez que se forma el gel, es necesario desalojar rápidamente el etanol y posibles residuos del TEOS, que se encuentran mezclados con PBS en los poros del hidrogel. Para eliminar completamente los residuos de alcoxilano se requiere incluir un lavado con una mezcla que contenga un disolvente orgánico polar. Dada la sensibilidad de los Mabs al acetonitrilo, se optó por utilizar sólo mezclas metanol-agua. Asimismo, se incluyó un lavado con solución acuosa de glicerol, por ser este compuesto muy compatible con las biomoléculas a las que, aparentemente, ayuda a

mantener en su configuración plegada. Finalmente, se hizo un lavado con PBS para dejar en los poros un ambiente salino y un pH cercano al fisiológico.

Después de los lavados bajo vacío, el hidrogel se pesó para tener una referencia antes de someterlo a secado. El peso de los geles preparados según el procedimiento descrito osciló entre 3.6 y 3.9 gramos. Un peso menor a lo indicado significa que la etapa de hidrólisis fue muy incompleta y una fracción importante de TEOS quedó sin reaccionar. Independientemente de la disminución en la masa de material obtenido, que no es de importancia en este trabajo, el problema real de una hidrólisis incompleta es el nefasto efecto del TEOS sobre el anticuerpo, como ya se ha mencionado.

Durante la etapa de secado lento, el gel madura consolidándose el esqueleto de la estructura tridimensional. El líquido contenido en los poros es expulsado produciendo encogimiento y densificación del material. Sin embargo, la expulsión de un líquido como el agua ejerce una gran presión sobre las paredes de los poros y canales de interconexión por su alta tensión superficial; las partes más frágiles son destruidas y la estructura porosa es alterada produciendo el colapso de los poros y un excesivo encogimiento del material ⁷⁷. Estos fenómenos pueden dañar seriamente a los anticuerpos encapsulados por lo que deben ser restringidos y controlados. Es sabido que un procedimiento adecuado de preparación de los geles desde sus primeras etapas conduce a la formación de un material con una estructura más fuerte ^{77,78}. Este aspecto ya fue optimizado en los trabajos anteriores del grupo de investigación, estableciendo además que el secado no debe ser mayor a la pérdida del 50% del peso del hidrogel inicial. En este trabajo se procuró hacer aún más lento el secado para preservar en mayor medida la estructura porosa y con ello la integridad de los anticuerpos atrapados en esos poros.

Por ello, el recipiente con el gel fragmentado no se dejó abierto durante el secado, sino que se cubrió con una tela permeable que hizo más lenta la disipación de humedad. En estas condiciones, y cuidando que el recipiente se mantuviera a temperatura constante de 4°C, la pérdida de 50% de peso del gel se alcanzó en 6-7 días. Con respecto a la técnica antes usada, donde el recipiente se dejaba abierto, se logró aumentar el tiempo de secado en aproximadamente 2 días, para el mismo grado de pérdida de humedad.

La optimización de condiciones para el encapsulamiento sol-gel del anticuerpo BFNB-67 resultó muy exitosa. Con respecto a la técnica anterior probada para el mismo anticuerpo ⁷⁴, la capacidad de retención del carbofurano por el biogel aumentó considerablemente como se muestra en la Tabla 5.1. Cabe hacer notar que en ambos casos la capacidad de retención se refiere a los primeros ensayos realizados con las columnas de inmunoadsorbente, es decir cuando dichas columnas habían sido utilizadas en, al máximo, cuatro ciclos adsorción-desorción. Por lo tanto, la Tabla 5.1 compara exclusivamente la persistencia de actividad del anticuerpo en función de las condiciones utilizadas durante el encapsulamiento.

Tabla 5.1 Efecto de las condiciones experimentales del proceso sol-gel sobre la actividad del anticuerpo BFNB-67 encapsulado.

Condiciones	Capacidad máxima (ng de analito/mg de MAb)
Técnica anterior	36.5
Técnica optimizada*	566

* hidrólisis más completa del precursor, soluciones de lavado menos agresivas, secado del gel más lento.

5.2 Condiciones de análisis

Antes de proceder con el estudio de condiciones de inmuoextracción y la evaluación del inmunoadsorbente, fue necesario poner a punto las condiciones para el análisis cromatográfico de los eluatos provenientes del cartucho de inmuoextracción. En este inciso se describen brevemente los resultados de las pruebas realizadas.

Para alcanzar una buena sensibilidad en la determinación del carbofurano se consideró indispensable reconcentrar el eluato proveniente del cartucho de inmuoextracción previo a su análisis cromatográfico. En efecto, dada la fragilidad de los Mabs no era factible utilizar un solvente muy fuerte para desorber el analito en un volumen pequeño. Por otra parte, el uso de solventes o soluciones más suaves, implicaría forzosamente la necesidad de utilizar un volumen de elución mayor para recuperar cuantitativamente al compuesto de interés, con la consiguiente dilución.

De acuerdo con la literatura ^{79,80}, el carbofurano es fuertemente retenido en adsorbentes de fase reversa polimérica (p.ej. PLPR-S) a partir de soluciones acuosas. El volumen de muestra que puede percolarse en precolumnas empacadas con este adsorbente, sin que se produzca fuga del analito, depende del tamaño de la precolumna (cantidad de adsorbente) y de la composición de la fase acuosa. En los sistemas en línea, las precolumnas deben ser de muy pequeñas dimensiones para evitar un excesivo ensanchamiento de la banda del soluto que se transfiere a la columna analítica. Adicionalmente, si la columna analítica está empacada con un adsorbente más débil que el de la precolumna, como es el caso de la fase reversa C-18, se recomienda utilizar fases móviles acetonitrilo-agua para obtener picos más delgados y simétricos, especialmente cuando se trabaja en condiciones isocráticas ⁷⁹.

Considerando estos antecedentes, se hicieron pruebas de recobro del carbofurano y sus metabolitos utilizando una precolumna PLRP-S (20 x 2 mm, d.i.) acoplada en línea con una columna de fase reversa C-18. La precolumna se cargó con volúmenes crecientes (5 a 100 mL) de muestras sintéticas dopadas con los analitos de interés, manteniendo constante la cantidad cargada en cada ensayo (es decir disminuyendo la concentración a medida que aumentaba el volumen). Después de cada carga la precolumna se eluyó en línea con la columna analítica mediante un gradiente de elución acetonitrilo-agua. Las muestras sintéticas estuvieron constituidas por agua grado reactivo con un contenido de 2% de metanol.

La comparación de las áreas de los picos entre las diferentes pruebas permite determinar, para cada analito y cada composición de la muestra, el máximo volumen que puede cargarse en la precolumna para obtener un recobro cuantitativo del soluto en cuestión. Esta es una manera práctica y relativamente rápida para evaluar el volumen de fuga (o punto de ruptura) de los analitos en la precolumna. En la Tabla 5.2 se presentan los resultados de recobro relativo en función del volumen cargado para la mezcla de carbofurano y sus metabolitos en muestras de agua con un contenido de 2% de metanol. Los resultados se expresan con respecto a las áreas de pico obtenidas para un volumen de carga de 5 mL, condición en la cual se asume que no existe fuga de ninguno de los compuestos. La cantidad cargada (constante) de cada compuesto en los ensayos realizados fue indicada en la parte experimental (Tabla 4.2).

Tabla 5.2 Recobro relativo de carbofurano y sus metabolitos en función del volumen de muestra cargado en la precolumna PLRP-S. Muestras: agua con 2% de metanol. Análisis en línea con gradiente de elución acetonitrilo-agua. (ver Tabla 4.1).

Analito	Volumen de carga (mL)				Recobro promedio (%)	RSD (%)
	5	10	25	100		
3-hidroxicarbofurano	100%	90.6%	103%	103%	99.2	5.9
3-ceto-7-fenolcarbofurano	100%	93.3%	111%	106%	102	7.5
3-cetocarbofurano	100%	80.5%	88.2%	94.8%	90.8	9.3
7-fenolcarbofurano	100%	110%	121%	91.2%	106	12.1
carbofurano	100%	93.4%	101%	92.2%	96.6	4.6

Como puede observarse en la Tabla 5.2, aunque los resultados presentan cierta variabilidad, ésta es aleatoria y puede atribuirse al error experimental. Por lo tanto, puede concluirse que el volumen de fuga de los 5 analitos en la precolumna PLRP-S, bajo las condiciones ensayadas (muestras acuosas con 2% de metanol), es superior a los 100 mL. A modo de ilustración, en la Fig. 5.1 se muestra uno de los cromatogramas obtenidos en estos ensayos.

En la Tabla 5.3 se reporta el recobro relativo obtenido al aumentar el contenido de disolvente orgánico en la muestra acuosa hasta 10%, para un volumen de 50 mL cargados en la precolumna. Como referencia se utiliza la misma condición que en los ensayos precedentes, es decir carga de 5 mL de muestra con 2% de metanol. La cantidad de cada analito en la muestra cargada se mantuvo constante (Tabla 4.2).

Tabla 5.3 Recobro relativo de carbofurano y sus metabolitos para un volumen de muestra de 50 mL con 10% de metanol. Otras condiciones como en la Tabla 5.2

Analito	Recobro relativo (%)
3-hidroxicarbofurano	79
3-ceto-7-fenolcarbofurano	109
3-cetocarbofurano	99.4
7-fenolcarbofurano	94.3
carbofurano	92.1

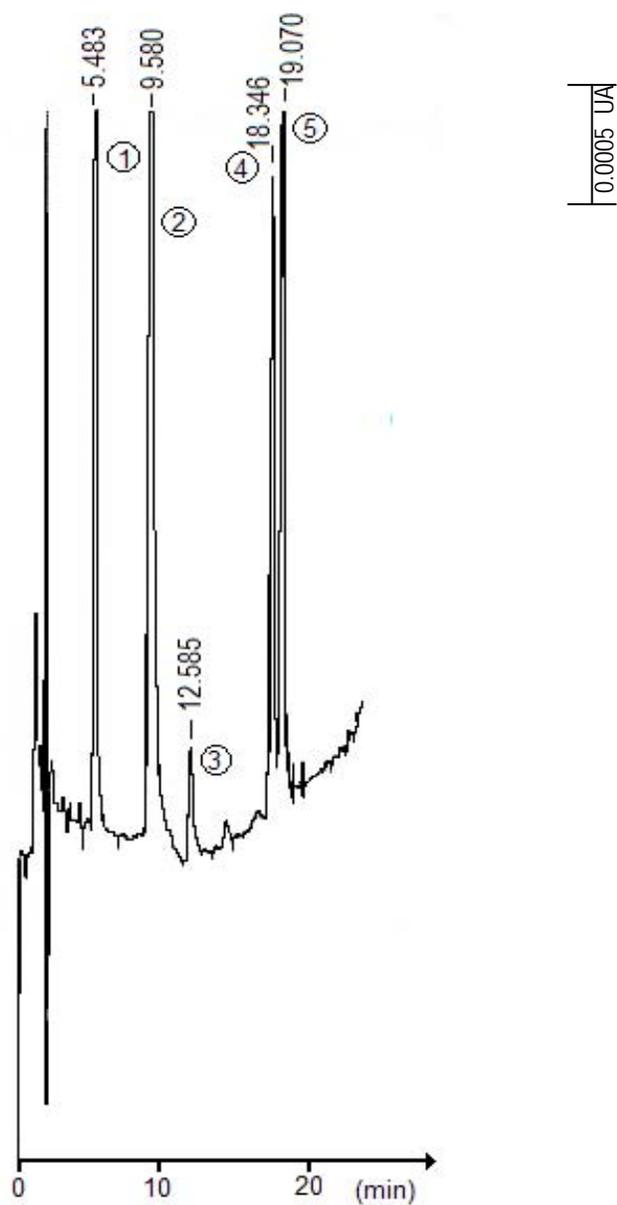


Fig 5.1 Cromatograma obtenido en el análisis de una muestra sintética. Preconcentración de 100 mL al 2% de metanol en precolumna PLRP-S. Análisis en línea con columna de fase reversa C-18, detección UV a 280 nm. Solutos: 1) 3-hidroxicarbofurano, 2) 3-ceto-7-fenolcarbofurano, 3) 3-cetocarbofurano, 4) 7-fenolcarbofurano, 5) carbofurano.

De acuerdo con estos resultados, y tomando en cuenta la variabilidad debida al error experimental (reportada en la Tabla 5.2), se concluye que el volumen de fuga del 3-hidroxicarbofurano es menor a 50 mL cuando la muestra acuosa contiene 10% de metanol. Aparentemente el carbofurano y los otros 3 metabolitos tienen un volumen de fuga superior a 50 mL bajo estas condiciones ya que el recobro medido no es significativamente diferente del valor promedio mostrado en la Tabla 5.2.

Finalmente, debido a que en los experimentos de inmunoextracción es necesario trabajar en un medio salino amortiguado a pH=7, se realizaron unos ensayos con el carbofurano para verificar si la presencia del buffer en la muestra tenía algún efecto en la determinación del pesticida. En la Tabla 5.4 se muestran los resultados obtenidos en la preconcentración y análisis de dos muestras de carbofurano en PBS 0.02 M con 2% de metanol. En estos ensayos se cargaron en la precolumna diferentes masas de carbofurano en 25 mL de muestra. El recobro (absoluto) del compuesto de interés se determinó por estandarización externa. La cantidad de carbofurano inyectado como referencia se calculó a partir de la concentración del estándar y el volumen del rizo del inyector (calibrado previamente).

Tabla 5.4 Recobro absoluto de carbofurano en presencia de PBS 0.02 M (pH 7) en la muestra analizada (con 2% de metanol). Volumen cargado en la precolumna: 25 mL.

Masa de carbofurano (ng)	% de recobro
100	99.2
150	101

Como puede observarse, la adición de sales a la muestra no afectó el recobro del analito. Es sabido que la presencia de sales a alta concentración en las muestras acuosas tiene más bien un efecto favorable sobre la retención de los compuestos en adsorbentes de fase reversa, puesto que aumenta los efectos hidrofóbicos. Este fenómeno es conocido como "efecto salino" (salting out, en inglés), pero generalmente se presenta para concentraciones de sales mucho más altas que la utilizada en estos ensayos. Sin embargo, cuando se realiza una preconcentración de la muestra, también se concentran las impurezas presentes en cualquier reactivo que se le haya adicionado. Durante el análisis en línea, estas impurezas ya concentradas eluyen del sistema y pueden interferir seriamente con el pico del compuesto de interés. Por otra parte, se ha visto (en trabajos anteriores del grupo de investigación) que la adición de sales de fosfato a las muestras, generalmente provoca un aumento considerable del "pico de matriz" en los sistemas de preconcentración y análisis en línea. Este pico es una señal que aparece al inicio del cromatograma y se caracteriza por descender

muy lentamente a la línea base, por lo que puede afectar la detección y cuantificación de los analitos que eluyen en tiempos de retención cortos.

Por todas las razones anteriores era necesario verificar que el PBS añadido a la muestra no provocaría efectos indeseables. Cabe señalar que la fase móvil se ajustó para que el tiempo de retención del carbofurano no fuera muy corto ni muy largo. Una retención entre 10 y 20 min es adecuada para evitar la interferencia del pico de matriz o la pérdida de sensibilidad por ensanchamiento excesivo del pico del analito, cuando se trabaja en condiciones isocráticas.

5.3 Establecimiento del protocolo de inmunoextracción

Los geles preparados y secados como se indicó en la sección 5.1, fueron molidos finamente en un mortero y empacados en cartuchos de plástico (jeringas de 8 mL x 1 cm d.i.); el volumen de lecho empacado fue de aproximadamente 3 mL (base húmeda). Se trabajó no sólo con inmunoadsorbentes sino también con geles blanco que sirvieron como referencia en algunos ensayos. La dirección del flujo en estos cartuchos fue siempre de abajo hacia arriba para evitar la compactación del empaque y el consecuente aumento de presión.

El proceso de inmunoextracción se realizó fuera de línea, para evitar someter al anticuerpo a altas presiones y porque esta modalidad permite mayor flexibilidad en cuanto a la selección de las condiciones de elución. Además, el soporte de gel de sílice es relativamente frágil desde el punto de vista de sus propiedades mecánicas, pues no fue consolidado a alta temperatura porque la molécula dopante no lo permitía. En la literatura se ha reportado el uso de inmunoadsorbentes en procesos en línea; sin embargo, esos inmunoadsorbentes habían sido preparados por anclaje químico de la biomolécula en un soporte de sílice previamente consolidado^{40,41,46,48,49}. Cichna et al.⁸¹ propusieron un montaje para trabajar en línea con un inmunoadsorbente sol-gel dopado con anticuerpos contra pireno. El método consiste básicamente de dos pasos de transferencia: en el primero la precolumna de inmunoadsorción es eluida en línea con una precolumna de fase reversa que atrapa al analito; en el segundo paso, la precolumna de fase reversa se conecta en línea con la columna analítica para la separación y determinación final del compuesto de interés. Esta propuesta aunque novedosa es relativamente compleja de operar y no evita que el anticuerpo sea sometido a altas presiones durante el acoplamiento en línea de las dos precolumnas. De hecho, los autores mencionan que después de 15 ciclos, la presión aumentó al doble, indicando una modificación o compresión del lecho empacado en la precolumna con el inmunoadsorbente sol-gel.

El interés de los sistemas en línea radica en que todo el compuesto extraído de la muestra es posteriormente transferido a la columna cromatográfica para su separación y análisis. Por lo tanto, se alcanzan muy altas sensibilidades y mayor precisión y exactitud ya que la manipulación de la

muestra es mínima. No obstante, la experiencia ha demostrado que el acoplamiento en línea de dos adsorbentes muy diferentes puede provocar un fuerte ensachamiento o una total deformación de los picos cromatográficos. Para evitarlo, es necesario trabajar con una fase móvil que sea relativamente fuerte con respecto a la fase estacionaria de la columna analítica (generalmente una fase reversa C-18). Otra opción es trabajar con gradiente de elución.

Nuestra percepción es que ninguna de las alternativas mencionadas es viable cuando la precolumna de EFS está empacada con un inmunoadsorbente y se desea prolongar la vida útil de éste lo más posible. Como ya se ha discutido en una sección anterior, los anticuerpos monoclonales anti-carbofurano son excesivamente sensibles y se desnaturalizan fácilmente al ser sometidos a condiciones agresivas, aún estando encapsulados. Por ello, no se intentó desarrollar un sistema en línea involucrando al inmunoadsorbente, pero todo el eluato obtenido de éste se diluyó y cargó en una precolumna de fase reversa, la cual sí se acopló en línea con la columna analítica (tal como se detalló en la sección 5.2)

5.3.1 Condiciones para minimizar la adsorción no específica

En este trabajo se llama adsorción específica a la interacción del analito con los sitios activos del anticuerpo. Por el contrario, adsorción no específica se refiere a la interacción de cualquier componente de la muestra, incluyendo al analito, con otras partes del sistema, tales como el soporte de sílice, las paredes internas del cartucho y hasta la propia molécula de anticuerpo en regiones que no sean el sitio activo. La adsorción no específica es indeseable porque se contrapone a la selectividad propia del inmunoadsorbente.

Las muestras que se tratan por inmunoextracción están constituidas por una matriz fundamentalmente acuosa. Por ello, las interacciones no específicas son generalmente interacciones basadas en la hidrofobicidad de los componentes de la muestra o bien interacciones iónicas con los silanoles de superficie del soporte. Las primeras se reducen añadiendo pequeñas cantidades de un disolvente orgánico a la muestra acuosa. Las segundas se evitan trabajando en condiciones ácidas para suprimir la ionización de los silanoles; alternatively, es posible debilitar las interacciones iónicas añadiendo sales a la fase acuosa para generar un efecto de competencia.

Para estudiar la posible interacción del carbofurano con el soporte de sílice o las paredes del cartucho se trabajó inicialmente con un cartucho de gel blanco. Las muestras de prueba fueron soluciones acuosas de PBS 0.02 M con 0-10% de metanol. Una vez cargada la muestra (25 mL), el compuesto eventualmente retenido se eluyó con 2 mL de un solvente fuerte (acetónitrilo-agua 65:35, v/v) y el eluato se inyectó al cromatógrafo para verificar si el analito había sido o no retenido.

Estas pruebas mostraron que se requería un contenido de metanol de al menos 4% en la muestra acuosa cargada para evitar totalmente la retención del carbofurano en el cartucho con gel blanco. Esta condición se ensayó posteriormente con el inmunoadsorbente, pero se observó una disminución en la retención del carbofurano en comparación con lo que se retenía en ausencia de metanol. Se redujo entonces la proporción de disolvente orgánico a 2% en la solución de carga, comprobando que con esta nueva condición no se afectaba la interacción del analito con el anticuerpo. Sin embargo, era todavía necesario eliminar la adsorción no específica residual.

En trabajos anteriores se había observado que algunos anticuerpos (p.ej. antimalarión) requieren condiciones muy suaves durante la carga para poder formar el complejo con su respectivo antígeno. Una vez que el pesticida (malatión) se había acomodado bien en el sitio activo del anticuerpo, era posible percolar soluciones con un mayor contenido de disolvente orgánico sin provocar la disociación del complejo ⁵¹.

Con base en esas observaciones se optó por tratar de eliminar la retención no específica durante la etapa de lavado. Se ensayaron lavados del inmunoadsorbente con 5 mL de mezcla PBS-metanol desde 2 hasta 5% (v/v) del alcohol. En ninguno de los ensayos se percibió pérdida de analito durante esta etapa.

Finalmente, las condiciones de carga y lavado establecidas fueron:

- Carga : solución acuosa de PBS 0.02 M con no más de 2% (v/v) de metanol.
- Lavado : 5 mL de PBS-metanol 96:4 (v/v)

La etapa de lavado es muy importante cuando se trabaja con muestras reales que contienen muchos compuestos además del analito de interés. Con la condición de lavado establecida se asegura la eliminación de interacciones no específicas para todo compuesto con características de hidrofobicidad semejantes o aún ligeramente mayores que las del carbofurano.

5.3.2 Optimización de la elución

La elución es probablemente el punto más delicado en un proceso de inmunoextracción. En efecto, se requiere que el disolvente usado sea suficientemente fuerte para disociar completamente al complejo MAb-analito, pero no tan fuerte que dañe irreversiblemente al anticuerpo. Dado que la interacción antígeno-anticuerpo es muy fuerte (se han reportado constantes de formación del orden de 10^{10} o mayores, en solución)⁷⁵, la única manera de disociar el complejo es provocando un cambio en la estructura terciaria de la biomolécula, pero dicho cambio debe ser sólo temporal.

Considerando la experiencia previa con los anticuerpos monoclonales, se decidió empezar probando eluyentes muy suaves. En la literatura se ha reportado el uso de buffers ácidos para eluir atrazina de un inmunoabsorbente con anticuerpos monoclonales anti-atrazina ⁵². De manera similar, en este trabajo se ensayaron soluciones de ácido cítrico 0.01 M (pH 2.1) con metanol al 10%, variando el volumen de eluyente desde 15 hasta 50 mL. El analito sólo pudo ser recuperado cuantitativamente (con el mayor volumen de elución) cuando la actividad del anticuerpo había decaído por el uso repetido del cartucho en múltiples ciclos adsorción-desorción. Al ensayar la misma condición con un cartucho de inmunoeextracción recientemente preparado, la recuperación de carbofurano fue sólo parcial. Se optó entonces por aumentar progresivamente el contenido de metanol en la solución de ácido cítrico, disminuyendo paralelamente el volumen de elución para acortar el tiempo de contacto del anticuerpo con las soluciones que tenían mayor contenido de disolvente orgánico. La elución fue completa sólo con el mayor contenido de metanol ensayado (64%).

Para saber si el medio ácido tenía o no algún efecto en la elución, se probaron mezclas metanol-agua 64:36 (v/v) variando el volumen percolado de 3 hasta 15 mL. La recuperación del analito fue completa a partir de un volumen de eluyente de 7.5 mL. Posteriormente se realizó un último ensayo con una mezcla más fuerte, que contenía 76% de metanol, por lo que el volumen de elución se redujo a 3 mL. En este caso también se logró la recuperación cuantitativa del carbofurano. No obstante, para no exponer al anticuerpo a un medio tan concentrado en disolvente orgánico se prefirió establecer como condición final de elución 8 mL de mezcla metanol-agua 64:36 (v/v). Inmediatamente después de la elución, el cartucho se lavó con agua y PBS para minimizar el daño al anticuerpo. En el ambiente favorable impuesto por el buffer, las moléculas de anticuerpo regresan lentamente a su configuración nativa, por lo que el cartucho debe dejarse en reposo durante varias horas con el empaque inmerso en PBS. Sin embargo, a pesar de todas estas precauciones, no pudo evitarse que una pequeña fracción de Mabs fuera dañada irreversiblemente en cada etapa de elución. En consecuencia, la capacidad de retención del inmunoabsorbente disminuyó progresivamente al aumentar el número de ciclos adsorción-desorción realizados en el mismo cartucho. El desglose de los experimentos antes descritos, se presenta en el anexo I.

Los experimentos anteriores mostraron que el medio ácido era irrelevante en la elución del analito, pues se obtuvo el mismo resultado sustituyendo la solución de ácido cítrico a pH 2.1 por agua pura. El parámetro importante para disociar el complejo carbofurano-anticarbofurano fue el contenido de disolvente orgánico en el eluyente. Probablemente, este disolvente provoca cambios locales en la región del sitio activo, liberando al compuesto retenido. Dependiendo de la naturaleza del disolvente orgánico, su concentración y el tiempo de contacto, los efectos sobre la estructura terciaria de la biomolécula serán más o menos intensos y la capacidad de interacción con el antígeno será alterada de manera sólo temporal o irreversiblemente.

Por otra parte, durante este trabajo de investigación se observó sistemáticamente que los inmunoabsorbentes tenían una pérdida de actividad más importante en los primeros ciclos de uso y después la disminución de actividad con el número de usos continuaba mucho más lentamente. Esto parece indicar que existen dos poblaciones diferentes de Mabs en el gel, unos muy susceptibles a las condiciones del medio y otros más resistentes. Dado que, en principio, los anticuerpos monoclonales son todos idénticos, el fenómeno observado debe estar más bien relacionado con la estructura porosa del gel. Así, los anticuerpos que quedaron encapsulados en poros estrechos, donde el esqueleto sólido se conformó de acuerdo con el tamaño y forma de la molécula plegada (estado activo), tuvieron menor libertad de movimiento y por ello resultaron más protegidos frente a los efectos desnaturizantes del medio que los rodeaba. En cambio los anticuerpos alojados en poros más grandes fueron más susceptibles a las agresiones del medio porque la molécula podía desplegarse más fácilmente.

La rápida desnaturización de la población de anticuerpos más expuestos en el gel no fue un problema muy grave debido a la alta capacidad de retención de carbofurano que tenía inicialmente el inmunoabsorbente. Aun después de la pérdida inicial de actividad, la capacidad del cartucho era mucho mayor que la requerida para una correcta determinación del analito por cromatografía de líquidos. La posterior pérdida de actividad fue suficientemente lenta de modo que el cartucho pudo utilizarse por al menos 25 ciclos.

5.4 Caracterización del comportamiento de retención del inmunoabsorbente (IA).

Una vez establecidas las condiciones óptimas para la carga, lavado y elución del cartucho de inmunoextracción, así como el método de análisis por EFS-CLAR en línea, se procedió a caracterizar el comportamiento de retención del inmunoabsorbente en función de diversos parámetros experimentales.

En esta etapa se emplearon muestras sintéticas constituidas por soluciones acuosas de PBS 0.02 M con 2% (v/v) de metanol, fortificadas con cantidades conocidas de carbofurano. Para la mayoría de los ensayos realizados, se colectaron y analizaron tanto los efluentes (carga + lavado) como el eluato del cartucho de inmunoextracción, con el fin de asegurar la congruencia y validez de los resultados.

5.4.1 Capacidad de enlazamiento

Se cargaron muestras de 50 mL dopadas con cantidades crecientes de carbofurano, desde 100 hasta 300 ng, a un flujo de 1 mL/min. Sólo se detectó carbofurano en los efluentes de la muestra

dopada con 300 ng; el análisis del eluato de esta muestra confirmó que se habían retenido en el inmunoabsorbente 283 ng del analito.

Estos experimentos se realizaron con un inmunoabsorbente recién preparado, que había sido dopado con 500 μ g de anticuerpo. Por lo tanto, la cantidad de carbofurano retenido corresponde a la máxima capacidad del inmunoabsorbente y mide la actividad residual del anticuerpo después del proceso de encapsulamiento.

En unidades normalizadas se establece que la actividad del anticuerpo LIB-BFNB-67, inmovilizado en un soporte de sílice por el método sol-gel, es de 566 ng de antígeno por mg de anticuerpo encapsulado.

5.4.2 Efecto de la velocidad de flujo sobre la retención

Estos ensayos se realizaron con cargas de 25 mL de muestras dopadas con 150 ng de carbofurano. Cada muestra se percoló a diferente velocidad utilizando una bomba isocrática. Para determinar la velocidad de flujo exacta proporcionada por la bomba, el efluente del cartucho (durante la carga) se recibió en un matraz aforado, midiendo con un cronómetro el tiempo requerido para alcanzar la marca de aforo.

En la figura 5.2 se muestran los resultados obtenidos. De acuerdo con éstos, la máxima retención de carbofurano se obtiene cuando la muestra es percolada a velocidades de flujo no mayores a 1 mL/min. Aparentemente la cinética de retención del analito no es muy rápida y por ello se requieren flujos moderados durante la carga del cartucho.

Existen dos posibles procesos limitantes de la cinética en este sistema: la difusión del analito y la velocidad de formación del complejo antígeno-anticuerpo. Algunos autores estiman que la difusión del analito es el proceso limitante, ya que éste debe recorrer una intrincada red de canales y poros en el gel hasta llegar a un poro con anticuerpo encapsulado. Sin embargo, también es sabido que, aún en solución, algunas interacciones biológicas del tipo enzima-sustrato o antígeno-anticuerpo requieren de cierto tiempo de incubación, lo que indica que la formación del complejo no siempre es inmediata.

En investigaciones anteriores ^{50,51} se han observado resultados diversos en lo que concierne al efecto de la velocidad de flujo en la carga sobre la retención del analito en cartuchos empacados con diferentes IAs sol-gel. Por ejemplo, en un IA dopado con anticuerpo policlonal contra 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxi acético) se observó que a flujos superiores a 1 ml/min la retención del analito (éster

metílico del 2,4-D) disminuía considerablemente. En cambio, en IAs dopados con antimalatión o antiatrazina (ambos policlonales) no se observó ningún efecto en la retención de los correspondientes antígenos al cargar las muestras hasta velocidades de 5 ml/min. Puesto que todos los cartuchos fueron empacados manualmente con partículas del material sol-gel molido en mortero, es de esperar que la estructura del empaque fuera similar en los tres casos. En consecuencia, los procesos de difusión debieron ser muy parecidos en estos cartuchos y la diferencia de comportamiento debió provenir de una diferente cinética de formación de los complejos antígeno-anticuerpo.

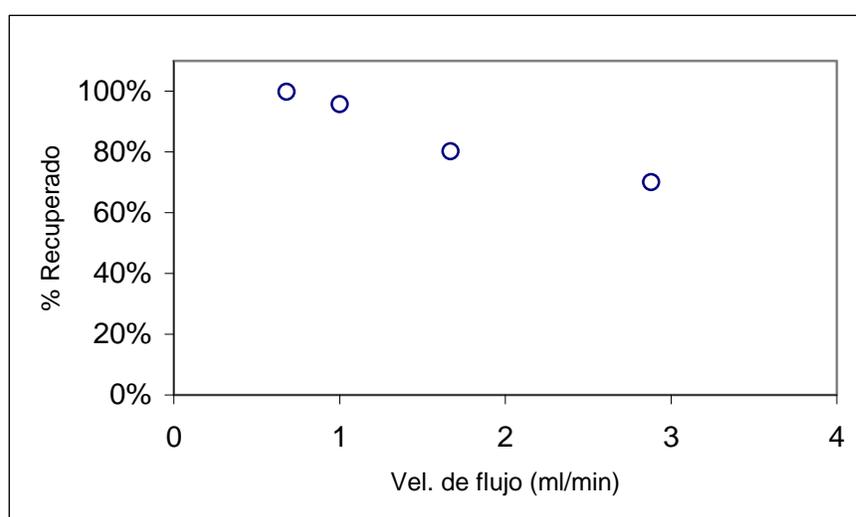


Fig. 5.2 Efecto de la velocidad de flujo sobre la retención de carbofurano en el inmunoabsorbente.

De acuerdo con la discusión anterior, el comportamiento observado en la Fig. 5.2 es fundamentalmente debido a una cinética relativamente lenta en la formación del complejo carbofurano-anticarbofurano. A pesar de ello, los cartuchos se pueden trabajar a velocidades de flujo entre 0.5 y 1 mL/min, lo cual es bastante aceptable para un proceso de extracción en fase sólida. Además, dada la fragilidad de los Mabs y la no muy alta resistencia mecánica de los geles, es mejor mantener una baja presión para mayor durabilidad de los cartuchos.

5.4.3 Volumen de fuga

En estos ensayos se cargaron en el cartucho diferentes volúmenes de muestras dopadas con 50 ng de carbofurano a un flujo de 1 mL/min. La figura 5.3 muestra que la cantidad de analito retenido en el IA se mantuvo constante hasta el máximo volumen de muestra ensayado. Por lo tanto, se deduce que el volumen de inicio de fuga del analito, bajo las condiciones empleadas durante la carga de la muestra, es superior a los 200 mL.

Un volumen de fuga tan alto indica que la interacción antígeno-anticuerpo es sumamente fuerte en el medio utilizado durante la carga (PBS 0.02M con 2% de metanol). De hecho, se puede esperar que no habrá pérdidas de analito aunque el volumen de muestra aumente considerablemente, siempre y cuando la cantidad de compuesto no sobrepase la capacidad del cartucho.

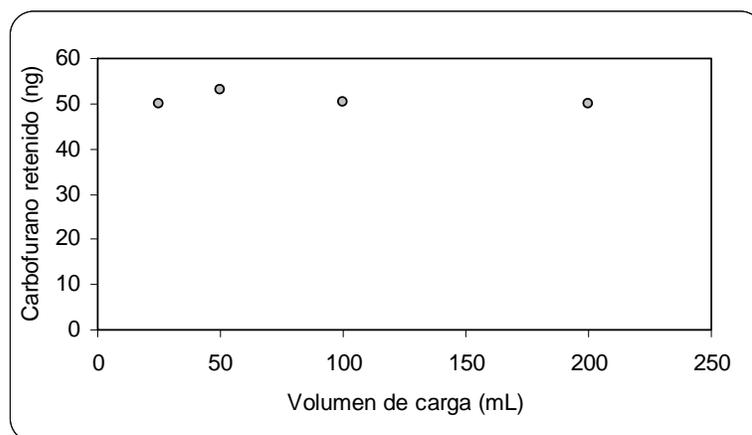


Fig. 5.3 Efecto del volumen de muestra cargado en el inmunoabsorbente sobre la retención del carbofurano.

Este resultado es muy importante pues significa que es posible determinar concentraciones extraordinariamente bajas en una muestra problema, utilizando un cartucho de inmunoextracción para recuperar y concentrar al analito a partir de un gran volumen de dicha muestra. La aplicación más evidente es en el análisis de aguas ambientales donde la disponibilidad de muestra no es un problema y es posible coleccionar volúmenes muy grandes. No obstante, entre mayor sea el volumen de muestra tratado, mayor es la posibilidad de tener interferencias en el análisis por la retención no

específica de otros compuestos presentes que también serían concentrados. Un caso muy frecuente es el de los ácidos húmicos y fúlvicos, presentes en abundancia en el agua de ríos, lagos y presas.

5.4.4 Reactividad cruzada

Aunque el sitio activo de un anticuerpo tiene gran afinidad por el antígeno que le dio origen, también puede reconocer otros compuestos de estructura similar como algunos metabolitos del antígeno u otros miembros de la misma familia. Esta propiedad recibe el nombre de reactividad cruzada y se presenta no sólo con los anticuerpos policlonales sino también con los monoclonales.

Para estudiar la reactividad cruzada del anticuerpo LIB-BFNB-67 encapsulado en sol-gel se utilizaron 4 metabolitos del carbofurano y un compuesto de otra familia. Se prepararon soluciones de cada uno en PBS 0.02M con 2% de metanol y se cargaron por separado en el cartucho de inmuoextracción para que no hubiera ningún efecto de competencia por los sitios activos. Las condiciones experimentales fueron: volumen de carga 50 mL, cantidad cargada 100 ng, flujo de 1 mL/min.

Los resultados se presentan en la Tabla 5.5. Como puede observarse, el anticuerpo sólo reconoció, además del carbofurano, a su metabolito 3-hidroxicarbofurano. Este reconocimiento fue parcial y corresponde a un 30% de reactividad cruzada tomando como referencia la cantidad retenida del analito-antígeno. Los demás metabolitos ensayados, así como el 2,4-diclorofenol, atravesaron el cartucho sin ser retenidos. El análisis de los efluentes (carga + lavados) permitió corroborar que los compuestos se encontraban en su totalidad en esta fracción.

Tabla 5.5 Estudio de la reactividad cruzada del anticuerpo anti-carbofurano

analito	masa de analito adicionado (ng)	Resultado observado
3-hidroxicarbofurano	100	30 ng
3-ceto-7-fenolcarbofurano	100	No retenido
3-cetocarbofurano	100	No retenido
7-fenolcarbofurano	100	No retenido
carbofurano	100	100 ng
2,4-diclorofenol	101	No retenido

Es interesante mencionar que el Dr. Montoya y su grupo realizaron estudios de reactividad cruzada de este anticuerpo por inmunoensayo. Ellos encontraron los siguientes resultados para algunos

metabolitos reportados en la Tabla 5.5: carbofurano 100%, 3-hidroxicarbofurano 25.2%, 3-cetocarbofurano 3.1%, 7-fenolcarbofurano 0.02%. Considerando la gran diferencia entre las dos técnicas, se puede decir que los resultados son similares; básicamente, el MAb sólo reconoció de manera significativa al metabolito 3-hidroxicarbofurano.

5.4.5 Estabilidad del inmunoadsorbente (IA)

Después de 25 ciclos adsorción-desorción realizados en el mismo cartucho de inmunoextracción, a lo largo de un periodo de 3 meses, la disminución en la capacidad de retención de analito fue de 50%, aproximadamente. Esto significa que la mitad de los anticuerpos inicialmente activos se desnaturalizó, muy probablemente durante las etapas de elución del cartucho.

Es interesante hacer notar que después de 25 usos, el cartucho todavía podía retener más de 100 ng de carbofurano. Por comparación, los cartuchos de inmunoextracción preparados con anticuerpos policlonales en trabajos anteriores, preservaron su misma capacidad durante 30 usos; sin embargo, su capacidad inicial fue de al máximo 80 ng del correspondiente antígeno.

Desde el punto de vista de reusabilidad de los cartuchos, se puede decir que los inmunoadsorbentes preparados con anticuerpos monoclonales (Mabs) son competitivos frente a los preparados con anticuerpos policlonales. Una gran ventaja de los Mabs es que sus propiedades son idénticas de lote a lote, lo que no sucede con los anticuerpos policlonales. Por el contrario, los anticuerpos policlonales tienen la ventaja de ser alrededor de 5 veces menos costosos que los Mabs.

5.5 Aplicación del método a una muestra real y evaluación estadística

Con base en todos los estudios y resultados descritos en las secciones anteriores, se estableció un método analítico para la determinación de trazas de carbofurano en muestras acuosas. Este método está claramente descrito y detallado al final de la sección experimental.

El Método fue aplicado a una muestra de 50 mL de agua de la presa Tenango y no se detectó la presencia de carbofurano en esta agua.

El resto del agua de presa se utilizó para certificar el método analítico. Se consideró que con 50 mL de muestra era suficiente para alcanzar una buena sensibilidad; por lo tanto, todos los ensayos fueron realizados con ese volumen.

Justo antes de su análisis, a cada muestra se le agregó PBS y se fortificó con carbofurano a la concentración requerida.

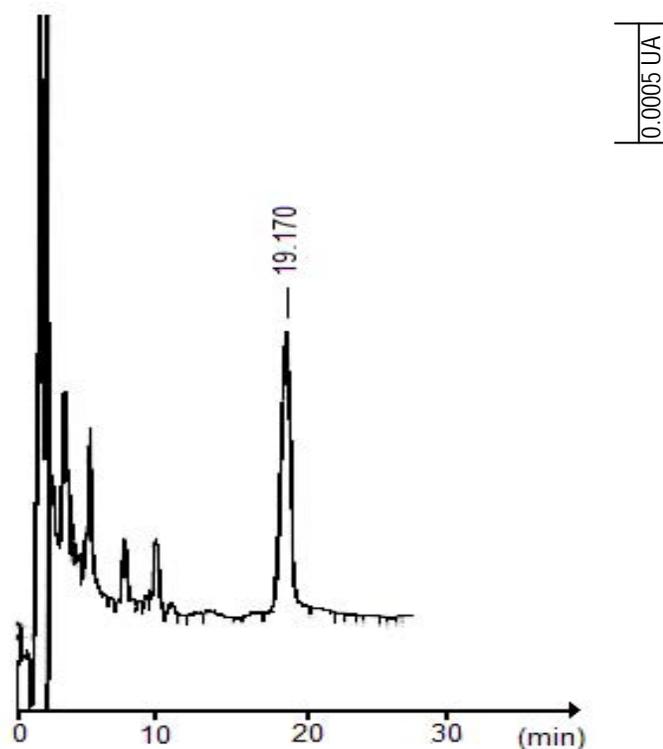


Fig. 5.4 Cromatograma obtenido del análisis de 50 mL de agua de la presa Tenango fortificada con carbofurano a 2 ng/mL (pico señalado). Inmunoextracción fuera de línea en cartucho empacado con inmunoabsorbente sol-gel dopado con 500 μ g de anticuerpo monoclonal anticarbofurano. Reconcentración de eluato en precolumna de fase reversa PLRP-S 5 μ m (20 x 2 mm, d.i.) y análisis en línea. Columna (150 x 4.6 mm, d.i.) empacada con fase Hypersil ODS, 5 μ m; fase móvil acetonitrilo-agua 23:77 (v/v) a flujo de 1 mL/min; detección UV a 280 nm.

En la Fig. 5.4 se presenta como ilustración el cromatograma obtenido del análisis de una muestra de 50 mL de agua de presa fortificada con 100 ng de carbofurano (2 ng/mL) y analizada según el método establecido. Como puede observarse, al inicio del cromatograma aparecen algunas señales

debido probablemente a impurezas remanentes de la matriz, que fueron retenidas de manera no específica en el soporte del inmuoadsorbente y no lograron eliminarse con el solvente de lavado (PBS con 4% de metanol). Estas impurezas fueron eluidas del cartucho junto con el carbofurano y reconcentradas en la precolumna de fase reversa donde se cargó el eluato obtenido de la etapa de inmuoextracción. Puesto que la precolumna sólo se lavo con agua, estos compuestos de la matriz permanecieron adsorbidos y fueron posteriormente eluidos por la fase móvil durante el análisis en línea. No obstante, si se considera la gran cantidad de materia orgánica presente en las aguas superficiales, y particularmente en una presa, las pocas señales que aparecen en el cromatograma representan una fracción pequeñísima de la matriz original. Por otra parte, las condiciones cromatográficas fueron diseñadas de modo que el analito eluyera en un tiempo de retención suficientemente alejado de la zona donde aparecen las señales de matriz. Así, como se observa en el cromatograma, el pico del carbofurano está bien aislado y puede ser integrado y cuantificado sin dificultad.

5.5.1 Linealidad del método

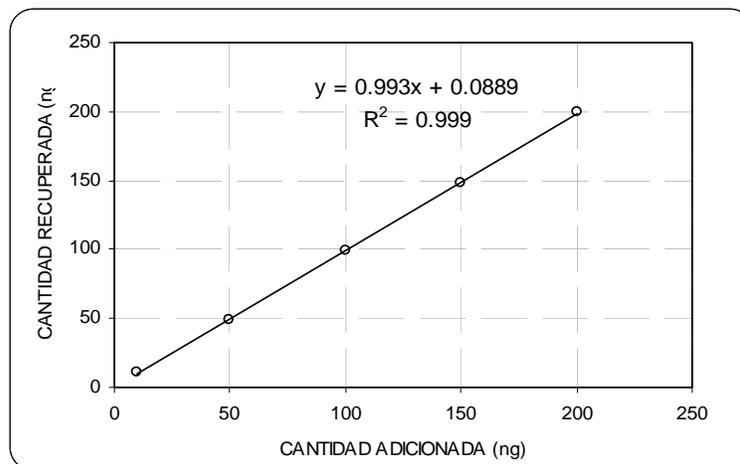


Figura 5.5 Recuperación de carbofurano en muestras de agua de presa (50mL) fortificadas a concentraciones de 0.2-4 ppb.

En la figura 5.5 se presenta la gráfica de cantidad recuperada vs cantidad adicionada, obtenida del análisis de 5 muestras de 50 mL del agua de presa (preparada como se indicó anteriormente), las cuales fueron fortificadas con carbofurano en el intervalo de 10 a 200 ng, la concentración del analito en la solución fue entonces de 0.2 – 4 ng/mL (o partes por billón, ppb). Los datos numéricos correspondientes a la gráfica se muestran en la Tabla 5.6.

El tratamiento estadístico de los datos por el método de mínimos cuadrados dio como resultado la ecuación de la recta de regresión:

$$y = 0.993x + 0.0889 \quad (E-5.1)$$

$$r^2 = 0.999$$

Tabla 5.6 Resultados de análisis de 5 muestras fortificadas con diferentes cantidades de carbofurano.

CANTIDAD ADICIONADA ng	CANTIDAD RECUPERADA ng	%RECUPERADO
10	10.7	107
50	49.0	97.9
100	99.4	99.4
150	149	99.2
200	199	99.6

El excelente coeficiente de determinación (r^2) obtenido indica que el método es lineal en el intervalo de concentraciones estudiado, para muestras de 50 mL de aguas superficiales. Es importante señalar que lo que define el intervalo de linealidad del método es más bien la cantidad de carbofurano en las muestras y no tanto la concentración. Esto es debido a que el cartucho de inmuoextracción, con el que se recupera el carbofurano presente en la muestra, tiene una capacidad limitada que depende de la fracción de anticuerpo que permanece activo cuando se realizan los análisis.

Tabla 5.7 Los intervalos de confianza (IC) fueron calculados al umbral de confianza $\alpha=0.05$

Parámetro*	Resultado
r^2	0,999
IC (β_0)	-1.65 1.82
IC (β_1)	0.979 1.01
Porcentaje de recobro	
IC (μ)	105% 96.0%
% de recobro aritmético	101%

* β_0 : ordenada al origen; β_1 :pendiente; μ :media aritmética del recobro

En la Tabla 5.7 se reportan los intervalos de confianza para la ordenada al origen y la pendiente de la recta de regresión, así como el intervalo de confianza para la media aritmética de recobro. Estos demuestran que el método no presenta errores sistemáticos (ordenada al origen estadísticamente igual a cero) y que es exacto en el intervalo de concentraciones estudiado (pendiente estadísticamente igual a uno y media aritmética del recobro no difiere significativamente de 100%). De acuerdo con estos resultados, las 5 concentraciones estudiadas (o cantidades de carbofurano en 50 mL de muestra) pueden ser analizadas confiablemente por el método ya que los resultados que se obtienen son exactos.

5.5.2 Precisión y exactitud en condiciones cercanas al límite de detección.

La exactitud expresa la concordancia entre el valor real de la concentración o cantidad de analito en la muestra y el valor obtenido al analizar dicha muestra por el método desarrollado. Generalmente se expresa como porcentaje de recobro.

La precisión es una medida de la dispersión de los resultados obtenidos al analizar varias réplicas de una misma muestra empleando el mismo método analítico. Si las réplicas de la muestra son analizadas en el mismo laboratorio, por el mismo analista y el mismo equipo, la dispersión de resultados expresa la repetibilidad del método. Por el contrario, si son analizadas en condiciones diferentes y particularmente en laboratorios diferentes pero con el mismo método, la dispersión de resultados será una medida de la reproducibilidad del método.

Por otra parte, si se obtienen resultados estadísticamente iguales en el análisis de réplicas cuando se varían ligeramente algunas condiciones experimentales, ya sea en la etapa de preparación de muestra (p. ej. cantidades o pureza de algunos reactivos, marca o lote de un adsorbente para EFS, lote de anticuerpos para inmunoextracción, etc), o en la etapa de determinación del analito (p. ej. condiciones cromatográficas, equipo, etc.) se dice que el método presenta tolerancia a variaciones ligeras, o bien que es robusto.

Aunque en el inciso anterior ya se demostró que el método es exacto en un cierto intervalo de concentraciones o cantidades de carbofurano en 50 mL de muestra, no se evaluó su precisión. Lógicamente, entre mayor sea la cantidad de compuesto en la muestra, mayor será la precisión de los resultados, mientras se trabaje en el intervalo lineal. Para evaluar los alcances del método en condiciones más estrictas, se decidió llevar a cabo el estudio de repetibilidad con muestras fortificadas con cantidades de carbofurano cercanas al límite inferior del intervalo lineal.

Se analizaron 7 réplicas de 50 mL de agua de presa dopadas con 20 ng de carbofurano (concentración de 0.4 ppb). Los resultados obtenidos se presentan en la Tabla 5.8. Los

correspondientes parámetros estadísticos se reportan en la Tabla 5.9. Como puede notarse, se confirma la exactitud del método para la determinación de carbofurano en aguas superficiales a niveles de concentración inferiores a la parte por billón. El coeficiente de variación del % de recobro es de 10.0% lo que corresponde a una desviación estándar de 2.08 ng o 0.041 ppb de carbofurano. Esta variabilidad para un nivel de concentración tan bajo del pesticida en una matriz ambiental se considera excelente. Tomando en cuenta los criterios establecidos en la Tabla 5.9, se acepta que el método es exacto y preciso para estos niveles de concentración del analito.

Tabla 5.8 Estudio de repetibilidad. Muestras de agua de presa (50mL) fortificadas a 0.4 ppb de carbofurano.

Muestra Adicionada	Cantidad Adicionada (ng)	Cantidad Recuperada (ng)	% Recobro
1	20.0	17.7	88.5
2	20.0	23.2	116
3	20.0	23.7	118
4	20.0	20.6	103
5	20.0	20.2	101
6	20.0	20.7	103
7	20.0	19.3	96.7

Algunas condiciones experimentales del método pueden tener cierta variabilidad sin que su impacto sea crítico para la obtención de resultados exactos y precisos. Estas forman parte de la tolerancia o robustez del método y se detallan a continuación.

- a. En la preparación de la muestra:
 - Concentración de PBS en la muestra: nominal 0.02M. Puede tener amplias variaciones pues para un correcto funcionamiento del anticuerpo sólo se requiere un pH entre 7-7.5 y una fuerza iónica de preferencia mayor a 0.01M.
 - % de metanol en la muestra: nominal 2% (v/v). Para asegurar la formación del complejo carbofurano-MAb se recomienda no sobrepasar el 2% de metanol en la carga. Concentraciones ligeramente menores al 2% no tendrán impacto en los resultados.
 - % de metanol en la solución de lavado del IA: Nominal 4% (v/v). Una vez formado el complejo durante la carga, éste no se disociará si el % de metanol en el lavado varía ligeramente (p.ej. $\pm 1\%$, v/v)

- Volumen y composición del eluyente: nominal 8 mL de metanol-agua 64:36 (v/v). Esta condición es crítica, las variaciones hacia abajo pueden afectar seriamente el recobro, las variaciones hacia arriba disminuirán la vida útil del cartucho.
 - Dilución del eluato previa a la carga en la precolumna: nominal a 50 mL con agua pura. El volumen puede variar ampliamente hacia arriba porque el carbofurano no se fugará de la precolumna pues paralelamente con el aumento de volumen disminuye el % de metanol. Las variaciones hacia abajo deben ser muy limitadas ya que un aumento en el % de disolvente orgánico sí puede propiciar la fuga del analito.
 - Lavado de la precolumna: nominal 5 mL de agua. Variaciones de ± 1 mL no tendrán efecto en los resultados.
- b. En las condiciones cromatográficas:
- El tamaño y marca de la precolumna de fase reversa así como la composición de la fase móvil pueden variar, siempre y cuando se asegure, por inyección de un estándar, que el carbofurano está bien retenido. Un $10 < k' < 16$ permite evitar interferencias por el o los picos de matriz que aparecen al inicio del cromatograma, sin que el pico del analito se ensanche demasiado con la consiguiente pérdida de sensibilidad. El detector debe ser de buena calidad para alcanzar una alta sensibilidad en el análisis.

Tabla 5.9 Parámetros estadísticos y criterios de aceptabilidad para la determinación de carbofurano a niveles de concentración de 0.4 ppb en agua de presa.

Parámetro	Criterio	Resultado
CV	No mayor de 20%	10%
% Recobro	85-115 %	104%
IC(μ)*	Debe incluir el 100%	113%
		94.2%

* Intervalo de confianza calculado para un nivel de incertidumbre $\alpha=0.05$

5.5.3 Límite de detección y límite de cuantificación

El límite de detección es la mínima cantidad o concentración de analito en la muestra que puede detectarse al aplicar el método analítico, pero que no se logra cuantificar con la precisión y exactitud requeridas. En muchos trabajos se toma como límite de detección la cantidad o concentración de analito que produce una señal de 3 veces el ruido de fondo. En este trabajo se empleó el criterio

recomendado por la EPA (Environmental Protection Agency, de E.U.) para análisis de contaminantes en aguas ambientales. Este criterio se expresa por la siguiente ecuación:

$$\text{LDM} = t_{(\alpha=0.01, n-1)} * S \quad (\text{E-5.2})$$

Donde "LDM" es el límite de detección del método; " $t_{(\alpha=0.01, n-1)}$ " es la "t" de Student para un valor de incertidumbre del 1% con n-1 grados de libertad; "S" es la desviación estándar en unidades de masa o de concentración, obtenida en el análisis de varias muestras blanco (se recomienda un mínimo de 7) fortificadas con el analito a niveles no mayores a 10 veces el límite de detección esperado.

En la Tabla 5.10 se reporta el límite de detección calculado utilizando la desviación estándar de los resultados de la Tabla 5.8 con 6 grados de libertad.

En lo que concierne al límite de cuantificación del método (LCM), no existen directivas bien establecidas para el análisis de aguas ambientales por lo que los criterios al respecto son muy variables. De acuerdo con características generales de la mayoría de los métodos EPA, se considera aceptable un % de recuperación en el intervalo 70-130% con un coeficiente de variación máximo de 30% ²⁴. En este trabajo se optó por tomar como criterio para el límite de cuantificación la cantidad o concentración de carbofurano que corresponde a 5 veces la desviación estándar de los resultados obtenidos en el análisis de las 7 réplicas de agua de presa dopada con 20 ng del analito (Tablas 5.8 y 5.9)

Tabla 5.10 Límites de detección (LDM) y de cuantificación (LCM) del método en agua de presa.

Parámetro	ng	ppb
LDM	6.5	0.13
LCM	10.4	0.208

Considerando que la EPA ha establecido como límite de riesgo para la salud humana una concentración de 40 ppb de carbofurano en agua para beber ²⁴, es obvio que los alcances del método propuesto son mucho mayores que lo requerido según este criterio de riesgo. Más aún, el criterio fue establecido para una matriz muy simple (agua para beber), mientras que los límites de detección y cuantificación del método propuesto se determinaron con una matriz compleja (agua de presa). Por otra parte, el límite de detección estimado para el método 531.1 de la EPA en el caso de la determinación de carbofurano en agua subterránea es de 1.5 ppb ²⁴. Este método, que es probablemente el método de referencia más aceptado para la determinación de N-metilcarbamatos, se basa en una inyección directa de la muestra de agua en el cromatógrafo de líquidos con derivación post-columna y detección por fluorescencia. Otro método a mencionar es el método 4 de NPS (National Pesticide Survey, de E.U.), que se basa en una extracción líquido-líquido y análisis

por CLAR-UV. Entre los pesticidas que se determinan por dicho método se incluye un metabolito del carbofurano, el 7-fenolcarbofurano, para el cual se marca que el límite de cuantificación en agua subterránea es de 40 ppb ²⁴. Comparando con estos métodos "oficiales", es evidente que el método propuesto es mucho más sensible.

La Unión Europea tiene, por su parte, normas más rígidas respecto a la presencia de pesticidas en agua. Por ejemplo, la regulación para el agua para beber establece un límite máximo de 0.1 ppb por pesticida individual y 0.5 ppb de pesticidas totales. El límite de detección del método propuesto en este trabajo es superior a lo marcado por esta regulación. Sin embargo, debe tomarse en cuenta que este LDM fue determinado para agua de presa, por lo que es factible que con una matriz más limpia, como el agua para beber, se puedan alcanzar límites de detección y cuantificación más bajos. Además, el método fue establecido usando un volumen de muestra de 50 mL, pero es posible aumentar el volumen de muestra tratada hasta por lo menos 200 mL, lo que permitiría disminuir aún más los límites de detección y cuantificación. En efecto, en una sección anterior se demostró que el cartucho de inmunoextracción puede cargarse con 200 mL de la muestra acuosa sin que se produzca fuga del analito, siempre y cuando la cantidad absoluta de éste en el volumen cargado no rebase la capacidad del cartucho. Obviamente, con concentraciones del orden de 0.01 a 0.1 ppb no hay ningún riesgo de rebasar la capacidad del cartucho aunque se cargara un litro de muestra.

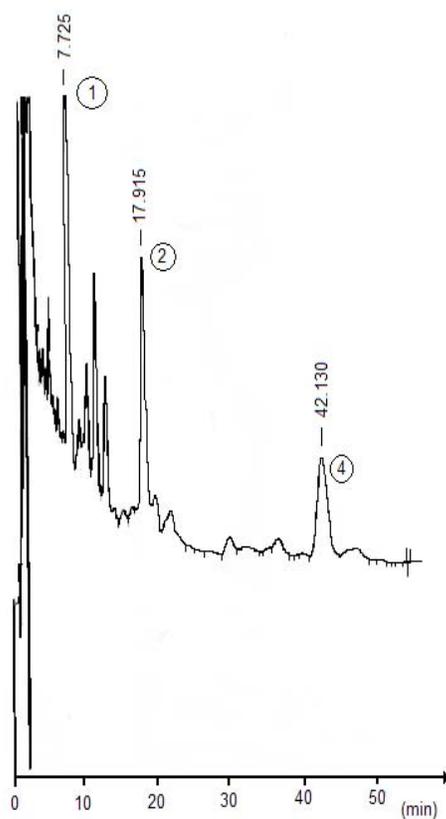
5.5.4 Selectividad y especificidad del método

Una muestra de agua de presa se fortificó con carbofurano, dos de sus metabolitos y un compuesto de otra familia, a las concentraciones indicadas en la Tabla 5.11. La muestra se sometió al procedimiento establecido, pero en este caso se colectaron tanto los efluentes (carga + lavado) como el eluato del cartucho de inmunoextracción. Ambas fracciones fueron cargadas en precolumnas y analizadas en línea. En la figura 5.6 se presentan los cromatogramas obtenidos.

Tabla 5.11 Concentraciones de analitos en el agua de presa (50mL) fortificada para el estudio de selectividad y especificidad del método.

Analito	Cantidad (ng)	Concentración (ppb)
Carbofurano	56	1.12
Carbofuranfenol-3-ceto	112	2.24
Bezofuran-7-ol	112	2.24
2,4-diclorofenol	113	2.27

a) Efluentes



b) Eluato

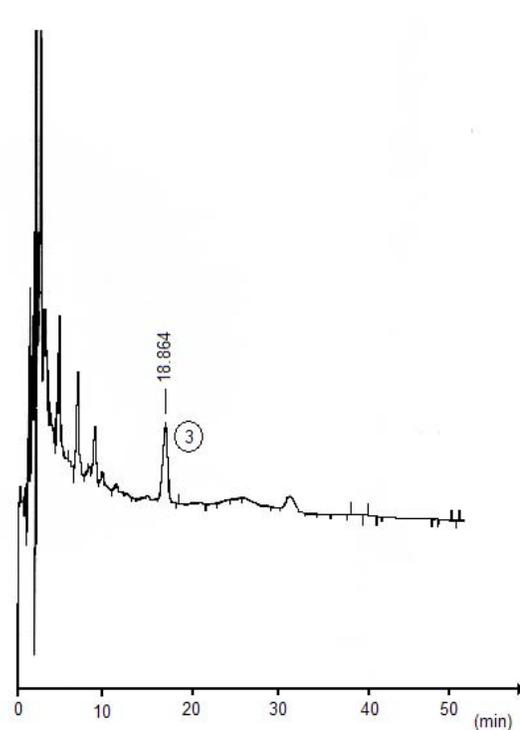


Fig. 5.6 Análisis de efluentes (a) y eluato (b) del cartucho de inmunoextracción. Muestra, agua de presa fortificada con 4 compuestos a la concentración marcada: 1) carbofuranfenol-3-ceto (2.24 ppb), 2) benzofuran-7-ol (2.24 ppb), 3) carbofurano (1.12 ppb), 4) 2,4-diclorofenol (2.27 ppb) . Otras condiciones como en la Fig. 5.4 .

El cromatograma de los efluentes muestra un gran pico de matriz inicial que desciende lentamente a la línea base; encima de la cola de éste sobresalen varios picos entre los cuales se encuentran los correspondientes a los metabolitos del carbofurano y al diclorofenol. En el cromatograma del eluato, las señales de matriz están muy disminuidas y bien separado de cualquier interferencia se observa el pico del carbofurano.

Este experimento permite comprobar la especificidad y selectividad del método. La etapa de inmunoextracción es el factor clave, ya que durante ésta el anticuerpo sólo reconoce al antígeno (carbofurano) y no a otras sustancias de estructura similar (metabolitos) o diferente (diclorofenol y compuestos de la matriz). A pesar de que no es posible evitar completamente la retención no específica de algunos constituyentes de la matriz sobre el soporte del inmunoadsorbente, la fracción de materia orgánica retenida por esta vía es relativamente pequeña. Durante la etapa de análisis cromatográfico, el compuesto de interés es separado completamente de las interferencias remanentes y puede ser detectado y cuantificado con buena precisión y exactitud.

Es interesante notar que, bajo las condiciones cromatográficas empleadas, el benzofuran-7-ol, tiene un tiempo de retención similar al del carbofurano; sin embargo, la especificidad del método permite evitar completamente la interferencia de este compuesto.

VI. CONCLUSIONES

- La optimización sistemática de las condiciones experimentales en las diferentes etapas del proceso sol-gel, permitió llevar a cabo un exitoso encapsulamiento del anticuerpo monoclonal anticarbofurano LIB-BFNB-67 en un soporte de sílice, preservando significativamente su configuración nativa y actividad biológica.
- La capacidad inicial de enlazamiento del carbofurano por el inmunoadsorbente sintetizado fue de 566 ng del pesticida por mg de anticuerpo encapsulado. Esto representa un importante logro con respecto a otros inmunoadsorbentes reportados, especialmente si se considera la gran fragilidad de los anticuerpos monoclonales. La selectividad del biomaterial fue también notable ya que sólo presentó un 30% de reactividad cruzada con el metabolito 3-hidroxicarbofurano. Otros compuestos de estructura similar (3 metabolitos de carbofurano) o diferente (2,4-diclorofenol) no fueron reconocidos por el anticuerpo.
- El volumen de fuga del analito-antígeno en el cartucho de inmunoextracción (con 500 µg de anticuerpo) fue superior a los 200 mL, lo que indica una gran estabilidad del complejo carbofurano-anticarbofurano. Sin embargo, la cinética de formación del complejo no es muy rápida, por lo que se requiere operar el cartucho a velocidades de flujo no mayores a 1 mL/min durante la etapa de carga.
- Dada la estabilidad del complejo y la fragilidad del anticuerpo, la etapa de elución del cartucho fue un punto crítico. Se requirió de un solvente fuerte, con alto contenido de metanol (64%, v/v), para liberar cuantitativamente al analito retenido. Esta condición agresiva provocó la desnaturalización irreversible de una pequeña fracción del anticuerpo encapsulado en cada etapa de elución. La pérdida de actividad del inmunoadsorbente después de 25 ciclos de adsorción-desorción, realizados a lo largo de un periodo de 3 meses, fue de aproximadamente 50%. No obstante, la capacidad del cartucho en este punto todavía era mayor a los 100 ng de carbofurano, por lo que aún era posible seguirlo utilizando en experimentos adicionales de inmunoextracción.
- Con base en los estudios realizados, se propuso un método analítico altamente sensible y selectivo para la determinación de carbofurano en aguas ambientales. El método consta de 3 etapas: (1) inmunoextracción del analito a partir de la muestra, (2) concentración del extracto en una precolumna de fase reversa polimérica, (3) análisis en línea de la precolumna por cromatografía de líquidos en fase reversa con detección UV a 280 nm.

- El método propuesto fue probado y certificado con una matriz acuosa compleja: muestras de 50 mL de agua de la presa Tenango (Puebla). Se demostró que el método es lineal en el intervalo de concentraciones de carbofurano de 0.2-4 ng/mL (ppb), o sea 10-200 ng del pesticida en la muestra. La precisión y exactitud, a concentraciones de carbofurano inferiores a la ppb, fueron excelentes; se obtuvo una recuperación promedio de 104% con un coeficiente de variación del 10%.
- El límite de detección del método, determinado estadísticamente de acuerdo con el criterio recomendado por la EPA, fue de 0.13 ppb (6.5 ng de carbofurano en 50 mL de muestra). El límite de cuantificación fue de 0.21 ppb (10.4 ng de carbofurano en 50 mL de muestra). Ambos límites son considerablemente menores al límite de riesgo para la salud humana (40 ppb de carbofurano) establecido en las normas ambientales de Estados Unidos. Sin embargo, los límites alcanzados por el método propuesto son mayores a la concentración máxima admisible para pesticidas individuales (0.1 ppb), establecida en las normas de la Unión Europea.
- Las parámetros del método (volúmenes, concentraciones, etc.) pueden tener ligeras variaciones sin afectar los resultados, por lo que se puede considerar que es un método robusto. Adicionalmente, queda abierta la posibilidad de aumentar el volumen de muestra analizada (en principio hasta 4 veces), con lo cual se podrían alcanzar límites de detección y cuantificación compatibles con las más estrictas normas de calidad del agua.

VII. ANEXOS

ANEXO I

Fórmulas para la evaluación estadística en el presente trabajo.

PROMEDIO $\bar{y} = \frac{\sum y}{n}$

DESVIACIÓN ESTÁNDAR $s = \sqrt{\frac{(n(\sum y^2) - (\sum y)^2)}{(n(n-1))}}$

COEFICIENTE DE VARIACIÓN $CV = \frac{s}{\bar{y}} * 100$

INTERVALO DE CONFIANZA PARA LA MEDIA $IC(\mu) = \bar{y} \pm t_{0.975, n-1} \frac{S}{\sqrt{n}}$

LINEALIDAD DEL MÉTODO

PENDIENTE $b_1 = \frac{n \sum xy - \sum x \sum y}{n \sum x^2 - (\sum x)^2}$

ORDENADA AL ORIGEN

$$b_o = \frac{\sum y - b_1 \sum x}{n}$$

COEFICIENTE DE DETERMINACIÓN

$$r^2 = \frac{(n(\sum xy) - (\sum x)(\sum y))^2}{(n(\sum x^2) - (\sum x)^2)(n(\sum y^2) - (\sum y)^2)}$$

INTERVALO DE CONFIANZA PARA LA PENDIENTE

$$IC(\beta_1) = b_1 \pm t_{0.975, n-2} S_{b1}$$

$$S_{b1} = S_{y/x} \sqrt{\frac{1}{\sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n}}}$$

INTERVALO DE CONFIANZA PARA LA ORDENADA AL ORIGEN

$$S_{y/x} = \sqrt{\frac{\sum y^2 - b_1 \sum xy - b_o \sum y}{n-2}}$$

$$IC(\beta_0) = b_0 \pm t_{0.975, n-2} S_{b0}$$

$$S_{b0} = S_{y/x} \sqrt{\frac{1}{n} + \frac{(\bar{x})^2}{\sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n}}}$$

Donde: b_1 es la pendiente, b_0 es la ordenada al origen, S_{b1} es la desviación estándar de la pendiente, S_{b0} es la desviación estándar de la ordenada al origen y $S_{y/x}$ es la variabilidad de la curva de regresión.

LÍMITE DE DETECCIÓN

3 * RUIDO

1) SEÑAL RUIDO

Determinar aquella cantidad del analito que genere una respuesta inmediata /superior a 3 veces el ruido

2) BASADO EN LA DESVIACIÓN ESTÁNDAR DE LOS BLANCOS (S_b)

$$LD = \frac{3.3 \times S_b}{b_1}$$

3) BASADO EN LA DESVIACIÓN ESTÁNDAR DE REGRESIÓN

$$S_b = \sqrt{\frac{n(\sum y^2) - (\sum y)^2}{n(n-1)}}$$

$$b_1 = \frac{n \sum xy - \sum x \sum y}{n \sum x^2 - (\sum x)^2}$$

$$LD = \frac{3.3 \times S_{y/x}}{b_1}$$

$$S_{y/x} = \sqrt{\frac{\sum y^2 - b_1 \sum xy - b_0 \sum y}{n-2}}$$

$$S_{b1} = S_{y/x} \sqrt{\frac{1}{\sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n}}}$$

LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN

1) SEÑAL RUIDO

10 * RUIDO

Determinar aquella cantidad del analito que genere una respuesta inmediata /superior a 10 veces el ruido

2) BASADO EN LA DESVIACIÓN ESTÁNDAR DE LOS BLANCOS

$$LC = \frac{10 \times S_b}{b_1}$$

$$S_b = \sqrt{\frac{n(\sum y^2) - (\sum y)^2}{n(n-1)}}$$

$$b_1 = \frac{n \sum xy - \sum x \sum y}{n \sum x^2 - (\sum x)^2}$$

3) BASADO EN LA DESVIACIÓN ESTÁNDAR DE REGRESIÓN

$$LC = \frac{10 \times S_{y/x}}{b_1}$$

$$S_{y/x} = \sqrt{\frac{\sum y^2 - b_1 \sum xy - b_0 \sum y}{n-2}}$$

$$S_{b1} = S_{y/x} \sqrt{\frac{1}{\sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n}}}$$

BASADO EN LA DESVIACIÓN ESTÁNDAR
DE LA ORDENADA AL ORIGEN

$$LC = \frac{10 \times S_{b_0}}{b_1}$$

$$b_1 = \frac{n \sum xy - \sum x \sum y}{n \sum x^2 - (\sum x)^2}$$

$$S_{y/x} = \sqrt{\frac{\sum y^2 - b_1 \sum xy - b_0 \sum y}{n - 2}}$$

$$b_0 = \frac{\sum y - b_1 \sum x}{n}$$

$$S_{b_0} = S_{y/x} \sqrt{\frac{1}{n} + \frac{(\bar{x})^2}{\sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n}}}$$

ANEXO II

Resultados obtenidos en ensayos de optimización de la elución de carbofurano del cartucho de inmunoextracción

Disolvente de elución	Volumen de elución (mL)	% Carbofurano eluido
Ácido cítrico 0.01 M	25 ^a	18 ^e
	50 ^a	21 ^e

Ac.cítrico 0.01 M - %Metanol		
4	25 ^a	33 ^e
	50 ^a	9 ^d
10	15 ^b	8 ^d
	25 ^a	17 ^d , 39 ^e
	35 ^b	23 ^d
	50 ^b	29 ^d , 99 ^e
56	5 ^a	31 ^d
64	5 ^a	57 ^d
64	8	99 ^d

H ₂ O - %Metanol		
64	3 ^a	11 ^d
	5 ^b	55 ^d
	7 ^a	90 ^d
	7.5 ^a	95 ^d
	8 ^a	100 ^d
	3 ^a	100 ^d
76		

- a) Volumen de carga de 25 mL con 100 ng de carbofurano
- b) Volumen de carga de 25 mL con 150 ng de carbofurano
- c) Volumen de carga de 100 mL con 150 ng de carbofurano
- d) Inmunoadsorbente preparado recientemente
- e) Inmunoadsorbente utilizado previamente en más de 25 ensayos

ANEXO III

Parámetros de desempeño en la validación de métodos analíticos

PARÁMETRO DE DESEMPEÑO	CONTENIDO / POTENCIA / VALORACIÓN	PRUEBAS DE IMPUREZAS		
		CONTENIDO / VALORACIÓN	LÍMITE	IDENTIFICACIÓN
PRECISIÓN / ADECUABILIDAD DEL SISTEMA	SI	SI	SI	*
LINEALIDAD DEL SISTEMA	SI	SI	NO	NO
ESPECIFICIDAD ¹	SI ³	SI	SI	SI
EXACTITUD Y REPETIBILIDAD	SI	SI	NO	NO
LINEALIDAD DEL MÉTODO	SI	SI	NO	NO
PRECISIÓN DEL MÉTODO O PRECISIÓN INTERMEDIA ²	SI	SI	NO	NO
ESTABILIDAD ANALÍTICA DE LA MUESTRA ²	*	*	NO	NO
LÍMITE DE DETECCIÓN	NO	NO	SI	NO
LÍMITE DE CUANTIFICACIÓN	NO	SI	NO	NO
ROBUSTEZ	*	*	*	NO
TOLERANCIA	*	*	*	NO

* PUEDE SER REQUERIDO DEPENDIENDO DE LA NATURALEZA DEL MÉTODO

1. La falta de especificidad de un método analítico puede ser compensada por otra alternativa analítica de soporte, como por ejemplo cromatografía en capa fina.

2. También es definido como un estudio de tolerancia.

3. Un método que es exacto, repetible y lineal, por definición es específico con respecto al placebo o a los otros componentes de la muestra.

A continuación se presenta un glosario de definiciones de los términos comúnmente utilizados en la validación de métodos analíticos:

Adecuabilidad del sistema.- Propiedad de reproducibilidad y resolución que permiten verificar si un sistema de análisis es adecuado para la ejecución del método analítico.

Analito.- Es el componente específico a cuantificar o identificar en un análisis químico.

Calibración.- Conjunto de operaciones que tiene por finalidad determinar los errores de un instrumento para medir y, de ser necesario, otras características metroológicas.

Desviación estándar.- Es la medida de dispersión de un conjunto de valores respecto de su valor promedio.

Coefficiente de variación.- Es el valor que resulta de dividir la desviación estándar entre el promedio multiplicada por 100. Al coeficiente de variación también se le conoce como desviación estándar relativa.

Especificidad.- Es la característica de un método analítico para obtener una respuesta debida únicamente al analito de interés y no a otros componentes de la muestra.

Estabilidad Analítica de la Muestra.- Propiedad de una muestra preparada para su cuantificación, de conservar su integridad fisicoquímica, microbiológica y la concentración del analito, después de almacenarse durante un tiempo determinado bajo condiciones específicas.

Evaluación Retrospectiva de Métodos Analíticos.- Estudio basado en la información histórica de un método analítico, que permite evaluar la precisión y exactitud de dicho método analítico.

Exactitud.- Expresa la concordancia entre el valor obtenido y valor conocido del analito en las muestras, al analizar aplicando un método analítico. Generalmente se expresa como porcentaje de recobro.

Linealidad.- Es la habilidad de un sistema o de un método analítico para asegurar que los resultados obtenidos directamente o por medio de una transformación matemática bien definida, son proporcionales a la concentración del analito, dentro de un intervalo definido.

Límite de detección.- Es la mínima cantidad de analito en una muestra que puede ser detectado, pero no necesariamente cuantificado bajo las condiciones de operación establecidas.

Límite de cuantificación.- Es la mínima cantidad de analito en una muestra que puede ser cuantificado con una precisión y exactitud aceptables, bajo las condiciones de operación establecidas. El límite de cuantificación es un parámetro de contenidos cuantitativos a bajos niveles de concentración del analito en la muestra y es usado particularmente en la determinación de impurezas y/o productos de degradación.

Matriz Analítica.- Muestra de constitución conocida que se emplea en la validación de métodos analíticos, que contiene todos los componentes de la muestra a excepción del analito.

Método Analítico.- Descripción de una o más técnicas en las cuales se identifican los recursos materiales, la secuencia de actividades y procedimientos normalizados de operación.

Métodos Analíticos Desarrollados Internamente en el Laboratorio.- Son los métodos desarrollados por el propio laboratorio.

Métodos Analíticos de Identificación.- Métodos que incluyen pruebas de barrido en el IR, calorimetría de exploración diferencial (CED), difracción de rayos X, barrido en el UV, tiempo de retención en CLAR, colorimetría, etc.

Métodos Analíticos de Contenido.- Métodos que permiten cuantificar el analito, que puede ser el activo, conservadores, excipiente o impureza entre otras.

Métodos Límite.- Métodos que permiten determinar la presencia o ausencia de un analito (ej.: impureza).

Métodos Analíticos no Oficiales.- Son aquéllos que aparecen en la literatura técnica reconocida.

Muestra Analítica.- Es la cantidad representativa de un lote, que es objeto de evaluación en un laboratorio de control de calidad.

Matriz Analítica Adicionada.- Muestra de constitución conocida, que se emplea en la validación de métodos analíticos, que contiene además de los componentes de la muestra, una cantidad conocida del analito.

Precisión.- Expresa la concordancia entre resultados analíticos individuales, cuando el procedimiento se aplica repetidamente a diferentes muestreos de una muestra homogénea del producto. La precisión puede considerarse a tres niveles: repetibilidad, precisión intermedia y reproducibilidad y generalmente se expresa como coeficiente de variación.

Protocolo de Validación.- Documento de un plan retrospectivo o prospectivo experimental que, cuando es llevado a cabo, está encaminado a producir evidencia documentada de que una metodología analítica ha sido validada.

Repetibilidad.- Expresa la precisión bajo las mismas condiciones de operación en un intervalo corto de tiempo. También se le conoce como precisión intra contenido.

Precisión intermedia.- Expresa la precisión con diferentes analistas y en días diferentes.

Recobro.- Cuantificación de la cantidad conocida del analito, determinado en el placebo analítico adicionado o muestra adicionada, empleando el método analítico de interés.

Reproducibilidad.- Expresa la precisión entre laboratorios diferentes.

Revalidación.- Repetición de la validación de una metodología analítica o parte de ésta.

Rango.- Es el intervalo entre los niveles de concentración alta y baja del analito, estudiadas en la linealidad.

Robustez.- Es la capacidad del método para proporcionar resultados confiables al realizar cambios internos en los parámetros del método (por ejemplo: pH de la fase móvil, polaridad de fase móvil, relación de solventes, velocidad de flujo, presión, etc.).

Tolerancia.- Grado de reproducibilidad de los resultados analíticos obtenidos por el análisis de la misma muestra bajo modificaciones externas al método como diferentes proveedores de reactivos, diferentes tipos de columnas, diferentes equipos, sistemas de elución, condiciones ambientales, estabilidad de la lectura, diferentes analistas, etc

BIBLIOGRAFIA

1. The Conservation Foundation. *Agriculture and the environment in a changing world economy*. Washington, D.C., 1986.
2. SEMARNAP-INE. *Lo que usted debe saber sobre los plaguicidas*, en Serie Plaguicidas No. 1, México, 1999.
3. M. Jokanovic, M. Maksimovic. Abnormal cholinesterase activity: Understanding and interpretation. *Eur. J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* 1997, 35: 6-11.
4. M. Lifshitz, E. Shahak, A. Bolotin, et al. Carbamate poisoning in early childhood and in adults. *Clin. Toxicol.* 1997, 35: 7-25.
5. J. Ortega Ceseña, F. Espinosa Torres, L. López Carrillo. El control de los riesgos para la salud generados por los plaguicidas organofosforados en México: Retos ante el tratado de libre de comercio. *Salud Pública de México* 1994, 36(6): 624-632.
6. A. Barud. *Reporte Final: Inventario de Plaguicidas Agrícolas Usados en la Frontera México-Estados Unidos*. Organización Panamericana de la Salud (OPS), Oficina de Campo México-Estados Unidos, 2003, pp. 1-20.
7. Comisión Intersecretarial para el Control del Proceso y Uso de Plaguicidas, Fertilizantes y Sustancias Tóxicas CICOPLAFEST (Semarnap, Secretaría de Comercio y Fomento Industrial, Secretaría de Ganadería y Desarrollo Rural, Secretaría de Salud). Catálogo Oficial de Plaguicidas, 2004.
8. Información del Departamento de Sanidad del Gobierno Vasco y de Osakidetza, el servicio vasco de salud. España. http://www.osanet.euskadi.net/es/contenidos/informacion/sanidad_alimentaria/es_1247/adjuntos/vigila9509.
9. O.M.S. *Toxicology of Pesticides Interim Document 9*. Copenhagen, 1982. Real Decreto 3349/83, España, 1983.
10. Instituto Nacional de Ecología. Catálogo Oficial de Plaguicidas, 2004.
11. Subsecretaría de Recursos Hídricos de la Nación. *Desarrollo de niveles guía nacionales de calidad de agua ambiente correspondientes a carbofurano*. República Argentina, 2003, I.1-XI.1.
12. G.S. Nunes, D. Barceló. Analysis of carbamate insecticides in foodstuffs using chromatography and immunoassay techniques. *Trends Anal. Chem.* 1999, 18 (2): 99-107.
13. J.W. Munch. *Measurement of N-methylcarbamoyloximes and N-methylcarbamates in water by direct aqueous injection HPLC with post column derivatization*. USEPA Method 531.1, rev. 3.1, 1995.
14. Murugesu Ramasamy. A colorimetric method for the determination of eight carbamate insecticide residues. *Pesticide Sci.* 1974, 5 (4): 383-391.

15. M. Rasul Jan, J. Shah, H. Khan. Investigation of new indirect spectrophotometric method for the determination of carbofuran and carbamate pesticides. *Chemosphere* 2003, 52: 1623-1626.
16. Y. Ni, P. Qiu, S. Kokot. Simultaneous voltammetric determination of four carbamate pesticides with the use of chemometrics. *Anal. Chim. Acta.* 2005, 537: 321-330.
17. J.F. Huertas Pérez, L. Gámiz Gracia, A.M. García Campana, A. González Casado, J.L. Martínez Vidal. Chemiluminescence determination of carbofuran at trace levels in lettuce and waters by flow-injection analysis. *Talanta* 2005, 65: 980-985.
18. M.J. Santos Delgado, S. Rubio Barroso, G.T. Fernández Tostado, L.M. Polo Díez. Stability studies of carbamate pesticides and analysis by gas chromatography with flame ionization and nitrogen phosphorus detection. *J. Chromatogr. A* 2001, 921: 287-296.
19. M.J. Climent, M.A. Miranda. Gas chromatographic-mass spectrometric study of photodegradation of carbamate pesticides. *J. Chromatogr. A* 1996, 738: 225-231.
20. M.P. García de Llasera, M. Bernal González. Presence of carbamate pesticides in environmental waters from the northwest of Mexico: Determination by liquid chromatography. *Wat. Res.* 2001, 35 (8): 1933-1940.
21. A. Abad, M.J. Moreno, A. Montoya, Development of monoclonal antibody-based immunoassays to the N-methylcarbamate pesticide carbofuran, *J. Agric. Food Chem.* 1999, 47: 2475-2485.
22. A. Abad, M.J. Moreno, A. Montoya, A monoclonal immunoassay for carbofuran and its application to the analysis of fruit juices, *Anal. Chim. Acta* 1997, 347: 103-110.
23. B. Mickova, T. Kovalczuk, P. Rauch, M.J. Moreno, A. Abad, A. Montoya, E. Ferri, F. Fini, S. Girotti. Analytical performances of validated chemiluminescent enzyme immunoassays to detect N-methylcarbamate pesticides. *Anal. Chim. Acta* 2005, 528: 243-248.
24. D. Barceló. Environmental Protection Agency and other methods for the determination of priority pesticides and their transformation products in water. *J. Chromatogr.* 1993, 643: 117-143.
25. J.F. Lawrence, C. Ménard, M.C. Hennion, V. Pichon, F. Le Goffic, N. Durand. Use of immunoaffinity chromatography as a simplified cleanup technique for the liquid chromatographic determination of phenylurea herbicides in plant material. *J. Chromatogr. A* 1996, 732: 277-281.
26. J.F. Lawrence, C. Ménard, M.C. Hennion, V. Pichon, F. Le Goffic, N. Durand. Evaluation of immunoaffinity chromatography as a replacement for organic solvent clean-up of plant extracts for the determination of triazine herbicides by liquid chromatography. *J. Chromatogr. A.* 1996, 752: 147-154.
27. J. Porath, R. Axen, S. Ernback, Chemical coupling of proteins to agarose, *Nature* 1967, 215: 1491-1492.
28. R. Jansson. *Affinity Chromatography: Principles and Methods.* Handbook Amersham Biosciences, No 18-1022-29, Edition AD, 2006, 7-19.

29. D. Tsikas. Affinity chromatography as a method for sample preparation in gas chromatography / mass spectrometry. *J. Biochem. Biophys. Methods.* 2001, 49: 705-731.
30. A. Dankwardt. *Immunochemical Assays in Pesticide Analysis* in *Encyclopaedia of Analytical Chemistry*. John Wiley & Sons Ltd., Chichester, 2000, pp. 1-27.
31. S. Guomin, C. Lipton, J. Shirley, B.D. Hammock. *Handbook of Residue Analytical Methods for Agrochemicals*. John Wiley & Sons Ltd., Chichester, 2002, pp. 623-679.
32. M.M. Rhemrev-Boom, M. Yates, M. Rudolph, M. Raedts. (Immuno)affinity chromatography: a versatile tool for fast and selective purification, concentration, isolation and analysis. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2001, 24: 825-883.
33. D. A. Blake, R.C. Blacke II, M. Khosraviani, A.R. Pavlov. Immunoassay for metal ions. *Anal. Chim. Acta* 1998, 376: 13-19.
34. D. Stevenson. Immuno-affinity solid-phase extraction. *J. Chromatogr. B.* 2000, 745: 39-48.
35. N. Delaunay-Bertoncini, M.C. Hennion. Immunoaffinity solid-phase extraction for pharmaceutical and biomedical trace-analysis-coupling with HPLC and CE – perspectives. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2004, 34: 717-736.
36. S. Ben Rejeb, C. Cléroux, J.F. Lawrence, P.Y. Geay, S. Wu, S. Stavinski. Development and characterization of immunoaffinity columns for the selective extraction of a new developmental pesticide: Thifluzamide, from peanuts. *Anal. Chim. Acta* 2001, 432: 193-200.
37. V. Camel. Solid phase extraction of trace elements. *Spectrochim. Acta Part B* 2003, 58: 1177-1233.
38. M.C. Hennion, V. Pichon. Immuno-based sample preparation for trace analysis. *J. Chromatogr. A* 2003, 1000: 29-52.
39. I. Ferrer, M.-C. Hennion, D. Barceló. Immunosorbents coupled on-line with liquid chromatography / atmospheric pressure chemical ionization / mass spectrometry for the part per trillion level determination of pesticides in sediments and natural waters using low preconcentration volumes, *Anal. Chem.* 1997, 69: 4508-4514.
40. M. Bouzige, V. Pichon, M.-C. Hennion, Class-selective immunosorbent for trace-level determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in complex sample matrices, used in off-line procedure or on-line coupled with liquid chromatography / fluorescence and diode array detections in series. *Environ. Sci. Technol.* 1999, 33: 1916-1925.
41. M. Bouzige, P. Legeay, V. Pichon, M.-C. Hennion, Selective on-line immunoextraction coupled to liquid chromatography for the trace determination of benzidine, congeners and related azo dyes in surface water and industrial effluents, *J. Chromatogr. A* 1999, 846: 317-329.
42. J. E. Schiel, R. Mallik, S. Soman, J.S. Krina, D.S. Hage. Applications of silica supports in affinity chromatography. *J. Sep. Sci.* 2006, 29 : 719-737.
43. W. Clarke, J.D. Beckwith, A. Jackson, B. Reynolds, E.M. Karle, D.S. Hage. Antibody immobilization to high-performance liquid chromatography supports. Characterization of

- maximum loading capacity for intact immunoglobulin G and Fab fragments. *J. Chromatogr. A* 2000, 888: 13-22.
44. J.M. Van Emon, C.L. Gerlach, K. Bowman. Bioseparation and bioanalytical techniques in environmental monitoring. *J. Chromatogr. B* 1998, 715: 211-228.
 45. W. Jin, J.D. Brennan. Properties and applications of proteins encapsulated within sol-gel derived materials. *Anal. Chim. Acta* 2002, 461: 1-36.
 46. V. Pichon, M. Hennion, R. Daniel, D. Barceló. Preparation and evaluation of immunosorbents for selective trace enrichment of phenylurea and triazine herbicides in environmental waters. *Anal. Chem.* 1995, 67: 2451-2460.
 47. S. Ben Rejeb, N. Durand, A. Martel, B. Poulennec, J. Lawrence, M.-C. Hennion, F. Le Goffic. Development of anti-phenylurea antibody purification techniques for improved environmental applications. *Anal. Chim. Acta* 1998, 376: 41-48.
 48. N. Delaunay, V. Pichon, M.-C. Hennion. Immunoaffinity solid-phase extraction for the trace-analysis of low-molecular-mass analytes in complex sample matrices. *J. Chromatogr. B* 2000, 745: 15-37.
 49. G. S. Rule, A. V. Mordehal, I. Henion. Determination of carbofuran by on-line immunoaffinity chromatography with coupled-column liquid chromatography / mass spectrometry. *Anal. Chem.* 1994, 66: 230-235.
 50. J.C. Vázquez-Lira, E. Camacho-Frías, A. Peña-Alvarez, L.E. Vera-Avila. Preparation and characterization of a sol-gel immunosorbent doped with 2,4-D antibodies. *Chem. Mater.* 2003, 15: 154-161.
 51. L.E. Vera-Avila, J.C. Vázquez-Lira, M. García de Llasera, R. Covarrubias-Herrera. Sol-gel immunosorbents doped with polyclonal antibodies for the selective extraction of malathion and triazines from aqueous samples. *Environ. Sci. Technol.* 2005, 39: 5421-5426.
 52. C. Stalikas, D. Knoop, R. Niessner. Sol-gel glass immunosorbent based determination of s-triazines in water and soil samples using gas chromatography with a nitrogen phosphorus detection system. *Environ. Sci. Technol.* 2002, 36: 3372-3377.
 53. X. Zhang, D. Martens, P. M. Kramer, A.A. Kettrup, X. Liang. Development and application of a sol-gel immunosorbent-based method for the determination of isoproturon in surface water. *J. Chromatogr. A* 2006, 1102: 84-90.
 54. A. Malik. Advances in sol-gel based columns for capillary electrochromatography: Sol-gel open-tubular columns. *Electrophoresis* 2002, 23: 3973-3992.
 55. I. Gill, A. Ballesteros. Bioencapsulation within synthetic polymers (Part 1): sol-gel encapsulated biologicals, *Trends Biotechnol.* 2000, 18: 282-296.
 56. L.E. Vera-Avila, L. Rangel-Ordoñez, R. Covarrubias-Herrera. Evaluation and characterization of a commercial immunosorbent cartridge for the solid-phase extraction of phenylureas from aqueous samples. *J. Chromatogr. Sci.* 2003, 41: 480-488.
 57. A. Bronshtein, N. Aharonson, D. Avnir, A. Turniansky, M. Altstein. Sol-gel matrixes doped with atrazine antibodies: atrazine binding properties. *Chem. Mater.* 1997, 9: 2632-2639.

58. M. Reina, Universidad de Barcelona, España. <http://www.ub.es/biocel/wbc/tecnicas/anticuerpos.htm>
59. A. Oubiña, J. Gascón, D. Barceló. Multianalyte effect in the determination of cross-reactivities of pesticide immunoassays in water matrices. *Anal. Chim. Acta* 1997, 347: 121-130.
60. Reviewer Guidance, Validation of Chromatographic Methods. US CDER, FDA, November 1994.
61. Guideline for submitting samples and analytical data for methods validation. US FDA, February 1987.
62. Guidance for Industry Q2B Validation of Analytical Procedures: Methodology. ICH, November, 1996
63. Guideline for Industry Q2A Text on Validation of Analytical Procedures. ICH, March, 1995.
64. Draft Guidance for Industry Analytical Procedures and Methods Validation, US DHHS, FDA, CDER, CBER, August 2000.
65. A. Alcántara Pineda, R. Rodríguez. Guía de validación de Métodos Analíticos, Editada por el Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos de México, A. C., México, 2002.
66. L. Huber. Validation of HPLC Methods. *Biopharm.* 1999, 12: 64-66.
67. H.Y. Aboul-Enein. Selectivity versus specificity in chromatographic analytical methods. *Accred. Qual. Assur.* 2000, 5: 180-181.
68. B. Lesnik. *Immunoassay Techniques in Environmental Analyses*, in *Encyclopaedia of Analytical Chemistry*. John Wiley & Sons Ltd., Chichester, 2000, pp. 2653-2672.
69. Control of Pesticides Regulations (COPR). Guidelines for validation of analytical methods for non-agricultural pesticide active ingredients and products. Great Britain, 1986.
70. T.L. Fare, R.G. Sandberg, D.P. Herzog. *Considerations in immunoassay calibration* in *Environmental Immunochemical Methods*. ACS Symposium Series 1996, 646: 240-253.
71. J. Dalluge, T. Hankemeier, R.J.J. Vreuls, U.A.Th. Brinkman. On-line coupling of immunoaffinity-based solid-phase extraction and gas chromatography for the determination of s-triazines in aqueous samples. *J. Chromatogr. A* 1999, 830: 377-386.
72. US EPA. Method 4000: Immunoassay, 1996, pp. 1-9.
73. J.C. Vázquez Lira. Tesis de doctorado: Desarrollo, evaluación y caracterización de inmunoabsorbentes para la extracción en fase sólida de pesticidas a partir de muestras acuosas y su determinación por cromatografía de líquidos. Facultad de Química, UNAM, 2003.
74. G.A. Zelada Guillén. Tesis de licenciatura: Preparación de inmunoabsorbentes sol-gel a partir de diferentes anticuerpos monoclonales anti-carbofurano y su evaluación por cromatografía de líquidos. Facultad de Química, UNAM, 2005.
75. R. Wang, V. Narang, P.N. Prasad, F.V. Bright. Affinity of antifuorescein antibodies encapsulated within a transparent sol-gel glass. *Anal. Chem.* 1993, 65, 2671-2675.

76. S.A. Rodríguez, L.A. Colón. Investigations of sol-gel derived stationary phase for open tubular capillary electrochromatography. *Anal. Chim. Acta* 1999, 397: 207-215.
77. A.J. Lecloux, J.P. Pirad. High-temperature catálisis through sol-gel synthesis. *J. Non-Cryst. Solids* 1998, 225: 146-152.
78. R.A. Dunbar, J.D. Jordan, F.V. Bright. Development of chemical sensing platforms based on sol-gel derived thin films: origin of films age vs performance trade-offs. *Anal. Chem.* 1996, 68: 604-610.
79. D. Macías Mendoza. Tesis de maestría: Desarrollo de un método para la determinación de trazas de carbofurano y 7-fenolcarbofurano en tejido biológico mediante un sistema de preconcentración y análisis cromatográfico en línea. Facultad de Química, UNAM, 2005.
80. M. Bernal González. Tesis de maestría: Determinación simultánea de plaguicidas carbamatos en muestras de acuíferos provenientes de una zona agrícola. Facultad de Química, UNAM, 2000.
81. M. Cichna, P. Markl, D. Knopp, R. Niessner. On line coupling of sol-gel - generated immunoaffinity columns with high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. A.* 2001, 919: 51-58.