

CO 577  
134 3



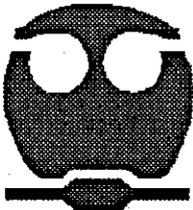
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN  
CIENCIAS QUÍMICAS

**ESTUDIO DE UN INMUNOADSORBENTE  
ESPECÍFICO PARA HERBICIDAS FENILURÉICOS  
Y SU EVALUACIÓN COMO TÉCNICA ALTERNATIVA  
DE EXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA**

**T E S I S  
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRA EN CIENCIAS QUÍMICAS  
(QUÍMICA ANALÍTICA)  
P R E S E N T A  
Q. F. B. LAURA RANGEL ORDÓÑEZ**

**DIRECTORA DE TESIS: Dra. Luz Elena Vera Ávila**



MÉXICO, D. F.

JUNIO 2002

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**



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.

## **JURADO ASIGNADO**

**Presidente**                      **Dr. Rafael Navarro González.**

**Primer Vocal**                      **M. en C. Lilia Castro Ortiz.**

**Secretario**                      **Dr. Rogelio Pereda Miranda.**

**Primer Suplente**                      **Dra. Martha Patricia García Camacho.**

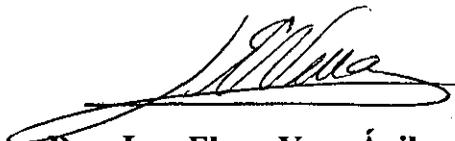
**Segundo Suplente**                      **Dra. Evangelina Camacho Frías.**

**Lugar donde se desarrolló el tema:**

**Laboratorio de Cromatografía de Líquidos del Alta Resolución,  
Departamento de Química Analítica, División de Estudios de Posgrado,  
Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México.**



**Q. F. B. Laura Rangel Ordóñez**  
**SUSTENTANTE**



**Dra. Luz Elena Vera Ávila**  
**ASESORA**

---

## AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional para la Ciencia y la Tecnología (CONACYT) y a la Dirección General de Estudios de Posgrado (DGEP) por las becas que me otorgaron para realizar mis estudios de maestría.

A la Dirección General de Estudios de Posgrado por el financiamiento para la presentación de resultados en el XV Congreso Nacional de Química Analítica y en la Primera Reunión Académica de Posgrado.

A la Universidad Nacional Autónoma de México, recinto donde viví las más importantes bases para mi realización profesional, académica y personal, y por dar el alimento del saber a aquellos que con entusiasmo buscan el conocimiento, la superación y el desarrollo.

A la Facultad de Química de la UNAM, mi casa desde pequeña, por recibirme en su seno, por darme las capacidades de ser lo que ahora soy, y por brindarme la confianza para formar parte de ella.

---

---

## AGRADECIMIENTOS

Deseo agradecer, con profundo respeto y admiración, a la Dra. Luz Elena Vera Ávila, apoyarme para ser parte del Posgrado. Doctora Luz Elena: gracias por haber confiado en mí aún cuando la situación parecía no tener "futuro", por aceptarme para formar parte de su equipo de trabajo, por el apoyo y la orientación que me brindó para la realización de esta tesis, por la paciencia y por haber creído en mí aún en los tiempos difíciles o no tan fáciles. De todo corazón mil gracias.

A la Maestra Rosario Covarrubias Herrera, gracias por ser parte de mí, por su cariño, amor y dedicación, por la inmensa paciencia y apoyo a todas las personas que la necesitan, por la amistad y la familiaridad. Muchísimas gracias.

Al Departamento de Química Analítica que por tanto tiempo me ha acurrucado y mimado en su regazo, a mis profesores y amigos del Departamento, gracias por la confianza, gracias por las enseñanzas, gracias por creer en mí y dejarme hacer mis pininos; por enseñarme el camino y llevarme por él... por dejarme donde ahora estoy y por darme la confianza de saber que puedo continuar sola por él... Al Ing. Luis Antonio Tapia quien también me "crió" durante un tiempo. Muy, muy especialmente al Dr. Octavio Reyes Salas... sabes todo lo que significas para mí en mi vida personal y profesional...sin más, Gracias.

---

---

## DEDICATORIAS

Siento que estas líneas no expresan completamente la emoción, el amor, el cariño y el agradecimiento que tengo a todas las personas que han estado conmigo durante este lapso de mi permanencia en el Posgrado, sin embargo quiero mencionar a algunas personas que significan mucho para mí y a las cuales quiero dedicar este trabajo porque finalmente el esfuerzo y el resultado que de él emana es también parte de ustedes.

En primer lugar quiero dedicar este trabajo a mi mamá, Gloria Ordóñez, por darme la vida, por quererme, aún como soy... por los cuidados, el apoyo, la confianza, por dejarme volar, y caer, y volver a emprender el vuelo... gracias por los sacrificios, por los desvelos, porque sé que no duermes preocupándote y deseando todo lo bueno para tus hijos... y sin embargo por dejar que aprendamos por nosotros mismos... Por la libertad. Gracias mamá. Siempre tendrás lo mejor de mí.

A mi papá Rodolfo Rangel (†)... las lágrimas invaden mis ojos al recordar tu última expresión de satisfacción, alegría y orgullo al verme realizada y al saber que el futuro me deparaba buenas y nuevas experiencias... Por sembrar en mí la sed del conocimiento y la verdad.

A mis hermanos, por la inmensa y deliciosa gama de matices... porque todos me han dado el fruto de vivir tantas vidas en una. A Germán... por haberme dejado crecer y caminar sola... por dejarme aprender por mi propio esfuerzo pero estando al lado mío todo el tiempo, por si necesitaba poco de ayuda...tqm. A Herme...por los cuentos, por la música, y por supuesto... por ser y comportarse como Mi hermana... Gracias a Rodolfo, por las diferencias... resultado de eso, en parte, es que ahora estoy aquí. A Edgar, Gaga...perdón por no saber hablar bien, pero te dejé un legado no tan malo creo (pudo haber sido peor)...sabes que te quiero mucho y que deseo estar contigo en todos tus triunfos, en las buenas y en las malas cuenta siempre conmigo... Adelante! A Angelito y Jaimy I, por estar conmigo siempre... por apoyarme, por amarme a través de las distancias... porque aún de lejos siento su calor. A Pablo, por ser una vez mi cómplice, por hacerme reflexionar. A Victor... por consentirme y quererme sin condiciones, por respetarme y creer en mí, gracias por tu apoyo desde allá. A todos ustedes por enseñarme tanto y, aunque no lo soy, por mimarme y hacerme sentir como el último escalón de La Escalera. A mis cuñadas(o) y sobrinos(as) quienes son parte de mis alegrías, mis tristezas, mis aventuras, finalmente de Mi Vida... a todos los que me han apoyado... A Goga....por esta genial y divertida experiencia que hemos compartido... sabes que ha sido maravillosa, he aprendido muchísimo de ti.. Te deseo lo mejor... desde mi corazón para ti, Con Amor.

---

---

## DEDICATORIAS

A Laurita (Obi), Lauritita (Obibita) y Gustavo... gracias por permitirme ser parte de su familia... porque fueron un apoyo importante para mí en esta etapa. Laurita... gracias sobre todo por ser mi Amiga... por todo lo que hemos compartido y aún nos falta por compartir. Siempre estaremos juntas.

A Rocío Hernández Ramírez... todavía eres parte de mí, muy importante, aunque no lo parezca y no lo diga. Te recuerdo con mucho cariño.

Al José Luis Meraz que conozco y que quiero. No sé dónde estás (también soy responsable), pero gracias por ser mi amigo, por ayudarme a emprender este camino, por apoyarme en momentos muy difíciles. Ojalá que vuelvas.

A mis compañeros de la Maestría en Química Analítica, por que aprendí también a través de sus experiencias, y sobre todo a José Antonio Bautista porque te siento casi como un compañero exclusivo... Mi respeto y admiración para cada uno de ustedes.

A mis "viejas" y "nuevas" amigas... Helen, por la inolvidable y ardua aventura que comenzamos juntas; Norma, por el buen "equipo" que formamos... y a Rafa. Por renovar esta amistad después del tiempo.

A Carlos, *incancellabile irul*, por haber sido parte de mí, *un'altra storia che il tempo porta via con se...* por tus risas (culpables) que comenzaron todo, por un'altra *canzone fresca que sarà fra noi...* por tus silencios, tu mirada, tu ternura (que niegas tener), y también por ser un poco vmta.

A mis amigos con los que he vivido momentos espectaculares e inolvidables, Juan Carlos, gracias por estar conmigo y por la confianza que me haces sentir, a Ade, Lis y por supuesto a Goga... ya saben por qué... y además por dejarme experimentar toda una vida en este corto tiempo... a Valente y a Dante y Gonzalo por unirse a la aventura...

De forma *specially special* a una persona que, a pesar de todos los altibajos, desacuerdos, enojos, regañíos, tristezas, llantos, angustias, me ha apoyado, querido y confiado en mí como ninguna otra persona. José Luis... gracias por todo... y digo POR TODO... por estar conmigo SIEMPRE, y por como dije antes, en serio siempre eres la última persona en la que pienso (sabes en que sentido lo digo)... Gracias infinitas por apoyarme, por jalarme las orejas cuando ha sido necesario pero también por respetar mis decisiones y por las pomas y el aliento que siempre me das sin parquedad. Por vivir mis experiencias y porque no tengamos nada nuevo de que hablar cuando volvamos a vernos. TQM.

A todas aquellas personas que están en una búsqueda continua y que se empeñan y esfuerzan por alcanzar sus metas e ideales.

---

## CONTENIDO

Contenido.....	i
Índice de figuras.....	iv
Índice de tablas.....	vi
Resumen.....	1
Summary.....	2
Introducción.....	3
Objetivo general.....	6
Objetivos específicos.....	6
<b>CAPÍTULO 1. GENERALIDADES.....</b>	<b>7</b>
1.1. Extracción en fase sólida (EFS).....	7
1.2. Adsorbentes para EFS.....	8
1.2.1. Sílices modificadas.....	9
1.2.2. Adsorbentes poliméricos.....	10
1.2.3. Intercambiadores iónicos.....	11
1.2.4. Carbón grafitizado.....	12
1.2.5. Fases reversas de superficie interna.....	13
1.2.6. Polímeros impresos.....	14
1.3. Métodos inmunológicos. Reacción antígeno-anticuerpo.....	16
1.3.1. Estructura de los anticuerpos.....	17
1.3.2. El papel de los anticuerpos.....	19
1.3.3. La reacción antígeno-anticuerpo.....	20
1.4. Cromatografía de afinidad (Bioafinidad).....	23
1.4.1. Preparación de la columna.....	26
1.4.2. Condiciones de operación alternativas.....	27
1.4.3. Cromatografía de inmuoafinidad.....	28
1.4.4. Inmunoadsorbentes.....	29
1.5. Plaguicidas.....	33
1.5.1. Herbicidas.....	35
1.5.2. Herbicidas feniluréicos.....	37
1.5.3. Métodos de análisis de herbicidas feniluréicos.....	39

<b>CAPÍTULO 2. DESARROLLO EXPERIMENTAL</b> .....	42
2.1. Equipo y accesorios.....	42
2.2. Disolventes y reactivos.....	43
2.3. Preparación de disoluciones.....	44
2.4. Metodología.....	45
2.4.1. Condiciones cromatográficas.....	45
2.4.2. Caracterización del inmunoabsorbente.....	45
2.4.2.1. Condiciones para la elución.....	47
2.4.2.2. Condiciones para la preconcentración.....	48
2.4.2.3. Método preliminar.....	49
2.4.2.4. Reactividad cruzada.....	49
2.4.3. Establecimiento y evaluación estadística de un método analítico para la determinación de trazas de isoproturón y diurón en muestras de agua.....	51
2.4.3.1. Establecimiento del método.....	51
2.4.3.2. Evaluación estadística del método.....	51
2.4.4. Estudio comparativo de la estabilidad de los analitos en el cartucho y en muestras acuosas.....	52
2.4.5. Aplicación del método a muestras reales.....	52
<b>CAPÍTULO 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....	54
3.1. Condiciones cromatográficas.....	54
3.1.1. Separación cromatográfica.....	54
3.1.2. Linealidad de la respuesta del detector.....	56
3.2. Caracterización del inmunoabsorbente.....	57
3.2.1. Condiciones para la elución.....	57
3.2.1.1. Efecto de la composición del eluyente.....	58
3.2.1.2. Efecto del pH de la mezcla de elución.....	59
3.2.1.3. Efecto de la velocidad de elución.....	60
3.2.1.4. Efecto del volumen de elución.....	60
3.2.1.5. Condiciones óptimas de elución.....	61
3.2.2. Condiciones para la preconcentración.....	61

## CONTENIDO

3.2.2.1. Efecto de la concentración del analito.....	62
3.2.2.2. Efecto de la velocidad de carga.....	68
3.2.2.3. Efecto del volumen de carga.....	69
3.2.2.4. Efecto del pH.....	72
3.2.2.5. Efecto de la concentración del buffer.....	73
3.2.2.6. Condiciones óptimas para la preconcentración.....	75
3.2.3. Capacidad del cartucho.....	75
3.2.4. Método preliminar.....	76
3.2.5. Reactividad cruzada.....	78
3.2.5.1. Adsorción de las fenilureas en cargas independientes.....	78
3.2.5.2. Adsorción de isoproturón en presencia de analitos del mismo grupo funcional....	79
3.2.5.3. Adsorción de isoproturón en presencia de analitos de diferentes grupos funcionales.....	83
3.3. Establecimiento y evaluación estadística de un método analítico para la determinación de trazas de isoproturón y diurón en muestras de agua.....	85
3.3.1. Establecimiento del método.....	85
3.3.2. Linealidad.....	86
3.3.3. Porcentaje de recuperación a diferentes concentraciones del analito en la solución de carga.....	90
3.3.4. Precisión (como repetibilidad), Exactitud, Límite de Detección, y Límite de Cuantificación.....	92
3.4. Estudio comparativo de la estabilidad del Isoproturón en el cartucho y en muestras acuosas.....	96
3.5. Aplicación del método a muestras reales.....	99
Conclusiones.....	109
Bibliografía.....	113

1. Representación esquemática de sílices modificadas para fases normal y reversa.....	9
2. Estructura de resinas poliméricas XAD-4 y SDB.....	11
3. Estructura molecular de intercambiadores iónicos.....	12
4. Corte de la vista interna de un soporte de fase reversa en superficie interna (ISRP-Internal Surface Reversed Phase).....	14
5. Representación esquemática del principio de impresión molecular.....	15
6. Estructura básica de una molécula de inmunoglobulina G.....	18
7. Tipos de interacción antígeno-anticuerpo.....	22
8. Esquema general de un proceso de inmunoextracción.....	30
9. Persistencia de diferentes clases de plaguicidas en suelos.....	36
10. Esquema operacional del sistema cromatográfico utilizado.....	42
11. Separación cromatográfica de fenilureas.....	56
12. Respuesta del detector vs concentración de las seis fenilureas estudiadas.....	57
13. Efecto de la composición del eluyente.....	59
14. Efecto del volumen de elución.....	61
15. Efecto de la concentración de isoproturón en la solución de carga. Cartucho con 13 usos previos.....	63
16. Apariencia de los cartuchos con respecto al número de usos.....	64
17. Efecto de la concentración de isoproturón en la solución de carga. Cartucho con 114 usos previos.....	65
18. Imagen de un frente de migración del soluto.....	66
19. Efecto de la concentración de isoproturón en la solución de carga para un volumen cargado de 1 mL.....	68
20. Efecto del flujo sobre el perfil de concentraciones del frente de migración del soluto.....	72
21. Efecto del volumen de carga.....	74
22. Variación de la recuperación en función del volumen de carga a concentración constante.....	75

## ÍNDICE DE FIGURAS

23. Variación de la recuperación en función del volumen de carga a concentración variable.....	77
24. Efecto del pH en la solución de carga.....	78
25. Efecto de la concentración del buffer en la solución de carga.....	80
26. Esquema de trabajo preliminar para la etapa de extracción en fase sólida.....	83
27. Porcentaje de recuperación de los analitos en cargas independientes.....	84
28. Efecto de la presencia de fluometurón y monurón en la recuperación de isotroturón.....	85
29. Efecto de la presencia de metiocarb y metilparatión en la recuperación de isotroturón a volúmenes de carga variables.....	89
30. Gráfica para la evaluación del intervalo lineal del método.....	93
31. Gráfica para la evaluación del porcentaje de recuperación de los analitos a diferentes concentraciones.....	97
32. Estabilidad de los compuestos en agua pura.....	102
33. Estabilidad de los compuestos en los cartuchos.....	103
34. Cromatogramas correspondientes al análisis de la muestra del agua desionizada.....	106
35. Cromatogramas correspondientes al análisis de la muestra del agua potable.....	107
36. Cromatogramas correspondientes al análisis de la muestra del agua de río.....	108
37. Cromatogramas correspondientes al análisis de la muestra del agua subterránea.....	109
38. Evaluación de la estabilidad de los analitos con respecto al tiempo en las aguas naturales.....	111
39. Recuperación de los analitos en las muestras de aguas naturales.....	113

I.	Características de las inmunoglobulinas.....	19
II.	Tipos de solutos y ligandos en las reacciones de bioafinidad.....	24
III.	Clasificación de la toxicidad de los plaguicidas.....	35
IV.	Clasificación de los herbicidas con base en su grupo funcional.....	37
V.	Características de las fenilureas estudiadas.....	40
VI.	Métodos de análisis de fenilureas.....	41
VII.	Análisis estadístico de las curvas área vs concentración para las fenilureas estudiadas.....	57
VIII.	Recuperación de monurón en presencia de isotroturón.....	86
IX.	Recuperación de las seis fenilureas cargadas simultáneamente.....	87
X.	Efecto del volumen de carga sobre la recuperación de fluometurón, diurón, linurón y neburón cargados simultáneamente.....	87
XI.	Ecuaciones de regresión del estudio de linealidad del método.....	93
XII.	Verificación de la hipótesis nula que establece que las ordenadas de las rectas de regresión pasan por el origen del sistema de coordenadas. Estudio de linealidad.....	95
XIII.	Intervalo de confianza de los coeficientes $a$ de las rectas de regresión. Estudio de linealidad.....	95
XIV.	Ecuación de regresión del estudio del porcentaje de recuperación de los analitos a diferentes concentraciones.....	97
XV.	Parámetros estadísticos para calcular la precisión (s) y el límite de detección del método (LDM).....	99
XVI.	Parámetros estadísticos para determinar la exactitud del método.....	100
XVII.	Límites de cuantificación del método.....	101
XVIII.	Medidas de pH y conductividad de las muestras de agua naturales utilizadas.....	105
XIX.	Estabilidad de los analitos en agua potable.....	112
XX.	Cantidades determinadas de isotroturon y diuron en aguas naturales analizadas por el método establecido.....	113

En el presente trabajo se realiza la evaluación de cartuchos empacados con un soporte de sílice al que previamente se le han unido químicamente anticuerpos específicos contra el herbicida isoproturón, con el fin de ser utilizados en métodos de extracción en fase sólida de herbicidas feniluréicos.

La primera parte del trabajo se enfoca a la separación del grupo de fenilureas estudiado (isoproturón, diurón, fluometurón, linurón, monurón y neburón), determinándose las condiciones óptimas de separación cromatográfica de los analitos por HPLC y las de detección UV para llevar a cabo el análisis de los compuestos.

En la segunda parte se estudia la adsorción y desorción de Isoproturón como analito modelo en el cartucho empacado con el inmunoadsorbente. Para determinar las condiciones óptimas de extracción, preconcentración y elución del compuesto en el inmunoadsorbente se utilizan muestras de agua grado reactivo dopadas con concentraciones conocidas del herbicida. Se establece un método de análisis.

Algunas de las variables estudiadas fueron: concentración del analito en la solución de carga, velocidad y volumen de carga, fuerza iónica y pH de la solución, composición del eluyente, pH del eluyente, volumen de elución y efecto de la presencia de otros solutos en disolución como medida de la especificidad del inmunoadsorbente. El efecto de las variables estudiadas se evalúa con base en el porcentaje de recuperación.

En la tercera parte del trabajo se presenta la evaluación del método analítico propuesto. Se determinan los principales parámetros estadísticos como linealidad, precisión, exactitud, límite de detección, además se estudia la estabilidad de los compuestos.

En la cuarta sección se realiza un estudio de la estabilidad de las fenilureas en agua desionizada y en los cartuchos estudiados, por un lapso de 100 días.

En la última parte del trabajo se aplica el método propuesto a muestras reales de agua superficial, subterránea y potable para observar el efecto de matriz y se realizan los ajustes necesarios al método.

Evaluation of cartridges constituted by anti-isoproturon specific antibodies chemically bonded to a silica support was performed with the purpose of using these cartridges in solid-phase extraction procedures for phenylureic herbicides, previous to their analysis by High Performance Liquid Chromatography (HPLC) with ultraviolet (UV) detection.

The first section is focused to the separation of studied phenylurea compounds (Isoproturon, Diuron, Fluometuron, Linuron, Monuron and Neburon); the optimal conditions for the chromatographic separation of the analites by HPLC and their detection by UV were determined.

In the second section adsorption and desorption of Isoproturon as model analite in immunosorbent packed cartridge is studied. Reactive grade water samples doped with known concentrations of herbicide were used. Optimal conditions for the solid-phase extraction, pre-concentration and elution of the compound from the immunosorbent were determined. A method of analysis was established.

Some of studied parameters included: cartridges capacity, concentration of analites in the percolated solution, rate and volume of percolation, ionic strength and pH of the percolated solution, eluent composition, pH of eluent, elution volume and effect of the presence of other solutes in the dissolution as a measure of immunosorbent specificity. The effect of the studied parameters was evaluated as recovery percentage.

In the third section of this work, evaluation of proposed analytical method is presented; the main statistics parameters such as linearity, exactitude, accuracy, and detection limit were determined, in addition the stability of the compounds was studied.

In the fourth section a study of the phenylureas stability for an interval of 100 days is carried out in deionized water and in the studied cartridges.

In the last section, the method is applied to surface water, ground water and tap water samples in order to observe matrix effect and make the necessary adjustments to the method.

En los últimos años las tecnologías inmunoquímicas han adquirido importancia en el análisis de sustancias contaminantes en el medio ambiente y en alimentos. La necesidad de contar con métodos altamente selectivos y sensibles para poder detectar y en su caso cuantificar contaminantes traza en matrices de este tipo, ha llevado al desarrollo de tecnologías que involucran el uso de moléculas proteicas como los anticuerpos que, por sus características, tienen la capacidad de reaccionar específicamente contra el antígeno que les dio origen. La alta especificidad y sensibilidad que presentan las reacciones del tipo antígeno - anticuerpo ha sido aprovechada en los métodos de análisis para poder detectar sustancias contaminantes en el medio ambiente, eliminando al máximo el efecto interferente de la matriz. En este caso el contaminante de interés representa el antígeno contra el cual pueden desarrollarse anticuerpos en el laboratorio y utilizar estos últimos para después identificar el contaminante mediante reacciones sencillas.

Una de las ventajas que presenta el uso de reacciones antígeno - anticuerpo en el control ambiental es el hecho de que las muestras a analizar requieren de una etapa mínima de pretratamiento ya que, siendo la reacción específica para un tipo determinado de moléculas, otras moléculas que se encuentren en la matriz de la muestra no causarán interferencias importantes en la reacción antígeno - anticuerpo o mejor aún, serán totalmente indiferentes.

El grado de especificidad de la reacción antígeno - anticuerpo dependerá de la forma de obtención de los anticuerpos, la cual a su vez estará condicionada por las aplicaciones deseadas. Así, se pueden producir anticuerpos que actúen específicamente contra un compuesto, o bien contra una serie de compuestos que tengan algún(os) grupo(s) funcional(es) común(es).

Inicialmente, la única manera de obtener anticuerpos era administrando el antígeno a un organismo sensible (conejos, vacas, cerdos, etc.), para provocar una respuesta de su sistema inmunológico, cuya etapa final era la formación de anticuerpos contra el antígeno invasor. Después de la inmunización, se extraía el suero del animal, el cual contenía el

anticuerpo, y mediante diversas etapas de separación y purificación se obtenía el anticuerpo aislado. En los últimos años, el desarrollo de la ingeniería genética y la tecnología del ADN recombinante han permitido la producción a gran escala de diversas moléculas proteicas.<sup>1,2</sup> De esta forma, hoy en día se pueden obtener proteínas como la insulina de la bacteria *Escherichia coli* (*E. coli*) y también diversos tipos de anticuerpos de manera que en un futuro próximo, las perspectivas de obtención de anticuerpos serán ilimitadas.

En sus inicios, el análisis ambiental mediante el uso de anticuerpos se enfocó únicamente a inmunoensayos (ELISA “enzyme-linked immunosorbent assay”, RIA “radio immunoassay”, EIA “enzymatic immunoassay”, etc.).<sup>3</sup> A medida que fue comprobándose la validez de estas técnicas, comparándolas con otros métodos analíticos, y después de rigurosos estudios de validación, su uso fue extendiéndose.<sup>4,38</sup> Actualmente, está aceptado el uso de los inmunoensayos en el control ambiental.

De la misma manera y conforme se fueron conociendo más las ventajas del uso de anticuerpos, se desarrollaron tecnologías innovadoras que acoplaban los métodos instrumentales con los métodos inmunológicos: cromatografía de gases (CG) – inmunoanálisis (IA), espectrometría de masas (EM) – IA,<sup>5,6</sup> cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR o HPLC, del inglés High Performance Liquid Chromatography) – IA,<sup>7-9</sup> fluorescencia – IA, para aprovechar los buenos resultados que se obtenían por cada una de las técnicas, sometiendo también estos acoplamientos a estudios de validación. Se ha demostrado que este tipo de acoplamientos tiene superioridad sobre cada uno de los métodos utilizados independientemente, logrando niveles de detección suficientemente bajos, aún en las matrices más complejas.

En la bibliografía consultada se encuentran diversos tipos de acoplamientos de los métodos instrumentales con los métodos inmunológicos en una amplia gama de configuraciones. Estos incluyen inmunoanálisis previo al estudio instrumental, o bien posterior a él, adaptaciones en línea y adaptaciones fuera de línea o en diferido.

## *INTRODUCCIÓN*

---

La multitud de campos en que se ha introducido la inmunoquímica ha llevado a avances en el modelaje, síntesis y producción de anticuerpos, así como al desarrollo de biosensores y la aplicación de estas técnicas a un gran número de sustancias.

En Canadá y Europa sobre todo, varios grupos han trabajado en el desarrollo de técnicas inmunológicas analíticas para la determinación de plaguicidas. Se han efectuado estudios de validación y en algunos casos se ha llegado a adoptar el uso de este tipo de tecnologías para el análisis ambiental. En efecto, el análisis de contaminantes requiere que los métodos desarrollados para este fin sean capaces de detectar niveles muy bajos de analitos, ya que se trabaja con compuestos traza y las normas de control ambiental sobre este tipo de compuestos así lo determinan.

El presente proyecto está enfocado al análisis ambiental de contaminantes derivados de urea, mediante el uso de la cromatografía de afinidad. En este caso se evaluarán cartuchos constituidos por un soporte de sílice al que se le han unido químicamente anticuerpos específicos para fenilureas, como un método de extracción en fase sólida. Estos cartuchos serán posteriormente utilizados para la extracción y preconcentración de trazas de herbicidas feniluréticos en aguas superficiales y subterráneas, previo a su análisis por HPLC con detección ultravioleta (UV).

## **Objetivo General**

Evaluar inmunoabsorbentes constituidos por un soporte de sílice al que se le han unido químicamente anticuerpos específicos contra el herbicida isoproturón, a fin de ser utilizados como método de extracción en fase sólida de herbicidas fenilureicos, previo al análisis por HPLC con detección ultravioleta (UV), para la detección y cuantificación de estos compuestos en muestras ambientales (agua).

## **Objetivos Específicos**

1. Determinar las condiciones óptimas de detección UV para el grupo de fenilureas estudiado.
2. Poner a punto la separación cromatográfica de los analitos por HPLC.
3. Utilizando muestras de agua grado reactivo dopadas con concentraciones conocidas de los analitos, estudiar la adsorción y desorción de éstos en un cartucho empacado con un inmunoabsorbente específico para fenilureas.
4. Determinar las condiciones óptimas para la extracción en fase sólida, preconcentración y elución de los analitos en el inmunoabsorbente.
5. Con los resultados de los puntos anteriores, establecer y evaluar un método analítico para la determinación de fenilureas en agua.
6. Aplicar el método a muestras reales (aguas subterráneas y superficiales) dopadas con fenilureas y, en su caso, realizar los ajustes necesarios.

### CAPÍTULO 1. GENERALIDADES

#### 1.1 EXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA

Los procedimientos de extracción en fase sólida (EFS) son utilizados en el análisis ambiental no únicamente para extraer y concentrar trazas de compuestos orgánicos de muestras ambientales, sino también para remover los componentes interferentes de la matriz compleja y obtener un extracto lo más limpio posible que contenga los analitos de interés.

Hoy en día, hay un interés considerable en desarrollar métodos más rápidos, simples y selectivos para extraer y aislar componentes de matrices ambientales complejas. En este contexto, la *selectividad* es el grado al cual una técnica de extracción puede separar el analito de las interferencias en la muestra original. Por consiguiente, la selectividad de la fase estacionaria es un parámetro importante a ser tomado en cuenta cuando los compuestos van a ser extraídos a partir de una muestra de agua superficial o algún sedimento, ya que uno de los objetivos principales en la preparación de la muestra es remover interferencias y facilitar el posterior análisis por alguna metodología analítica convencional como HPLC o cromatografía de gases (CG).

Para la determinación de plaguicidas en muestras de agua se ha utilizado ampliamente la extracción en fase sólida con fases poliméricas o con fases químicamente unidas C<sub>18</sub>, seguida por CG o HPLC.<sup>10</sup> Sin embargo, estas fases estacionarias son poco selectivas, por lo que las interferencias coextraídas de las matrices ambientales pueden producir dificultades en la detección y determinación de los analitos de interés. Un caso típico es el de los plaguicidas muy polares, que no pueden ser determinados debido a su coelución con el pico de matriz que se obtiene al principio del cromatograma cuando se analizan por técnicas cromatográficas muestras de agua y extractos de suelo. Este pico de matriz es generalmente causado por los ácidos húmicos y fúlvicos presentes en aguas naturales y suelo. Dado que las técnicas cromatográficas usuales (p. ej. cromatografía de

reparto con una fase reversa) no son suficientemente selectivas para separar de manera adecuada los compuestos minoritarios (plaguicidas) de la matriz de fondo coextraída de las muestras ambientales, es indispensable usar un adsorbente muy selectivo para el paso precedente (extracción en fase sólida) en el análisis completo.

La efectividad de un método de extracción en fase sólida depende básicamente de tres factores: la cuantitatividad de recuperación de los analitos a partir de la matriz, el factor de concentración de dichos analitos en el extracto final y el grado de eliminación de las interferencias de matriz. La obtención de un “buen” extracto es el primer paso en el desarrollo de un método altamente selectivo y sensible que pueda ser aplicado a la determinación de contaminantes orgánicos traza en muestras ambientales complejas. En otras palabras, entre más efectivo sea el paso de extracción en fase sólida, mayor será la precisión, la exactitud y la sensibilidad alcanzadas en el análisis. Por estas razones es indispensable desarrollar nuevos materiales adsorbentes para la extracción en fase sólida.

### 1.2 ADSORBENTES PARA EXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA

El hecho de que los materiales más comúnmente usados para la extracción en fase sólida (las sílices modificadas) sean poco adecuados para aislar compuestos polares de muestras acuosas, condujo a los investigadores a evaluar materiales adsorbentes alternativos, como las resinas poliméricas y el carbón grafitizado. Sin embargo, estos adsorbentes con un gran poder de retención, presentan la enorme desventaja de su baja selectividad. Otros nuevos materiales muy prometedores han surgido en años recientes, con características de selectividad muy especiales. Entre ellos se cuentan las fases reversas de superficie interna, los inmunoadsorbentes y los polímeros impresos.

A continuación se describen brevemente algunas características de los diferentes adsorbentes mencionados, dejando aparte a los inmunoadsorbentes para una descripción detallada en una sección posterior.

1.2.1 Sílices modificadas

Son las fases estacionarias más populares de la cromatografía de líquidos, particularmente en su modalidad de fase reversa. Se obtienen a partir de la reacción de silanización de la sílice con alquil silanos y dependiendo del grupo alquílico dan lugar a los empaques tipo fase reversa (R = C<sub>8</sub>, C<sub>18</sub>, C<sub>4</sub> o fenilo) o al tipo fase normal (R = pequeñas cadenas hidrocarbonadas con un grupo terminal polar como CN, amino o diol).<sup>11</sup> En la figura 1 se muestran algunos ejemplos. En su aplicación como adsorbentes para la EFS se pueden utilizar empaques con diámetro de partícula relativamente grande (≤ 40 μm) o muy pequeño (5 ó 10 μm) según se trate de la EFS en diferido o en línea, respectivamente. La fase reversa C<sub>18</sub> ha sido históricamente el empaque de elección para la EFS de muestras acuosas. La retención de los solutos en este adsorbente está gobernada por el efecto hidrofóbico y depende por lo tanto del área hidrocarbonada del soluto y del contenido de carbón del empaque. Por esta razón, la capacidad de retención de solutos polares de molécula pequeña es muy limitada, lo que se traduce en bajas recuperaciones y una muy pobre tasa de preconcentración de estos analitos. Otra desventaja de este empaque, y en general de las sílices, modificadas o no, es su reducido intervalo de estabilidad respecto al pH. No obstante, los adsorbentes de fase reversa químicamente enlazada han dado excelentes resultados en la EFS de compuestos poco polares (hidrocarburos aromáticos polinucleares, policlorobifenilos, policlorofenoles, antraquinonas, etc.) a partir de diferentes matrices acuosas.

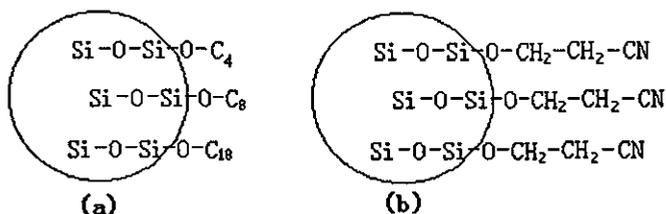


Figura 1. Representación esquemática de un grano de sílice modificado para la cromatografía en fase reversa (a) y en fase normal (b).

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

### 1.2.2 Adsorbentes poliméricos

Los adsorbentes poliméricos han sido también usados frecuentemente en aplicaciones ambientales para el enriquecimiento de compuestos polares y medianamente polares de muestras acuosas,<sup>12</sup> los cuales no son lo suficientemente retenidos por la fase reversa C<sub>18</sub>. Algunos ejemplos típicos son: aminas (bencidinas, anilinas), fenoles y pesticidas polares (ácidos clorofenoxi, fenilureas, triazinas, carbamatos, organofosforados, etc.). El antecedente histórico de estos empaques son las resinas XAD (particularmente XAD-2 y XAD-4). De hecho, los adsorbentes poliméricos más ampliamente usados son los copolímeros estireno-divinilbenceno (SDB, por sus siglas en inglés Styrene Divinil Benzene) que, con respecto a su antecesor, presentan mejores características de permeabilidad, eficiencia, resistencia mecánica y menores cambios de hinchamiento al cambiar el medio líquido en que se encuentran (Figura 2). Entre los adsorbentes poliméricos más utilizados en EFS se encuentran el MCI-gel (Mitsubishi), el PRP (Hamilton) y el PLRP-S (Polymer Labs.); los tres son copolímeros SDB y su diferencia estriba en el grado de entrecruzamiento. A diferencia de las sílices modificadas, los adsorbentes poliméricos SDB son estables en un intervalo de pH más amplio, lo que amplía sus posibilidades de aplicación. Asimismo, tienen una mayor capacidad y un poder de retención más alto debido a su mayor área hidrocarbonada, lo que les permite extraer la mayor parte de los solutos de baja hidrofobicidad. Debido a que los adsorbentes poliméricos SDB poseen anillos aromáticos en su estructura, son capaces de establecer interacciones específicas  $\pi$ - $\pi$  con compuestos insaturados y aromáticos, lo que incrementa su poder de retención para estos solutos. Por otra parte, también se han desarrollado resinas poliméricas químicamente modificadas que tienen unidos diferentes grupos funcionales como acetilo, hidroximetilo, benzoilo y carboxibenzoilo. Estas resinas modificadas mantienen una excelente hidrofobicidad y permiten obtener recobros de algunos solutos con grupos polares, más altos que sus análogas no modificadas. La mayor desventaja de las resinas poliméricas es su baja selectividad, por lo que en general se requieren pasos adicionales de purificación del extracto antes de su análisis y/o utilización de detectores muy selectivos en esta etapa.

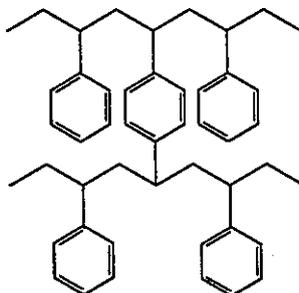


Figura 2. Estructura de resinas poliméricas. Estireno divinilbenceno (SDB)

### 1.2.3 Intercambiadores iónicos

Los polímeros SDB modificados con grupos amonio cuaternario (intercambiador aniónico) o sulfónico (intercambiador catiónico) son los más utilizados en la EFS de compuestos orgánicos iónicos o ionizables, por su mayor capacidad de intercambio comparada con la de las sílices intercambiadoras de iones (Figura 3). La retención de los solutos se lleva a cabo por un mecanismo mixto en donde intervienen las interacciones  $\pi$ - $\pi$  con los anillos aromáticos del polímero y los efectos hidrofóbicos. Generalmente, los intercambiadores iónicos no se utilizan para la extracción directa de la muestra acuosa original porque los iones inorgánicos presentes en ella, en ocasiones bloquean los sitios de intercambio a elevadas concentraciones. En la literatura se encuentra reportado un gran número de aplicaciones de los intercambiadores iónicos acoplados, en línea o en diferido, a los adsorbentes poliméricos para el enriquecimiento y purificación de contaminantes orgánicos ionizables a partir de muestras de aguas naturales. Básicamente el procedimiento consiste en extraer los analitos de interés de la muestra en una primera columna empacada con el adsorbente polimérico; posteriormente, los solutos ionizables de interés son desorbidos selectivamente mediante el paso de una solución de pH adecuado, la cual es transferida hacia una segunda columna empacada con el intercambiador iónico. En esta última, los analitos ionizados son nuevamente retenidos, para ser finalmente eluidos, libres de interferencias y preconcentrados. Esta metodología, conocida como técnica de pre-columnas en línea o EFS bidimensional, es sumamente eficaz y permite realizar análisis

altamente sensibles y selectivos; su limitación estriba en que sólo puede ser aplicada para compuestos orgánicos ionizables.

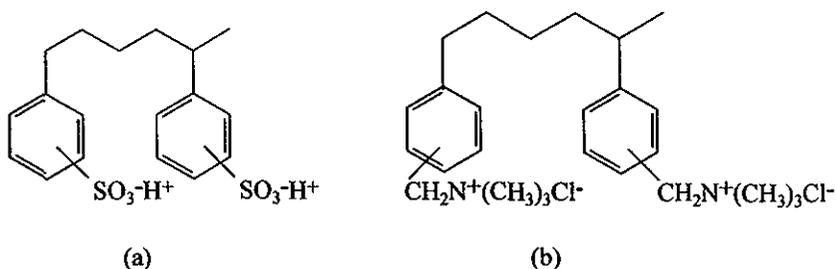


Figura 3. Estructura molecular de intercambiadores iónicos (a) ácido sulfónico, intercambiador catiónico y (b) cloruro de amonio cuaternario, intercambiador aniónico.

#### 1.2.4 Carbón grafitizado

Este se obtiene calentando carbón negro a 2700-3000 °C en una atmósfera inerte. Se trata esencialmente de un adsorbente no específico y no poroso, con una superficie de cerca de 100 m<sup>2</sup>/g.<sup>13</sup> Este tipo de adsorbente ha sido utilizado para el análisis de compuestos fenólicos,<sup>14</sup> plaguicidas y tensoactivos<sup>15</sup> en muestras de agua. Sin embargo, algunas de sus desventajas son su inestabilidad mecánica y su retención excesiva. Debido a esto algunos compuestos pueden adsorberse irreversiblemente en la superficie del adsorbente, produciendo bajos recobros de extracción.

#### 1.2.5 Fases reversas de superficie interna (ISRP-Internal Surface Reverse Phase)

Estas fases surgieron en respuesta a los problemas encontrados en el análisis y determinación de fármacos en muestras de sangre y plasma humano.<sup>16-20</sup> Sin embargo, se prevé que su uso podría ampliarse a futuro para el análisis de aguas ambientales, como un primer paso de limpieza de la muestra, separando los contaminantes de interés de compuestos interferentes de gran tamaño (p.ej. ácidos húmicos y fúlvicos). Las fases reversas de superficie interna consisten de un soporte de sílice con un grupo polar enlazado únicamente a la superficie externa de la partícula del soporte y un grupo hidrofóbico unido

únicamente a la superficie de los poros.<sup>18,20</sup> Cuando el diámetro de los poros de la sílice es de tamaño adecuado, las grandes moléculas son excluidas y no interaccionan con el grupo hidrofóbico de la superficie interior, mientras que las pequeñas moléculas pueden penetrar en los poros e interaccionar con la fase interna quedando retenidas.

Los empaques de ISRP se preparan a partir de partículas de sílica con tamaño de poro pequeño ( $\approx 80 \text{ \AA}$ )<sup>16</sup> y perfectamente controlado, las cuales están disponibles comercialmente. A este soporte se le enlazan químicamente moléculas hidrofílicas (p. ej. glicerilpropilo) y a éstas últimas se le unen posteriormente cadenas peptídicas que contengan los grupos funcionales convenientes para poder ser removidas por reacciones enzimáticas. Esta formación de derivados se lleva a cabo tanto en la superficie externa como en la interna del soporte, por lo que ambas superficies poseen inicialmente característica hidrofóbicas. Después, el soporte recibe un tratamiento enzimático en el que la superficie externa de las partículas de sílice es "rasurada" para eliminar la parte hidrofóbica de las fases derivatizadas. Debido al gran tamaño de las enzimas utilizadas, la superficie interna de las partículas de sílice no es afectada por el ataque enzimático y conserva sus propiedades hidrofóbicas (Figura 4).

Las columnas empacadas con soportes de ISRP se utilizan a menudo en combinación con precolumnas de pequeñas dimensiones empacadas con fases reversas convencionales (p.ej. adsorbentes poliméricos).<sup>20</sup> En un primer paso, la muestra acuosa se pasa a través de la columna ISRP para eliminar las moléculas con un elevado peso molecular. Posteriormente, las pequeñas moléculas son transferidas de la columna ISRP (generalmente de 15 o 25 cm x 4.6 mm D.I.) a la precolumna polimérica mediante una fase móvil que contenga un pequeño porcentaje de modificador orgánico; en esta última, los solutos se concentran. Finalmente, la precolumna se eluye en línea con una columna analítica HPLC para la separación cromatográfica y detección de los analitos.

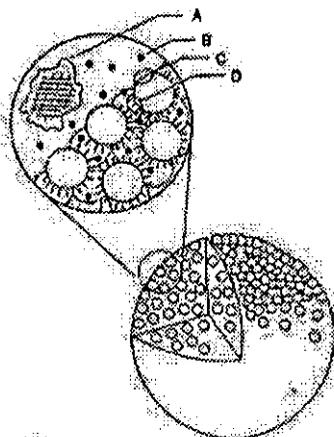


Figura 4. Corte de la vista interna de un soporte de fase reversa en superficie interna (ISRP) A) proteína, B) analito, c) fase externa hidrofílica y D) fase interna hidrofóbica.<sup>16</sup>

### 1.2.6 Polímeros impresos (MIP-Molecularly Imprinted Polymers)

Estas fases representan una de las herramientas más recientes en el campo de la Química Analítica, en general, y en la EFS en particular. Aunque todavía se encuentran en la etapa de desarrollo, se preve que podrían desplazar a los adsorbentes típicos y aún a los inmunoadsorbentes, ya que conjugan las cualidades de estabilidad y robustez de los primeros con la alta selectividad de los últimos<sup>21</sup>. La impresión molecular de los polímeros sintéticos con una molécula particular se puede llevar a cabo si dicha molécula se usa como plantilla durante el proceso de polimerización. Los monómeros portadores de ciertos grupos funcionales se rearreglan alrededor de la molécula plantilla mediante interacciones covalentes o no-covalentes quedando fijos en su posición por una polimerización con alto grado de entrecruzamiento. La remoción posterior de la molécula plantilla del polímero macroporoso deja cavidades que son complementarias a la plantilla en cuanto a forma, tamaño y arreglo de grupos funcionales (Figura 5). Estos sitios receptores, altamente específicos, son capaces de interactuar con la especie impresa en mayor grado que con

cualquier otra molécula de estructura parecida. Por las capacidades de reconocimiento de estos materiales hacia la molécula plantilla, se les ha comparado con los anticuerpos, y de hecho algunos investigadores se refieren a ellos como “anticuerpos plásticos”. Por el momento, las aplicaciones reportadas en muestras reales son escasas pero se espera un gran auge en su uso.

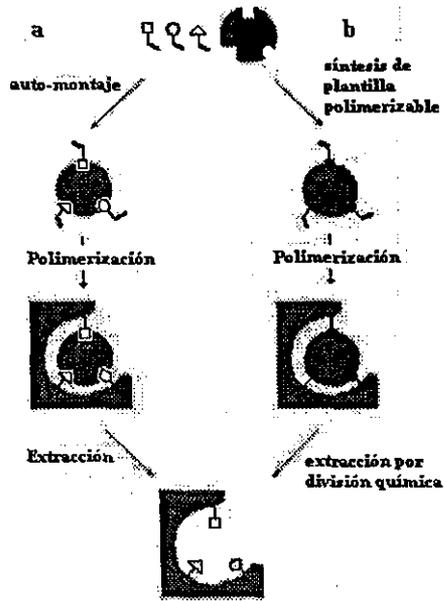


Figura 5. Representación esquemática del principio de impresión molecular: a) auto-montaje y b) montaje covalente.<sup>21</sup>

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

### **1.3 MÉTODOS INMUNOLÓGICOS**

Los métodos inmunológicos han sido ampliamente usados en distintos campos, principalmente debido a la especificidad de las reacciones antígeno-anticuerpo. En estos métodos, la presencia, y algunas veces la cantidad de un compuesto, el antígeno, se determina al hacer reaccionar una alícuota de la muestra con un anticuerpo específico. El análisis se lleva a cabo mediante la medición de una cierta característica (e. g. color) que aparece cuando ocurre la reacción antígeno-anticuerpo. Las reacciones antígeno-anticuerpo han sido la base de métodos muy útiles de análisis cualitativo y semicuantitativo por muchos años, particularmente en microbiología. Sin embargo, en años recientes se ha observado un crecimiento rápido del uso de los inmunoensayos en el campo ambiental, como lo refleja el gran número de artículos publicados, incluyendo revisiones recientes y libros.<sup>22-25</sup>

Los anticuerpos son proteínas producidas por un animal por un proceso conocido como “respuesta inmune”, que es el resultado de la introducción de una sustancia extraña en sus tejidos. Dicha sustancia es conocida como antígeno o inmunógeno y el anticuerpo que se produce es capaz de unirse posteriormente con el antígeno que le dio origen cuando se permite que reaccionen bajo condiciones apropiadas.

La mayoría de las moléculas orgánicas de interés en el análisis ambiental son pequeñas y se les llama “haptenos” en términos inmunológicos. Un hapteno es una molécula que se une a un anticuerpo apropiado pero que no es inmunogénica, esto es, no provoca una respuesta inmune cuando se introduce en un organismo.<sup>9</sup> Esta molécula puede hacerse inmunogénica si se une a un acarreador, el cual es usualmente una proteína o un polisacárido, y es así como puede dar lugar a la formación de anticuerpos.

### 1.3.1 Estructura de los anticuerpos

Los anticuerpos son miembros de un grupo de proteínas conocidas colectivamente como inmunoglobulinas (Ig). El nombre se deriva de la observación que, durante la electroforesis del plasma sanguíneo, estas proteínas migran con la fracción gamma de las globulinas.<sup>26</sup> Estudios inmunolectroforéticos han mostrado que las inmunoglobulinas pueden ser divididas en subclases basadas en su naturaleza antigénica y, por lo tanto, presumiblemente en su estructura total y su secuencia de aminoácidos. Su estructura es de cuatro cadenas de aminoácidos: dos cadenas pesadas y dos cadenas ligeras (Figura 6).

La comparación de la secuencia de aminoácidos de las cadenas pesadas de una subclase particular de inmunoglobulinas revela que aproximadamente tres cuartas partes de cada cadena con un COOH-terminal muestran secuencias muy similares (la región constante). La cuarta parte restante de la cadena peptídica (la región variable) muestra variaciones considerables en la secuencia de aminoácidos y corresponde a aquella parte de la cadena asociada con el sitio de enlace antigénico. Regiones similares, constante y variable, se encuentran también en las cadenas ligeras aunque en este caso cada una involucra aproximadamente la mitad del péptido. La variación es particularmente notable en tres secciones distintas (secciones hipervariables) de las cadenas pesadas y se sugiere que estas secciones son responsables de la actividad de anticuerpo y de la especificidad de una inmunoglobulina cuando se asocian con tres secciones similares de las cadenas ligeras.

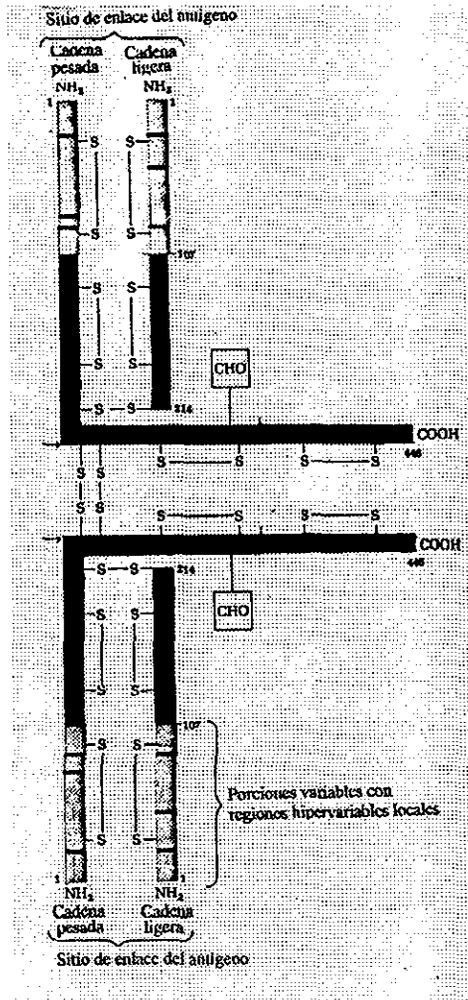


Figura 6. Estructura básica de una molécula de inmunoglobulina G. Los segmentos oscuros de las cadenas ligeras y pesadas son las regiones constantes; los segmentos claros son las regiones variables. Dos cadenas pesadas (446 residuos de aminoácidos) y dos cadenas ligeras (214 residuos) se unen mediante enlaces disulfuro. Las secciones hipervariables de ambos tipos de cadenas (pesadas y ligeras) determinan la especificidad del enlace antigénico.<sup>26</sup>

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Se han reconocido cuatro subclases mayoritarias de inmunoglobulinas y estudios inmunológicos han revelado que las diferencias entre ellas radican en las cadenas pesadas, las cuales, aunque son aproximadamente del mismo tamaño para todas las subclases, varían considerablemente en la secuencia de aminoácidos. Las cadenas ligeras no muestran tal variación y sólo se han encontrados dos tipos principales, conocidas como las cadenas kappa ( $\kappa$ ) y lambda ( $\lambda$ ). Mientras que todos los anticuerpos son inmunoglobulinas, hay algunos ejemplos de éstas que no muestran ninguna actividad de anticuerpo.

### 1.3.2 El papel de los anticuerpos

Tabla I. Característica de las inmunoglobulinas.<sup>27</sup>

Inmunoglobulina	Peso molecular por unidad Daltons (Da)*	Número de unidades básicas de cuatro cadenas	Porcentaje en suero normal
IgG	$1.6 \times 10^5$	1	80
IgA	$1.5 \times 10^5$	1 o 2	13
IgM	$1.0 \times 10^6$	5	6
IgD	$1.8 \times 10^5$	1	1
IgE	$2.0 \times 10^5$	1	0.002

\*1 Da = masa de un átomo de Hidrógeno.  $1.67 \times 10^{-24}$  g.<sup>28</sup>

La inmunoglobulina G (IgG) comprende alrededor del 80% del total de las inmunoglobulinas en plasma y puesto que es relativamente pequeña, es capaz de cruzar membranas y difundirse en espacios extravasculares del cuerpo. Puede cruzar la membrana placentaria y provee la mayoría de la defensa inmune durante las primeras semanas de la vida hasta que el mecanismo de defensa del neonato se vuelve efectivo.

La inmunoglobulina M (IgM) es una molécula grande compuesta por cinco unidades, cada una similar en estructura a una molécula de IgG. El pentámero contiene un polipéptido adicional, la cadena J (masa molecular relativa 15 000) que parece tener importancia en la secreción de la molécula de la célula. La IgM es un agente aglutinante y precipitante efectivo y, aunque tiene la capacidad de enlazar diez moléculas de antígeno, es

usualmente pentavalente. No cruza membranas fácilmente y está fuertemente restringida al flujo sanguíneo.

La inmunoglobulina A (*IgA*) está asociada principalmente con secreciones seromucosas como saliva, lágrimas, fluidos nasales, etc., y se secreta como un dímero junto con la cadena J y una pieza secretoria (masa molecular relativa 70 000); esta última parece prevenir el daño a la molécula por enzimas proteolíticas. Su principal papel parece ser la protección de membranas mucosas y su presencia en sangre, mayoritariamente como monómero, puede ser el resultado de la absorción del dímero degradado.

La inmunoglobulina E (*IgE*) es conocida como una inmunoglobulina citofílica debido a su capacidad para enlazarse a células, por esto se encuentra en bajas concentraciones en fluidos biológicos. La *IgE* está involucrada en el proceso de iniciación de la respuesta inflamatoria y en los procesos alérgicos.

La inmunoglobulina D (*IgD*) también es poco abundante en sangre. No se sabe que tenga propiedades biológicas particulares pero es la inmunoglobulina predominante en la superficie de los linfocitos B inmaduros. Quizá tenga un papel en los procesos de diferenciación y maduración de estas células.

### 1.3.3 La reacción antígeno - anticuerpo

Un anticuerpo se combina específicamente con el antígeno o hapteno correspondiente de una forma similar al enlace de una enzima y su sustrato, involucrando distintos tipos de interacciones (Figura 7). El enlace entre el anticuerpo y el antígeno, sin embargo, no involucra reacciones químicas subsecuentes y su estabilidad depende de la forma complementaria del antígeno y el sitio activo del anticuerpo. En técnicas analíticas es extremadamente deseable usar anticuerpos que tengan una alta afinidad por el antígeno, característica usualmente referida como avidéz.<sup>26</sup> Para poder conocer la diferencia entre afinidad y avidéz, a continuación se presentan sus definiciones.

**Afinidad:** La afinidad de un anticuerpo se refiere a la energía de enlace potencial contenida en cada uno de los sitios activos del anticuerpo y en ella participan todas las posibles interacciones con el antígeno. Éstas a su vez, están determinadas por el número y el tipo de los grupos químicos reactivos presentes en el sitio de combinación.

**Avidez:** Esta se refiere más bien al grado de interacción entre un anticuerpo y su antígeno homólogo.

Por ejemplo, pudiera darse el caso de que un anticuerpo de la clase IgG y uno de la clase IgM tuvieran la misma afinidad (igual energía de enlace involucrada en la combinación con su antígeno homólogo); sin embargo, por razones relacionadas con su estructura, la avidéz de ambos anticuerpos es obligadamente diferente. Los anticuerpos IgM tienen una estructura polimérica y por tanto, un mayor número de sitios de combinación. Esto hace que los anticuerpos de la clase IgM tengan mayor avidéz que los anticuerpos de la clase IgG, aún cuando ambos estén dirigidos contra el mismo determinante antigénico.

En ocasiones, los antígenos pueden tener muchas características antigénicas (determinantes) y como resultado, un suero que ha sido tomado de un animal inmunizado contra ese antígeno puede contener varios, o muchos, anticuerpos diferentes contra los diferentes determinantes antigénicos. Es posible que otro antígeno pueda compartir algunos determinantes antigénicos con el antígeno original, dando como resultado que algunos de los anticuerpos en un antisuero se unan a ambos antígenos. Tal antisuero mostrará reactividad cruzada entre los dos antígenos y se dice que carece de especificidad. Los antisueros utilizados para propósitos analíticos deben ser específicos y es esencial que se prueben antes de su uso.

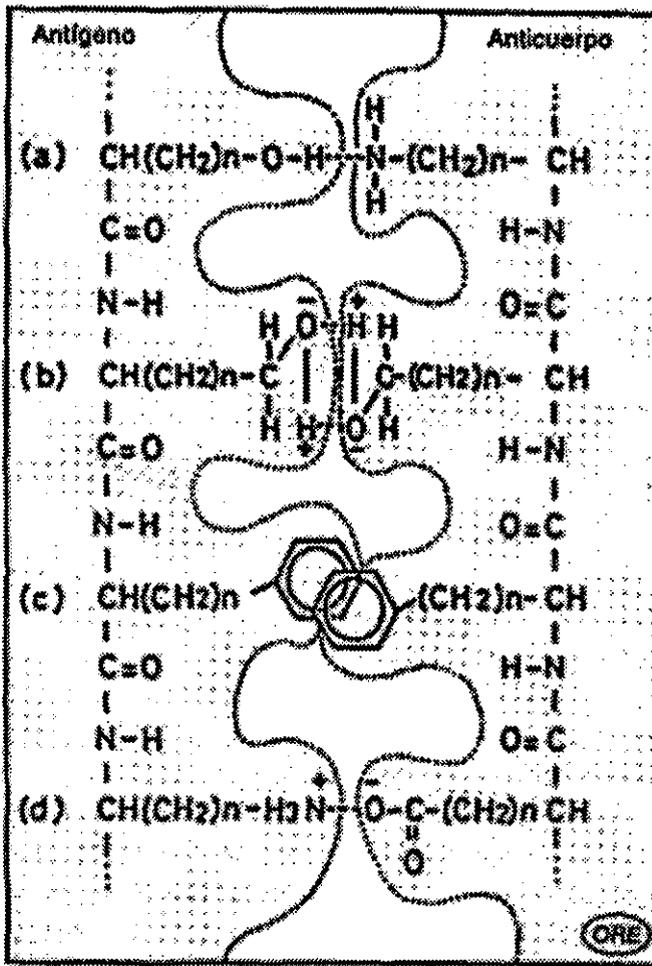


Figura 7. Tipos de interacción antígeno - anticuerpo. La interacción de un sitio de combinación de un anticuerpo con su determinante antigénico específico (u homólogo) involucra la participación de diversos tipos de enlaces entre los que se encuentran: a) los enlaces por puentes de hidrógeno, b) las interacciones entre dipolos, c) las interacciones hidrofóbicas, d) los enlaces iónicos o salinos, además de algunos otros. A diferencia de los enlaces covalentes que poseen una energía de unión elevada (32-100 kcal/mol), los enlaces electrostáticos son de baja energía (4-12 kcal/mol) y por lo mismo, son fácilmente dissociables.<sup>26</sup>

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

#### 1.4 CROMATOGRAFÍA DE AFINIDAD (BIOAFINIDAD)

En 1910 se dio a conocer la llamada “adsorción bioespecífica”, basada en la interacción inhibidor-proteína a través de los denominados “sitios activos”. Este fenómeno tuvo escasa aplicación hasta que a finales de los años 1960’s se empezaron a presentar datos de purificación de proteínas inmovilizando un inhibidor en un soporte sólido retenido en una columna; esta técnica recibió el nombre de “cromatografía de afinidad”<sup>29</sup>. Este nuevo enfoque tuvo gran impacto en el área bioquímica, pues permitió simplificar y optimizar la separación y purificación de proteínas, ácidos nucleicos, etc. El empleo de la propiedad bioquímica de interacción específica y reversible para separar y purificar biomoléculas ha sido insustituible en muchos ámbitos de la biología, la bioquímica y la medicina.

La cromatografía de afinidad se basa en la característica única de las macromoléculas biológicas de poder unirse específica y reversiblemente a otras moléculas, esto es que se aprovechan las propiedades funcionales específicas de estas macromoléculas. La unión de un sustrato al sitio activo de una enzima, la formación del complejo entre un antígeno y un anticuerpo, y la hibridación del RNA mensajero con el DNA complementario son los ejemplos más notables de estas interacciones específicas.

La fase estacionaria en la cromatografía de afinidad se prepara uniendo covalentemente un ligando (que debe tener una alta afinidad por la molécula a ser separada) a un soporte insoluble. El soporte insoluble puede ser un gel polimérico, como dextrano entrecruzado, poliacrilamida, agarosa, o un material poroso, como la sílica o el vidrio poroso. El ligando puede ser cualquier molécula que pueda unir específica y reversiblemente a la sustancia biológica a ser separada<sup>30</sup> (Tabla II). Por ejemplo, para separar una enzima particular, el ligando puede ser un inhibidor biológico competitivo como un sustrato análogo, un efector alostérico o un cofactor. Alternativamente, cuando la enzima se liga a la matriz sólida, puede servir como un ligando para separar estas sustancias. De esta manera, la cromatografía de afinidad no está restringida a la separación de macromoléculas, aunque por muchos años ese haya sido su uso casi exclusivamente. El

ligando puede ser altamente específico para una sustancia, como en la mayoría de las interacciones antígeno-anticuerpo, o puede tener una especificidad más amplia para unir un grupo particular de sustancias. Los ligandos organomercuriales inmovilizados, por ejemplo, pueden ser usados para la separación de todas las proteínas que contengan una cadena lateral sulfhidrilo de otros componentes en una mezcla.

Tabla II. Tipos de solutos y ligandos en las reacciones de bioafinidad.<sup>26</sup>

<b>Soluto a ser separado</b>	<b>Ligando inmovilizado</b>
Enzima	Inhibidor, efector, cofactor
Inhibidor, efector, cofactor	Enzima
Antígeno	Anticuerpo
Anticuerpo	Antígeno
Proteína -SH	Compuesto organomercurial
Subunidad enzimática	Inhibidor
Polinucleótido	Polinucleótido complementario
Proteína enlazante esteroideal	Esteroides

Cuando la afinidad de la fase estacionaria es específica solamente para un componente de la mezcla a ser separada, la Cromatografía de Afinidad se lleva a cabo en el modo desplazamiento. Lo primero que se hace es ajustar el pH y la fuerza iónica de la solución que contiene ese componente particular para favorecer un enlazamiento fuerte con el bioadsorbente. Esta solución se hace pasar a través de la columna empacada con el ligando inmovilizado, quedando retenido el componente deseado mientras que las otras especies se eliminan por un lavado. En el paso siguiente, el soluto retenido se eluye de la columna utilizando una solución que tenga un pH y fuerza iónica adecuados o que contenga agentes que rompan los enlaces-hidrógeno, como la urea. En la mayoría de los casos, la constante de afinidad entre el soluto y el ligando varía suficientemente con las condiciones experimentales, de tal manera que pueden ser optimizados el pH, la fuerza iónica y la temperatura tanto para el paso de retención como el de elución. Algunas veces, sin

embargo, la remoción del soluto unido requiere de un agente desplazante como un ligando soluble competitivo.

Por otra parte, si la fase estacionaria puede retener un grupo específico de solutos durante la etapa de adsorción, éstos pueden ser posteriormente removidos de la columna por pasos o bien con un gradiente de elución, siendo separados en componentes individuales. Por ejemplo, la separación de proteínas sulfhidrilo con un ligando organomercurial (de amplia especificidad) puede llevarse a cabo convenientemente de este modo, ya que las proteínas que contienen diferente cantidad de grupos SH tienen diferentes afinidades por el material de la columna y pueden ser eluidas separadamente cambiando el tampón eluyente.

La cromatografía de afinidad puede emplearse también para concentrar soluciones diluidas de una sustancia biológica o para remover formas desnaturalizadas de macromoléculas. Después de la elución cromatográfica la columna puede ser regenerada y reutilizada.

La gran ventaja de esta técnica es su alta especificidad y rapidez, comparada con los métodos de purificación convencionales que implican muchos pasos y pérdida continua del material activo. Aunque la cromatografía de afinidad se lleva a cabo preferentemente en la columna, el uso de bioadsorbentes específicos no está restringido al manejo de una columna. Estos pueden ser empleados para retirar un componente particular de una solución por contacto simple en un procedimiento en lote, con la ventaja de que el complejo insoluble ligando-soluto puede aislarse rápidamente por filtración o centrifugación.

Se debe hacer notar que la cromatografía de afinidad es más eficiente cuando el equilibrio de adsorción entre el soluto y el ligando se alcanza. Sin embargo la velocidad del equilibrio de adsorción es generalmente lenta, ya que se requiere la orientación específica tanto del ligando como del soluto en el paso de enlace. Este efecto también se manifiesta en la energía de activación de dicha adsorción específica, que es mucho más alta que la de las adsorciones no específicas implicadas en otras técnicas cromatográficas. Por

lo tanto la cromatografía de afinidad requiere usualmente velocidades de flujo relativamente pequeñas o tiempos de contacto largos.

#### **1.4.1 Preparación de la Columna**

La cromatografía de afinidad se distingue de otras técnicas cromatográficas en que se requiere de una columna con un material particular para cada problema de separación. Por lo tanto la preparación del empaque de la columna juega un papel central en este tipo de cromatografía.

Primero, se tiene que seleccionar un ligando que tenga la afinidad apropiada para el soluto a ser separado. Además, dicho ligando debe tener un grupo funcional que permita su unión covalente al soporte y debe mantener sus propiedades de sitio activo específico bajo las condiciones de enlazamiento y a través de todo el ciclo de operación<sup>31</sup>. Los ligandos tienen que estar disponibles en suficiente cantidad y pureza. La elección de un ligando con selectividad relativamente amplia facilita el aislamiento simultáneo de varios analitos de una muestra.

Segundo, tiene que seleccionarse un soporte adecuado. La selección de un material apropiado como soporte para una aplicación deseada es crucial para el desarrollo óptimo de la cromatografía de afinidad. La fase sólida tiene que proveer suficiente cantidad de grupos funcionales convenientes para la inmovilización covalente del ligando. El acoplamiento covalente, comparado con las técnicas de inmovilización adsorptiva, reduce la fuga del ligando de la fase sólida durante los varios pasos de lavado y elución requeridos en esa técnica. Más aún, los compuestos de interés sólo deben ser adsorbidos por el ligando inmovilizado y no por el material del soporte en sí. Durante muchos años, la agarosa y el sephadex (sefarosa) activadas con BrCN fueron las materias de soporte más usadas en la cromatografía de bioafinidad. Sin embargo, presentan varias desventajas, como baja resistencia mecánica, posibilidad de degradación microbiana, introducción de grupos cargados positivamente a pH neutro y toxicidad del BrCN.

Un soporte ideal tiene que ser inerte para minimizar las adsorciones no específicas y debe reaccionar fácilmente con el ligando bajo condiciones suaves, de manera que se obtenga una alta concentración del ligando funcional inmovilizado. El soporte debe ser química y mecánicamente estable bajo las condiciones de operación, debe permitir una alta difusividad del soluto dentro de la partícula del adsorbente y debe permitir el acceso del analito a todas las moléculas del ligando inmovilizado. Con el objeto de obtener columnas para cromatografía de afinidad con buenas características de flujo, el empaque debe ser rígido. En la actualidad se encuentran disponibles una gran cantidad de materiales para soporte con varios grupos funcionales adecuados para enlazamiento de diversas moléculas.<sup>32-35</sup>

### 1.4.2 Condiciones de operación alternativas

La cromatografía de afinidad puede utilizarse tanto en trabajos analíticos como preparativos. Como se ha mencionado anteriormente, no necesita restringirse a procedimientos en columna. Por ejemplo el bioadsorbente puede ser sellado en una bolsa o contenedor hecho de malla fina.<sup>30</sup> Colocando la bolsa dentro de la solución agitada que contiene al soluto o solutos de interés, éstos pueden atraparse por adsorción y después eluidos por separado. La ventaja de esta técnica es que la solución puede contener partículas que de otro modo taparían una columna. Además, permite retirar varios solutos simultáneamente cuando el contenedor se llena con diferentes adsorbentes. El uso de la palabra cromatografía para esta operación en lote de simple contacto es inapropiado y puede bien reemplazarse por el término separación por afinidad o purificación por afinidad. En algunos casos el proceso de adsorción se lleva a cabo en un procedimiento de lote y, posteriormente, el adsorbente cargado se transfiere a una columna para lavar las sustancias no adsorbidas y eluir el soluto o solutos adsorbidos de una forma cromatográfica.

Bajo ciertas circunstancias el enlace de macromoléculas biológicas con el ligando inmovilizado es tan fuerte que éstas no pueden ser eluidas sin causar su desnaturalización. Entonces se vuelve necesario considerar la elución del complejo macromolécula-ligando,

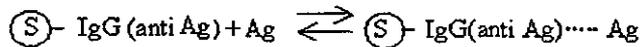
esto puede llevarse a cabo bajo condiciones suaves cuando se usa un enlace apropiado para inmovilizar el ligando al soporte.

### 1.4.3 Cromatografía de Inmunofinidad

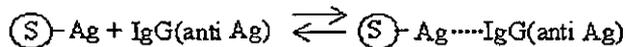
Esta técnica corresponde al caso particular de la cromatografía de afinidad en el cual el complejo ligando-soluto es el par antígeno-anticuerpo o anticuerpo-antígeno, dependiendo de cual de las dos entidades sea enlazada al soporte.

La flexibilidad en los métodos de inmunoadsorción es muy amplia,<sup>36</sup> como lo muestran las siguientes posibilidades de funcionamiento:

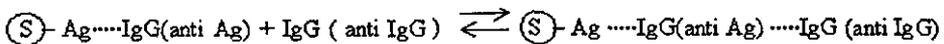
1. El anticuerpo IgG (anti Ag), dirigido contra el antígeno Ag, puede enlazarse al soporte, con lo cual se obtiene un adsorbente específico para Ag:



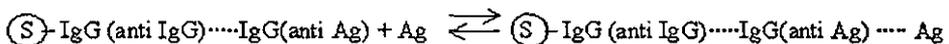
2. El antígeno unido al soporte da como resultado un adsorbente selectivo para el anticuerpo:



3. Es posible preparar anticuerpos dirigidos contra toda la subclase IgG. Estos anticuerpos pueden ser acoplados al complejo antígeno-anticuerpo dando como resultado complejos de adsorción terciarios o "complejos sandwich". La formación de estos complejos se utiliza en algunos tipos de inmunoensayos:



o



Para muchas aplicaciones actuales de la cromatografía de inmunofinidad, en particular en el campo ambiental, lo más común es unir el anticuerpo al soporte, como en el caso (1).

Las aplicaciones actuales de la cromatografía de inmunoafinidad están dirigidas a la EFS de compuestos traza de interés en muestras de mezclas crudas. Consecuentemente, su determinación, ya sea por cromatografía de líquidos o por cromatografía de gases, se vuelve más fácil y sensible. Hasta ahora se han reportado una multitud de aplicaciones de la cromatografía de inmunoafinidad aunque sólo algunas se refieren a la EFS de plaguicidas a partir de matrices acuosas ambientales.

### 1.4.4 Inmunoadsorbentes

El problema principal de la extracción en fase sólida aplicada al análisis ambiental es la carencia de adsorbentes selectivos cuando se analizan aguas superficiales. En efecto, la matriz de estas muestras es difícil de eliminar durante la etapa de EFS y produce una línea base ruidosa y un gran pico al inicio del cromatograma, dificultando en particular la determinación de los analitos más polares.

Recientemente, se han sintetizado y empiezan a comercializarse nuevos adsorbentes para extracción llamados inmunoadsorbentes,<sup>37</sup> éstos involucran interacciones antígeno-anticuerpo reversibles y selectivas, con el objetivo de atrapar contaminantes estructuralmente relacionados. Se ha proclamado que estos inmunoadsorbentes producen extractos libres de sustancias interferentes. Asimismo, se menciona que con ellos es posible llevar a cabo la extracción, el enriquecimiento y la limpieza de muestras de agua en un solo paso y que esta preconcentración selectiva suele no requerir pasos adicionales de limpieza. Una separación típica de una mezcla de compuestos por inmunoextracción se ilustra en la Figura 8.

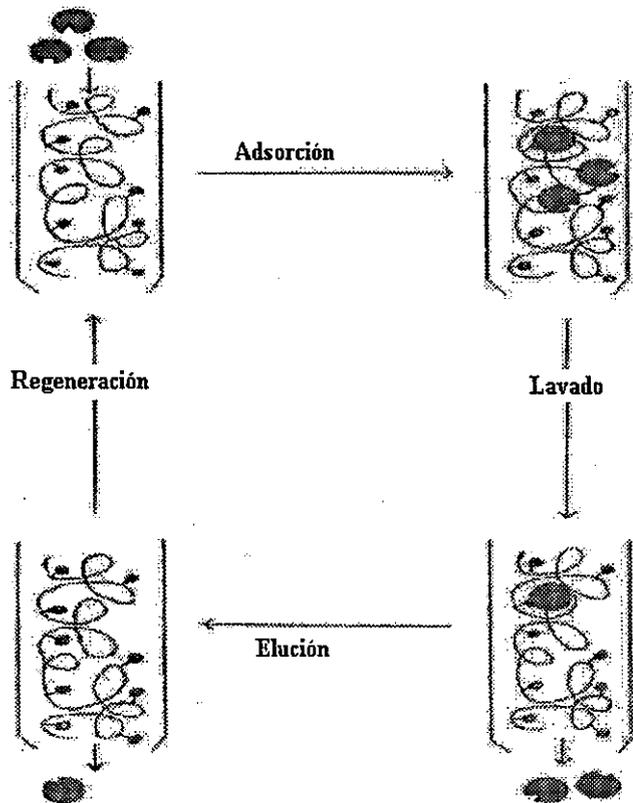


Figura 8. Esquema general de un proceso de inmunoextracción. Una muestra que contiene diversos analitos (círculos grandes) se hace pasar a través de un soporte que contiene el ligando (círculos pequeños) que ha sido unido covalentemente a un material inerte (soporte). Cuando el cartucho se lava, las moléculas del analito complementarias a las moléculas del ligando permanecen adsorbidas, mientras que los otros componentes de la muestra eluyen sin retención. Las moléculas del analito adsorbido son entonces eluidas por un cambio en la composición de la fase móvil. Por ejemplo, un cambio de pH disociará el complejo analito-ligando debido a los cambios en la ionización de los grupos ácidos o básicos en las moléculas. Después de regresar a la composición de la fase móvil inicial, la columna está lista para otro experimento.

Los inmunoadsorbentes se obtienen por enlace covalente de anticuerpos a un adsorbente apropiado. El soporte ideal para un adsorbente de inmunoafinidad es rígido y poroso para que las velocidades de flujo de muestras ambientales puedan ser altas. Del mismo modo, deben tener grupos funcionales para posibilitar el enlace apropiado con un suficiente número de anticuerpos y ser hidrofílico para evitar interacciones no específicas con el analito y la matriz de la muestra. Los anticuerpos pueden acoplarse a la fase sólida a través de sus residuos amino, carboxilo o carbohidrato. Se ha encontrado que cuando los anticuerpos se enlazan vía sus grupos amino, éstos se inmovilizan principalmente en su fracción constante (Fc), lejos del sitio activo del antígeno, ya que los grupos amino de la fracción variable (Fab) no son accesibles para la inmovilización. Por lo tanto, se piensa que se obtiene un material más eficaz para la cromatografía de inmunoafinidad con inmovilizaciones vía los grupos amino, comparado con inmovilizaciones a través de otros grupos funcionales. La capacidad de los inmunoadsorbentes puede incrementarse seleccionando correctamente la sílica utilizada para el procedimiento de enlace y también depende de la orientación y pureza de los anticuerpos inmovilizados. Actualmente, los soportes de sílica activada diol o aldehído son los mejores soportes ya que reúnen estos requerimientos. En ambos casos, mediante la formación de bases de Schiff, el anticuerpo es acoplado vía sus grupos amino.

Las fuerzas involucradas en las interacciones antígeno-anticuerpo son de naturaleza variada, incluyendo atracción iónica, formación de puentes hidrógeno, atracciones hidrofóbicas y fuerzas de van der Waals<sup>26</sup>.

Los anticuerpos son los componentes claves en un ensayo inmunológico y pueden ser de tipo policlonal, derivados de suero animal después de la inmunización con un antígeno (inmunógeno) o monoclonal si se derivan de un medio de cultivo celular.<sup>1</sup> En el último caso, se mezclan células de bazo de un animal inmunizado con células de mieloma. Las células híbridas resultantes, que son capaces de secretar anticuerpos de un solo tipo, pueden separarse seleccionando el anticuerpo apropiado y permanentemente cultivadas.

Inherente al uso de los anticuerpos hay un cierto grado de reactividad cruzada, esto es debido al enlace de varios compuestos estructuralmente relacionados al anticuerpo. El grado al cual un anticuerpo particular se enlaza selectivamente al analito de elección determina su aplicabilidad. Un bajo grado de reactividad cruzada lo hace conveniente para ensayos de un solo compuesto. En contraste, un ensayo para un grupo específico de compuestos requiere un anticuerpo que tenga un alto grado de reactividad cruzada. Tomando ventaja de la reactividad cruzada de un anticuerpo específico, es posible extraer varios compuestos de una misma familia. Por lo tanto, la selección de un anticuerpo depende del propósito de la aplicación. Generalmente, un antisuero que consiste de varios tipos de anticuerpos muestra un amplio espectro de reactividades cruzadas a diferencia de un anticuerpo monoclonal.

En la literatura se encuentran reportadas aplicaciones de los inmunoabsorbentes en el análisis de varios herbicidas, como triazinas y fenilureas, en diferentes tipos de agua, utilizando un anticuerpo simple (por ejemplo anti-isoproturón, anti-clortolurón) o un anticuerpo múltiple (anticuerpos mezclados).<sup>39-42</sup> También se han realizado comparaciones de los inmunoabsorbentes con las fases C<sub>18</sub>, PRP-1 y PLRP-S para la extracción en fase sólida de dichos herbicidas a partir de muestras ambientales.<sup>43</sup> La alta selectividad de los inmunoabsorbentes produjo cromatogramas más limpios que aquellos obtenidos con los otros adsorbentes.

Los inmunoabsorbentes han sido aplicados a la determinación de diferentes plaguicidas en operaciones de extracción en fase sólida en-línea y fuera de línea. Por ejemplo, acoplando la inmunoextracción con CL-APCI-MS (cromatografía de líquidos – espectrometría de masas con ionización química a presión atmosférica) se han podido alcanzar límites de detección muy bajos (<1 ppb) con volúmenes pequeños de muestra gracias a la conjugación de la selectividad de las técnicas involucradas, que se traduce en una muy alta sensibilidad.

Debido a que todavía hay pocos inmunoadsorbentes comercialmente disponibles, el número de analitos que pueden ser analizado es aún limitado. Su costo es alto comparado con el de los sistemas convencionales. Sin embargo, cuando haya producción de inmunoadsorbentes en gran escala los costos se reducirán y muy probablemente estarán disponibles a un precio razonable en un futuro cercano.

### 1.5 PLAGUICIDAS

Es común para la gente confundir el término “plaguicida” con el término “insecticida”. Esto es erróneo, ya que el término “plaguicida” es una clasificación general e incluye una variedad de compuestos con diferentes usos. Los plaguicidas químicos tienen en común la capacidad de destruir alguna forma de vida y son clasificados como plaguicidas porque el organismo contra el que son dirigidos se considera indeseable para la persona o sociedad que los aplica. Los insecticidas representan un grupo particular de plaguicidas usados en grandes cantidades que pueden causar efectos tóxicos en humanos, pero también dentro de otros grupos de plaguicidas se pueden encontrar diversos agentes potencialmente dañinos.<sup>39</sup>

Los plaguicidas ocupan una posición única dentro de los diversos compuestos químicos que el hombre encuentra diariamente. Se adicionan deliberadamente al ambiente con el propósito de matar o dañar alguna forma de vida. Idealmente, su acción dañina debe ser altamente específica para el organismo indeseado y no dañina para los organismos deseados. Sin embargo, la mayoría de los compuestos usados como plaguicidas no son altamente selectivos, sino generalmente tóxicos a muchas especies no-blanco, incluyendo humanos y otras formas de vida deseables que cohabitan el ambiente<sup>40</sup>. Dada la carencia de acción plaguicida altamente selectiva, la aplicación de plaguicidas debiera ser rigurosamente controlada en cuanto a cantidades y forma de uso para minimizar la posibilidad de exposición de los organismos no-blanco a cantidades dañinas de estos compuestos útiles.

Existe una gran diversidad en la forma de acción de los plaguicidas sobre los tejidos primarios blanco como existe diversidad en sus propiedades químicas. Hay un gran número de plaguicidas cuya toxicidad aguda se manifiesta a través de acciones funcionales o bioquímicas en el sistema nervioso central y periférico, pero hay otros en los cuales el sistema nervioso central se afecta o se afecta de manera secundaria debido a los efectos primarios en otros órganos. Para algunos grupos de compuestos, el mecanismo de la acción tóxica es bien entendido en el ámbito molecular. Para otros no hay información concerniente al mecanismo de toxicidad. Aún dentro de una clase similar de compuestos, los compuestos individuales pueden ser extremadamente tóxicos o prácticamente no tóxicos.

### **Contaminación Ambiental**

Aparentemente, hay muchas fuentes de exposición de humanos y otras especies no-blanco a los plaguicidas por contacto directo con materiales en el sitio de aplicación. En años recientes, sin embargo, se ha venido incrementando aparentemente la exposición a los plaguicidas lejos del sitio de aplicación. Esto es resultado de la translocación de los compuestos desde sus sitios de aplicación a través de varios medios del ambiente, como son la lluvia, los ríos, el aire, etc.

La translocación dentro del ambiente depende en gran medida de las propiedades fisicoquímicas de los plaguicidas. Uno de los factores más importantes es el tiempo requerido para la degradación de los compuestos a formas más simples no tóxicas, que depende a su vez de factores ambientales como la humedad, la temperatura, etc.

El grado al cual los plaguicidas pueden permanecer en suelos después de la aplicación se conoce como persistencia y depende de un gran número de factores, como: tipo de suelo, humedad, temperatura, pH, microorganismos existentes, degradabilidad del plaguicida en sí, entre otros.

## GENERALIDADES

Para una mejor comprensión del potencial de persistencia y traslocación se deben tomar en consideración no sólo los aspectos biológicos de los plaguicidas sino también el análisis de su comportamiento bajo diferentes condiciones químicas y físicas del ambiente.

### Clasificación de la toxicidad de los plaguicidas

En este trabajo se adopta la clasificación de la toxicidad con base en la Dosis Letal 50 (DL<sub>50</sub>), expresada en mg/kg que fue recomendada por la Organización Mundial de la Salud (OMS) en su vigésima octava asamblea y reconocida en la NOM-Y-301-1998. La DL<sub>50</sub> es la dosis a la cual mueren el 50 % de los sujetos de experimentación y hace referencia a la obtenida en ratas cuando el plaguicida se administra por vía oral o dérmica, en forma aguda. Un concepto paralelo es la Concentración Letal 50 (CL<sub>50</sub>) aguda, que es la concentración de una sustancia en el aire que causa la muerte de 50% de la población de las ratas de prueba; se expresa en mg/m<sup>3</sup> o en partes por millón (ppm). La clasificación según estos criterios se anota en el siguiente cuadro.

Tabla III. Clasificación de la toxicidad de los plaguicidas.<sup>41</sup>

CATEGORÍA	DL <sub>50</sub> en mg/kg de masa corporal								CL <sub>50</sub> Aguda por inhalación mg/L	
	Aguda Oral				Aguda Dérmica					
	Estado Físico				Estado Físico				Exposición 1h	
	Sólido		Líquido		Sólido		Líquido			
	más de	hasta	más de	hasta	más de	hasta	más de	hasta		
I Extremadamente Tóxicos	-	5.0	-	20.0	-	10.0	-	40.0	-	0.2
II Altamente tóxicos	5.0	50.0	20.0	200.0	10.0	100.0	40.0	400.0	0.2	2.0
III Moderadamente tóxicos	50.0	500.0	200.0	2000.0	100.0	1000.0	400.0	4000.0	2.0	20.0
IV Ligeramente tóxicos	500.0	-	2000.0	-	1000.0	-	4000.0	-	20.0	-

**Clasificación de la persistencia de los plaguicidas**

La mayoría de las clases de plaguicidas han sido agrupadas como “no-persistentes (o moderadamente residual)”, “moderadamente persistente (o moderadamente residual)” o “persistente (o altamente residual)”. El tiempo de persistencia refleja el tiempo requerido para que el 75 al 100 por ciento de los residuos de plaguicida desaparezcan del sitio de aplicación.

Los plaguicidas no persistentes tienen valores de persistencia de 1 a 12 semanas, los moderadamente persistentes de 1 a 18 meses y los persistentes de 2 a 5 años. La persistencia varía con las condiciones ambientales y la generalización acerca de las clases son sujetas de diversas excepciones para plaguicidas individuales dentro de la clase.

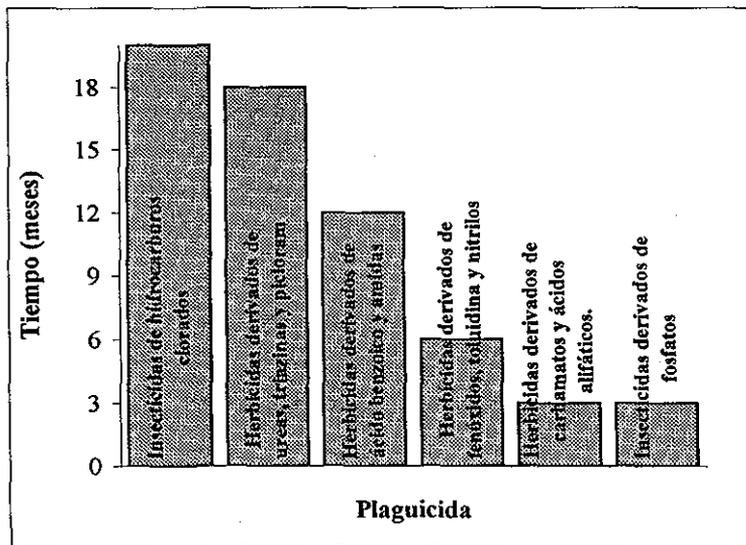


Fig. 9. Persistencia de diferentes clases de plaguicidas en suelos.

1.5.1 Herbicidas

Durante los últimos 20 años la producción y uso de químicos para la destrucción de hierbas nocivas se ha incrementado marcadamente. Los herbicidas compiten o exceden a los insecticidas en cantidad. Ya que las plantas difieren marcadamente de los animales en su morfología y fisiología, debe esperarse que los herbicidas puedan presentar un peligro menor de toxicidad hacia los vertebrados. En efecto, algunos compuestos presentan muy baja toxicidad para los mamíferos, pero hay muchos químicos altamente tóxicos y algunos de ellos han causado envenenamientos fatales en el hombre. A continuación se presenta una clasificación de los herbicidas con base en el grupo funcional principal del compuesto.

Tabla IV. Clasificación de los herbicidas con base en su grupo funcional.

Tipo de herbicidas	Ejemplos
Clorofenóxidos	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético)</li> <li>▪ 2,4,5-T (ácido 2,4,5-triclorofenoxiacético)</li> </ul>
Dinitrofenoles	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ DNOC (4,6-dinitro-<i>o</i>-cresol)</li> <li>▪ Dinoseb (2-Sec-butil-4,6-dinitrofenol)</li> </ul>
Compuestos bipyridilo	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Paraquat (1,1'-dimetil-4,4'-bipyridilo)</li> <li>▪ Diquat (6,7-dihidropirilo (1,2,α-2',1'-c)pirazidinio)</li> </ul>
Carbamatos	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Protham (isopropil carbamato)</li> <li>▪ Barban (4-cloro-2-butinil <i>m</i>-clorocarbamato)</li> </ul>
Ureas sustituidas	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Monurón (3-(<i>p</i>-clorofenil)-1,1-dimetilurea)</li> <li>▪ Diurón (3-(3,4-diclorofenil)-1,1-dimetilurea)</li> </ul>
Triazinas	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Atrazina (2-cloro-4-(etilamino)-6-(isopropilamino)-<i>S</i>-triazina)</li> <li>▪ Simazina (2-cloro-4,6-bis(etilamino)-<i>S</i>-triazina)</li> </ul>
Amidas	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Propanil (3',4'-dicloropropionanilida)</li> </ul>
Nitrilos	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Diclobenil (2,6-diclorobenzonitrilo)</li> <li>▪ Ioxynil (4-hidroxy-3,5-diiodobenzonitrilo)</li> </ul>
Dinitroanilinas	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Trifluralin (α,α,α-trifluoro-2,6-dinitro-N,N-dipropil-<i>p</i>-toluidina)</li> <li>▪ Benfen (N-butil-N-etil-α,α,α-trifluoro-2,6-dinitro-<i>p</i>-toluidina)</li> </ul>
Ácidos arilalifáticos	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Dicamba (ácido 2-metoxi-3,6-diclorobenzoico)</li> <li>▪ Clormben (ácido 3-amino-2,5-diclorobenzoico)</li> </ul>
Organoarsénicos	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ MSMA (metanoarseonato monosódico)</li> <li>▪ Ácido cacodílico (óxido-hidroxidimetilarsina)</li> </ul>

### 1.5.2 Herbicidas feniluréticos

Entre 20 y 25 compuestos diferentes de fenilureas sustituidas son comercialmente disponibles como herbicidas para el control de hierbas en una variedad de cultivos. Las fenilureas pueden dividirse en tres categorías basadas en sus solubilidades en agua, las cuales a su vez parecen estar relacionadas a otras propiedades diferentes que los grupos funcionales en común.

El fenurón, la fenilurea más soluble (2900 – 3850 ppm), está en esta categoría. Este compuesto también es el más móvil en sistemas de suelo. El grupo medio de fenilureas en términos de solubilidad en agua incluye al monurón, diurón, linurón, monolinurón, fluometurón, metobromurón, y sidurón, en los cuales las solubilidades en agua van de 18 a 580 ppm. Los compuestos menos solubles de las fenilureas son el neburón y el cloroxurón, donde la solubilidad en agua va de 2 a 4.8 ppm.

La mayoría de las fenilureas tienen presiones de vapor relativamente bajas y no son muy volátiles del suelo. El pH del suelo no parece afectar significativamente la adsorción, movilidad o actividad herbicida de las fenilureas. La persistencia de estos compuestos es moderada, con residuos después de la aplicación durante varios meses.

El efecto de compuestos tóxicos sobre el sistema inmune ha sido un área de gran interés. Se ha encontrado que el fluometurón y el linurón alteran en alguna dosis en algunas especies, los mecanismos de defensa del huésped relacionados al sistema funcional inmune.<sup>39</sup> Se observaron supresión y estimulación de una variedad de respuestas inmunes con el mismo compuesto durante un experimento individual. Esta alteración no indica si el sistema inmune fue directa o secundariamente afectado, por ejemplo, secundaria a la estimulación de la corteza adrenal o si el efecto inmunológico fue altamente sensible o acompañado por otros efectos tóxicos, etc.

## **GENERALIDADES**

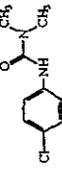
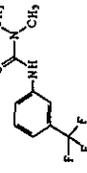
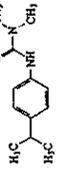
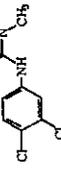
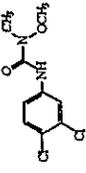
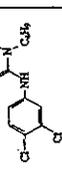
---

Se ha reportado también que tanto el monurón como el diurón afectan al sistema nervioso central en ratas,<sup>42</sup> con  $DL_{50}$  en ratas de más de 2000 mg/kg. Estudios de toxicidad crónica sugieren que el monurón es un carcinogénico potencial.

El diurón, fluometurón y linurón son irritantes oculares, ligeramente peligrosos. Su uso está permitido en México. En cuanto al monurón, han sido prohibidos su importación, fabricación, formulación, comercialización y uso en México.<sup>43</sup>

En la tabla V se resumen las propiedades de los compuestos estudiados en este trabajo.

Tabla V. Características de las fenilureas estudiadas. 41.44

Nombre	Monurón	Fluometurón	Isoproturón	Diurón	Linurón	Neburón
Estructura						
Fórmula Molecular	$C_9H_{11}ClN_2O$	$C_{10}H_{11}F_3N_2O$	$C_{12}H_{18}N_2O$	$C_9H_{10}Cl_2N_2O$	$C_9H_{10}Cl_2N_2O_2$	$C_{12}H_{16}Cl_2N_2O$
Punto de fusión ( $^{\circ}C$ )	170.5-171.5	163-164.5	158	158-159	93-94 $^{\circ}$	101.5-103
Peso molecular	198.65	232.21	206.29	233.10	249.11	275.18
Presión de vapor a 25 $^{\circ}C$ , (mm Hg)	$5 \times 10^{-7}$	(1)	(1)	$3.1 \times 10^{-6}$ (50 $^{\circ}C$ )	$1.5 \times 10^{-5}$	(1)
Solubilidad en agua 25 $^{\circ}C$ , (mg/L)	Escasamente soluble	80	70	42	75	48
$DL_{50}$ oral en ratas (mg/kg)	3700	89	3600	437	1500	> 11,000
Utilizados en México	-	Utilizado	-	Utilizado	Utilizado	-
Prohibidos en México	Prohibido	-	-	-	-	-
Persistencia	(1)	Ligera	Moderada	Mediana	(1)	(1)
Efectos adversos (peligro)	(1)	Ligera	Moderada irritante ocular	Moderada Irritante ocular, dérmico y de mucosas	(1)	(1)

(1) Dato no disponible.

1.5.3 Métodos de análisis de herbicidas feniluréicos

En la bibliografía se reportan muchos métodos distintos de análisis para fenilureas por diversas técnicas instrumentales. En la tabla VI se muestran únicamente algunos ejemplos que han sido utilizados en los últimos años utilizando extracción en fase sólida como método de preconcentración de fenilureas.

Tabla VI. Algunos métodos de extracción en fase sólida para fenilureas.

Compuestos*	Muestra (Método)	Detector	% Rec	LDM (ng/L)	Ref.
I, Cl, D, L, N	agua de ríos y estuarios (preconcentración en línea PRP-1 y fuera de línea C <sub>18</sub> y cromatografía en fase reversa)	UV	80 - 100	10 - 50	51
Mx, M, Cl, D, ClBr, N	Agua superficial (preconcentración en línea C <sub>18</sub> y cromatografía en fase reversa)	EM	80-100	500 - 1000	52
Mx, MI, MBr, D, L	Agua potable (preconcentración y análisis con una columna C <sub>18</sub> )	UV	83-104	50 - 150	53
Cl,I,D,L,Difb	Agua superficial (preconcentración con inmunoabsorbente anti-Isoproturon y cromatografía en fase reversa)	EM	80-91	70 - 100	54
M, Cl, I, D	plantas (inmuno cromatografía - columna anti-isoproturon y prelavado con precolumna de intercambio aniónico)	UV	103	(25 ng/g)	55
D,I,Cl	Aguas naturales (microextracción en fase sólida con Carbo-pack B para fenilureas y CG)	EM	80-100	0.3 - 1	56
16 fenilureas	Agua pura (preconcentración C <sub>18</sub> y cromatografía en fase reversa)	UV	88-104	(100)	57

\*I = Isoproturon, Cl = Clortoluron, D = Diuron, L = Linuron, N = Neburon, Mx = Metoxuron, ClBr = Clorobromuron, MI = Monolinuron, MBr = Monobromuron, Difb = Dibuobenzuron

**Capítulo 2. DESARROLLO EXPERIMENTAL**

**2.1 EQUIPO Y ACCESORIOS**

Sistema cromatográfico

Cromatógrafo de líquidos Gilson con capacidad para gradiente de elución binario, que consta de:

- Bomba maestra (Modelo 305)
- Bomba esclava (Modelo 306)
- Mezclador dinámico (Modelo 811B)
- Módulo manométrico (Modelo 805)

Inyector de rizo Rheodyne 7125 con rizos de 20 y 100  $\mu\text{L}$ .

Columna Envirosep de 12.5 cm de longitud y 0.32 mm de d.i. empacada con fase reversa  $\text{C}_{18}$  químicamente enlazada a sílice.

Detector espectrofotométrico UV-VIS Shimadzu Modelo SPD-10 AVVP

Integrador Hewlett Packard (HP 3396A).

Tubería de acero inoxidable de 0.25 mm de diámetro interno.

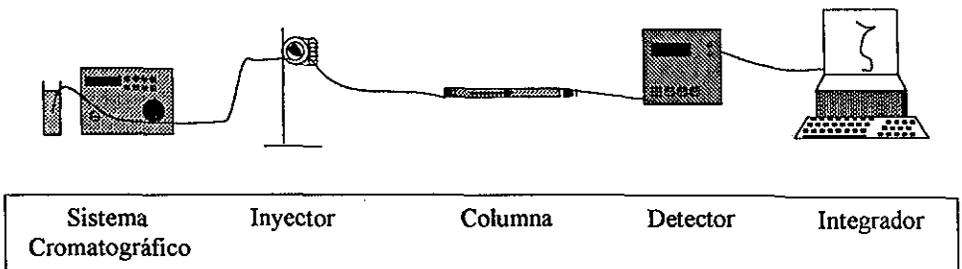


Figura 10. Esquema operacional del sistema cromatográfico utilizado.

Otros

Purificador y desionizador de agua NANO pure (Barnstead Thermolyne modelo 04741).

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Baño de ultrasonido para desgasificar disoluciones y fases móviles (Sonicor, modelo SC-100)

Micropipetas de volúmenes variables

Potenciómetro Corning modelo 220 equipado con electrodo combinado de vidrio calomel, Cole-Parmer, modelo 60640

Sistema de filtración de vidrio Millipore modelo OM027 con membrana de nylon con poro de 0.45  $\mu\text{m}$ , 47 mm diámetro

Cartuchos de Inmunoadsorción anticuerpos anti- isoproturon ligados enlazados químicamente a sílice.

Material común de laboratorio

### 2.2 DISOLVENTES Y REACTIVOS

Agua grado reactivo Tipo I

Acetonitrilo, grado HPLC, 99.8% min., Prolabo

Metanol, grado HPLC, 99.99% mín., Omnisolv

Azida de sodio, grado reactivo, 99.5%, Sigma

Ácido o-fosfórico, grado reactivo, 85%, Merck.

Hidróxido de sodio, 98%, bajo contenido en carbonatos, Merck.

Ácido perclórico, grado reactivo, 69.7%, Baker

Ácido acético glacial, grado reactivo, 99.7%, Baker

Ácido fórmico, grado reactivo, 98%, Merck

Cloruro de sodio, grado reactivo, 99.67%, Mallinckrodt

Cloruro de potasio, grado reactivo, 99.3%, Baker

Isoproturón, 99% de pureza, Chem Service

Fluometurón, 99% de pureza, Chem Service

Diurón, 99% de pureza, Chem Service

Monurón, 99% de pureza, Chem Service

Neburón, 99% de pureza, Chem Service

Linurón, 99% de pureza, Chem Service

Metiocarb, 99% de pureza, Chem Service

Metilparatión, 99.5% de pureza, Chem Service

### 2.3 PREPARACIÓN DE DISOLUCIONES

#### Disoluciones patrón

Disolución patrón de isoproturón 1000 mg/L en acetonitrilo

Disolución patrón de fluometurón 1000 mg/L en acetonitrilo

Disolución patrón de diurón 1000 mg/L en acetonitrilo

Disolución patrón de monurón 1000 mg/L en acetonitrilo

Disolución patrón de neburón 1000 mg/L en acetonitrilo

Disolución patrón de linurón 1000 mg/L en acetonitrilo

Disolución patrón de metiocarb 1000 mg/L en acetonitrilo

Disolución patrón de metilparatión 1000 mg/L en acetonitrilo

Todas estas disoluciones se almacenaron en refrigeración y se fueron tomando las cantidades necesarias para cada experimento.

#### Solución salina de fosfatos (PBS-Phosphate Buffered Solution)

Se preparó a partir de ácido o-fosfórico 0.02 M, adicionando también KCl y NaCl para obtener concentraciones de 0.0027 M y 0.137 M respectivamente. Se agregó poco a poco una disolución concentrada de NaOH, hasta ajustar a un pH de 7.4. La solución se mantuvo en refrigeración.

#### Disoluciones de trabajo

Se tomaron alícuotas conocidas de las disoluciones patrón, y se diluyeron convenientemente utilizando acetonitrilo, metanol, agua o PBS, de acuerdo con lo requerido para los experimentos.

### **Fases móviles**

Se realizaron mezclas convenientes de los disolventes (acetonitrilo y agua) y se sonicaron antes de ser utilizadas.

## **2.4 METODOLOGÍA**

### **2.4.1 Condiciones cromatográficas**

#### **a) Separación cromatográfica**

Con el fin de obtener la mejor separación cromatográfica de los compuestos feniluréicos estudiados, se probaron distintas condiciones para las siguientes variables:

- i. Fase estacionaria. Se probaron distintas columnas de fase reversa.
- ii. Fase móvil. Se probaron distintas mezclas acetonitrilo: agua y también condiciones distintas de pH y fuerza iónica.
- iii. Elución. Se ensayaron tanto condiciones de elución isocrática como de gradiente.
- iv. Detector (UV y electroquímico). Inicialmente se utilizaron ambos detectores en línea y se observó la respuesta de los compuestos en cada detector.

#### **b) Linealidad de la respuesta del detector**

A partir de una mezcla de fenilureas a concentración conocida en acetonitrilo, se prepararon diluciones en el mismo disolvente. Estas últimas fueron inyectadas en el cromatógrafo utilizando las condiciones de separación previamente establecidas y se evaluó la respuesta del detector a concentraciones crecientes de los analitos.

### 2.4.2 Caracterización del inmuoadsorbente

#### Isoproturón. Compuesto modelo

En esta etapa del desarrollo experimental se estudiaron las condiciones para la adsorción (preconcentración) y desorción (elución) del Isoproturón. Una vez halladas las condiciones óptimas de preconcentración para Isoproturón, se estudió la adsorción/desorción de las fenilureas restantes.

#### Soluciones de carga

Las soluciones de carga empleadas en el estudio realizado para establecer las condiciones óptimas de elución, fueron preparadas haciendo diluciones convenientes de la solución patrón de isoproturón, en PBS 0.02 M. Para el estudio de la preconcentración, se varió la composición de estas soluciones modificando diversos parámetros.

#### Tratamiento del inmuoadsorbente

El inmuoadsorbente se almacenó en PBS 0.02 M y refrigeración cuando no se utilizaba. Después de cada experimento se hizo pasar una cantidad fija de mezcla MeOH:H<sub>2</sub>O para asegurar la elución completa de cualquier compuesto remanente en el cartucho antes de iniciar el siguiente experimento, con la finalidad de evitar contaminación cruzada, después se regeneró el inmuoadsorbente con solución de PBS durante un tiempo mínimo de 15 minutos y finalmente se hicieron pasar 2 mL de agua.

El efecto producido por la modificación de cada variable fue medido como porcentaje de recuperación de isoproturón. La cantidad de soluto recuperado se determinó por cromatografía, comparando las áreas obtenidas en la inyección de los eluatos contra las áreas de soluciones de concentración conocida.

### 2.4.2.1 Condiciones para la elución

Con el objetivo de encontrar las condiciones óptimas que permitieran asegurar la elución completa del isoproturón en el mínimo volumen de eluyente, se estudiaron las variables abajo señaladas. El cartucho se cargó previamente con una cantidad fija de isoproturón (73 ng) disuelto en PBS. El volumen de carga fue de 3 mL para la primera serie de ensayos (composición del eluyente) y de 1 mL para los siguientes (pH, velocidad y volumen de elución).

#### Composición del eluyente

Se prepararon diversas mezclas metanol: agua, las cuales se utilizaron para eluir el isoproturón previamente cargado en el cartucho. Inicialmente, se utilizó un mL de la mezcla para eluir y la cantidad recuperada de Isoproturón en este volumen se determinó por análisis cromatográfico.

#### pH del eluyente

Se utilizaron mezclas metanol-buffer acuoso (60:40 v/v). En la fase acuosa se variaron los valores de pH utilizando una mezcla de ácido fosfórico, ácido acético y ácido fórmico  $2 \times 10^{-3}$  M cada uno, ajustando al valor deseado con una disolución de NaOH. Se estudió el intervalo de pH de 2.5 a 7.

#### Velocidad de elución

A una composición fija, se hizo pasar 1 mL del eluyente a distintas velocidades de flujo.

### **Volumen de elución**

Se utilizaron volúmenes distintos del eluyente manteniendo fija su composición. El intervalo estudiado fue de 0.5 a 5 mL.

### **2.4.2.2 Condiciones para la preconcentración**

En todos los experimentos de esta sección se utilizaron condiciones fijas y constantes de elución, según los resultados obtenidos en la sección precedente.

### **Concentración del analito en la solución de carga**

Se realizaron diluciones convenientes de la disolución patrón de isotroturón en PBS 0.02 M, para obtener soluciones a diferentes concentraciones del analito. Con cada solución se hizo una carga independiente del cartucho, fijando el volumen de carga en 1 mL.

### **Velocidad de carga**

Se realizaron experimentos cargando la disolución de isotroturón a diferentes velocidades de flujo para observar cómo afectaba esta variable a la recuperación.

### **Volumen de carga**

Se determinó la recuperación del isotroturón a diferentes volúmenes de carga, manteniendo constante la cantidad cargada del analito (73 ng). Se utilizó una velocidad de flujo de 1 mL/min para los volúmenes de carga menores y un flujo de 4 mL/min para cargas mayores a 50 mL.

### **pH de la solución de carga**

Se estudió el efecto del cambio de pH en la solución de carga de isotroturón. Para imponer el pH se utilizó una mezcla de ácido fosfórico, ácido acético y ácido fórmico  $2 \times 10^{-3}$  M cada uno, ajustando al valor deseado con una disolución de NaOH. El intervalo de pH estudiado fue de 3 a 7.5.

### **Concentración del buffer en la solución de carga**

Después de encontrar las mejores condiciones para la preconcentración del isotroturón (volumen, velocidad y pH de la solución de carga), se buscó optimizar el porcentaje de recuperación del analito variando la concentración del buffer y por lo tanto la fuerza iónica. En este caso se utilizaron disoluciones de PBS a distintas concentraciones, en un intervalo de 0 a 0.02 M, para ajustar esta variable.

### **Capacidad del cartucho**

Para determinar la capacidad del cartucho (medida como la cantidad máxima de isotroturón que puede ser retenida –expresada en ng-) se tomó como referencia la capacidad teórica reportada por el fabricante (500 ng de Isotroturón). Se cargaron 500 ng de isotroturón en 1 mL de solución, realizando el experimento en las condiciones óptimas encontradas para la preconcentración y elución.

#### **2.4.2.3 Método preliminar para la EFS**

Con base en los resultados obtenidos en las secciones 2.4.2.1 y 2.4.2.2, se planteó un método preliminar que incluye los pasos de preconcentración del analito, lavado, elución del analito y regeneración del cartucho.

### 2.4.2.4 Reactividad cruzada

Para estos experimentos se utilizaron las mejores condiciones para la preconcentración y elución. Las fenilureas utilizadas fueron: isotproturón (compuesto modelo), monurón, fluometurón, diurón, linurón y neburón.

#### Adsorción de las fenilureas en cargas independientes

Se cargaron 60 ng de cada fenilurea por separado en dos volúmenes distintos: 1 mL y 100 mL, para ver también el efecto de la concentración y el volumen de carga sobre la recuperación.

#### Adsorción de isotproturón en presencia de analitos del mismo grupo funcional.

Se utilizaron dos compuestos feniluréicos para ver cómo influía su presencia en la recuperación de isotproturón. Por un lado, para ver el efecto de la presencia de otro soluto que fuese apreciablemente retenido (monurón), se prepararon 100 mL de mezclas conteniendo una cantidad fija de Isotproturón (18 ng) y cantidades variables de monurón (5 a 100 ng). Por el otro lado, para ver el efecto de la presencia de un soluto poco retenido (fluometurón) se prepararon 100 mL de mezclas conteniendo la misma cantidad fija de isotproturón (18 ng) y cantidades variables de fluometurón (5 a 100 ng). El eluato de cada experimento (1 mL) fue inyectado al cromatógrafo y comparado con soluciones estándar con la misma composición teórica (suponiendo una recuperación al 100 % de ambos analitos).

#### Adsorción de isotproturón en presencia de analitos con diferentes grupos funcionales.

Se utilizaron dos contaminantes no feniluréicos conocidos, para ver como influía su presencia en la recuperación de Isotproturón. Se preparó una mezcla (M) de isotproturón, metilparatió y metiocarb con 50 ng de cada uno en volúmenes diferentes de PBS (1, 10 y 25 mL). Se realizó el proceso de preconcentración, elución y análisis cromatográfico

(condiciones de separación definidas previamente) y se observó el efecto que tenía la presencia de metiocarb y metilparatión sobre la recuperación de isoproturón. Los resultados se compararon con una solución de isoproturón solo (50 ng en los volúmenes correspondientes).

### 2.4.3 Establecimiento y evaluación de un método analítico para la determinación de trazas de isoproturón y diurón en muestras de agua

#### 2.4.3.1 Establecimiento del método

Se eligieron las fenilureas a utilizar para el método (isoproturón y diurón), las etapas del método y las condiciones necesarias para cada etapa. Se fijaron las condiciones siguientes para la inmunoextracción:

Velocidad de carga: 5 mL/min

Volumen de carga: 50 mL

pH de la solución de carga: 7.4

Fuerza iónica de la solución de carga:  $1.9 \times 10^{-1}$  M  
con PBS  $2 \times 10^{-2}$  M

Velocidad de elución: 1 mL/min

Volumen de elución: 2 mL

Eluyente: CH<sub>3</sub>OH – H<sub>2</sub>O (60:40 v/v)

Para el análisis cromatográfico, dado que sólo se trabajó con dos fenilureas, se utilizaron condiciones isocráticas. Las condiciones experimentales fueron las siguientes:

Columna Envirosep-pp de fase reversa C<sub>18</sub> polimérica químicamente ligada a un soporte de sílice (1 2.5 X 3.2 mm D.I)

Fase móvil: acetonitrilo-agua (40:60 v/v)

Flujo: 1 mL/min

Detección UV a 254 nm

### 2.4.3.2 Evaluación Estadística del Método

#### a) Linealidad.

Para evaluar la linealidad del método se analizaron muestras de agua dopadas con concentraciones conocidas de los dos analitos de interés (isoproturón y diurón), en un intervalo de 0 a 3 ppb, correspondiente a un intervalo de cantidad cargada de 0 a 150 ng para cada fenilurea.

#### b) Porcentaje de recuperación a diferentes concentraciones del analito en la solución de carga

Con los datos de la sección anterior (2.4.3.2.b) se graficó la cantidad recuperada experimentalmente contra la cantidad nominal cargada y se evaluaron las pendientes.

#### c) Precisión (como repetibilidad), límite de detección y exactitud

Se analizaron una serie de muestras dopadas con los analitos a una concentración de 0.8 ng/mL (40 ng en 50 mL de muestra).

### 2.4.4 Estudio comparativo de la estabilidad del isoproturón en el cartucho y en muestras acuosas

Se prepararon disoluciones de isoproturón en agua a una concentración fija de 25 ng/mL y se almacenaron en refrigeración. También se cargaron cartuchos con 50 ng de isoproturón cada uno, y se almacenaron. En días pre-establecidos (desde el día cero hasta el día 103) se retiró de refrigeración una muestra de la disolución en agua y se cuantificó el Isoproturón por inyección directa de 100  $\mu$ L de la muestra en el cromatógrafo de líquidos. Del mismo modo se retiró un cartucho, se eluyó el isoproturón con 2 mL de eluyente y se cuantificó. Las muestras fueron comparadas con una solución de Isoproturón de 25 ng/mL recientemente preparada.

### **2.4.5 Aplicación a muestras reales**

Se aplicó al análisis de los herbicidas (isoproturón y diurón) en muestras de agua potable, superficial y subterránea. Se utilizaron muestras de 45 mL de cada tipo de agua mezcladas con 5 mL de una solución de buffer de fosfatos (volumen de muestra de 50 mL, concentración de buffer de 0.02, pH alrededor de la neutralidad). Se evaluó la recuperación de los analitos en las muestras de agua, su estabilidad en las muestras

### Capítulo 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 3.1 CONDICIONES CROMATOGRÁFICAS

##### 3.1.1 Separación cromatográfica y detección

Inicialmente se probaron los detectores ultravioleta y electroquímico con el objeto de tener, por una parte, un modo de detección selectivo, y por otra, la información complementaria de dos detectores que puede ser muy útil para la identificación inequívoca de un compuesto en el análisis de muestras reales. Sin embargo, al realizar inyecciones por separado de cada soluto, se observó que la oxidación electroquímica de algunos de los compuestos feniluréicos requiere potenciales muy altos (como el diurón, linurón y neburón), lo que provoca una corriente residual elevada y por lo tanto un gran ruido en la línea base. Además se observó que los productos de oxidación formados a potenciales muy altos quedaban adsorbidos en la superficie del electrodo, impidiendo su buen funcionamiento. Debido a esto, finalmente se decidió trabajar sólo con el detector de UV a 254 nm.

Los ensayos preliminares realizados en columnas convencionales de fase reversa monomérica C<sub>18</sub> (Hypersil, Spherisorb) mostraron que este tipo de fase no era capaz de resolver adecuadamente todas las fenilureas estudiadas. En particular, la separación entre fluometurón, isoproturón y diurón fue muy incompleta en todas las condiciones de fase móvil ensayadas.

Por ello, se decidió probar una columna de fase reversa polimérica C<sub>18</sub>, la cual ha dado previamente resultados muy satisfactorios en la separación de solutos con estructuras similares, como es el caso de algunos hidrocarburos aromáticos polinucleares. Con esta columna se logró obtener una buena resolución para todo el grupo de fenilureas.

La separación se realizó primero en condiciones isocráticas de elución (fase móvil CH<sub>3</sub>CN:H<sub>2</sub>O, 40:60 v/v), con un tiempo de análisis aproximado de 30 minutos. El

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

cromatograma obtenido con estas condiciones se muestra en la figura 11 (a). Es evidente, de esta figura, que la separación puede ser optimizada mediante un gradiente de elución, que permita disminuir el ensanchamiento del pico del soluto más retenido y lograr una distribución más homogénea de los picos en el cromatograma. Por otra parte, puesto que se pretende aplicar el método de preconcentración y análisis de fenilureas a muestras de agua naturales, es recomendable dejar un espacio libre al inicio del cromatograma para la eventual elución del "pico de matriz". Este último proviene de compuestos polares (ácidos húmicos y fúlvicos) presentes en estas aguas, que no logran eliminarse durante el procedimiento de preparación de muestra. Por las razones expuestas, se decidió poner a punto una separación de fenilureas por gradiente de elución. Las condiciones finalmente adoptadas fueron:

Fases móviles:      A.  $\text{CH}_3\text{CN}:\text{H}_2\text{O}$  (10:90)  
                              B.  $\text{CH}_3\text{CN}:\text{H}_2\text{O}$  (75:25)

Gradiente:	0 min	9% B	15 % $\text{CH}_3\text{CN}$ :
	5 min	30% B	30 % $\text{CH}_3\text{CN}$ :
	20 min	92% B	70 % $\text{CH}_3\text{CN}$ :
	30 min	92 % B	70 % $\text{CH}_3\text{CN}$ :

El cromatograma correspondiente se muestra en la Figura 11 (b) y las estructuras de los solutos estudiados se presentan en la figura 11 (c).

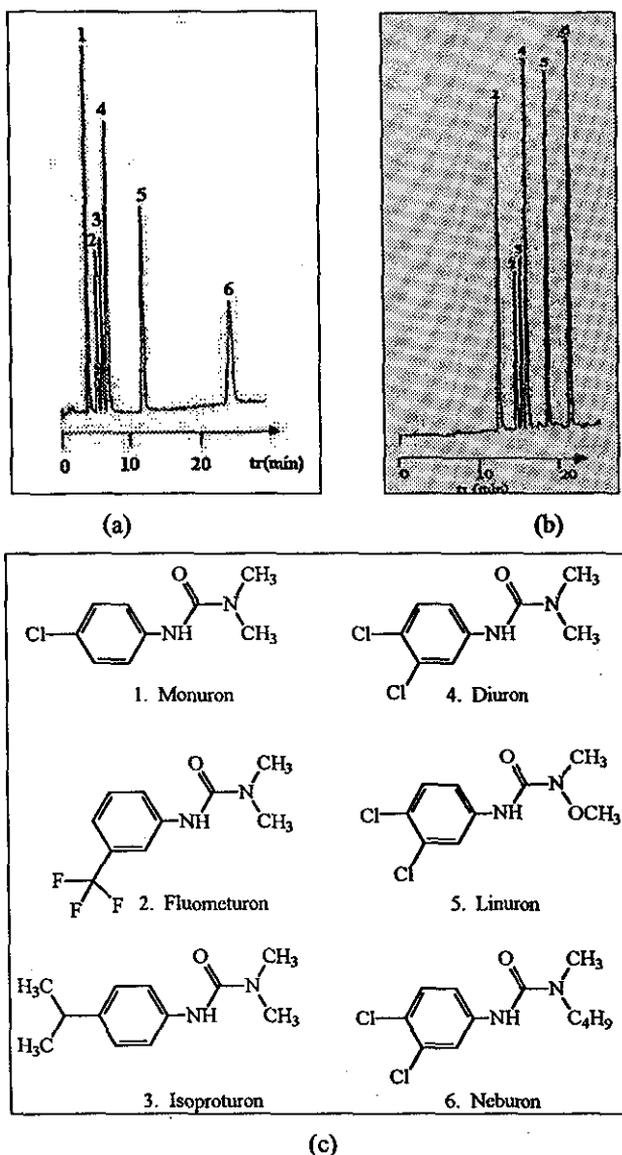


Figura. 11. Separación cromatográfica de fenilureas. Condiciones: , columna Envirosepp (125×3.2 mm D.I.), detección UV a 254 nm, flujo 1 mL/min; concentración 5 ppm a) Elución isocrática con CH<sub>3</sub>CN:H<sub>2</sub>O 40:60 (v/v) y b) elución en gradiente, fase A: CH<sub>3</sub>CN:H<sub>2</sub>O 10:90 (v/v) y fase B: CH<sub>3</sub>CN:H<sub>2</sub>O 75:25 (v/v), programa: 0 min – 9% B, 5 min – 30% B, 20 min – 92 % B y luego constante. c) Identificación de los solutos y su correspondiente estructura.

**3.1.2 Linealidad de la Respuesta del Detector**

Una vez separados los compuestos, se evaluó la respuesta del detector UV frente a concentraciones distintas de una mezcla de los analitos. La separación se realizó por gradiente de elución, con las condiciones antes establecidas. El comportamiento encontrado se muestra en la Figura 12 y la tabla VII.

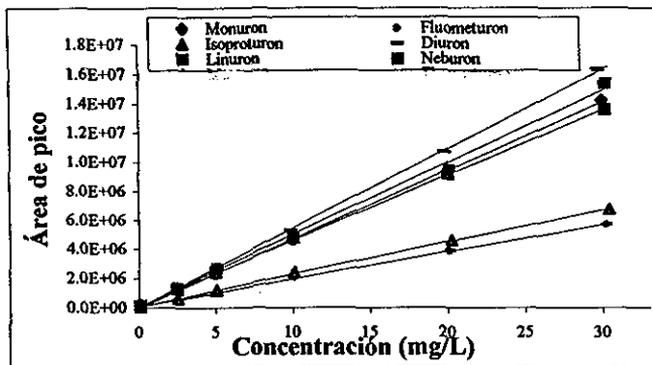


Figura 12. Respuesta del detector UV frente a concentraciones variables de una mezcla de los seis analitos estudiados.

Tabla VII. Análisis estadístico de los datos de área de pico vs concentración.

Compuesto	Ecuación de regresión	Coefficiente de correlación $r^2$
Diurón	$y = 543670x - 4531$	0.9997
Neburón	$y = 494014x + 66804$	0.9972
Monurón	$y = 471254x - 28145$	0.9997
Linurón	$y = 446001x + 145385$	0.9999
Isoproturón	$y = 220210x + 71384$	0.9996
Fluometurón	$y = 186766x + 73089$	0.9994

Los coeficientes de correlación obtenidos ( $\leq 0.9997$ ) al aplicar el análisis de regresión lineal a los datos experimentales,<sup>46</sup> indican un comportamiento lineal de la respuesta del detector en función de la concentración en el intervalo de 0.05 a 30 ppm. Dado que para este estudio se utilizó el rizo de 20  $\mu$ L en el inyector del cromatógrafo, el

## **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

intervalo anterior expresado en cantidad de soluto inyectado corresponde a 1 a 600 ng. Con base en estos resultados, en los estudios posteriores la cuantificación de los analitos se llevó a cabo por estándar externo, inyectando un solo estándar.

### **3.2 CARACTERIZACIÓN DEL INMUNOADSORBENTE**

En esta etapa del proyecto se trabajó únicamente con muestras de agua grado cromatográfico dopadas con isoproturón para establecer las condiciones óptimas de extracción en fase sólida. Esta elección se hizo debido a que los anticuerpos del inmunoadsorbente utilizado fueron obtenidos a partir de Isoproturón y es por lo tanto (hipotéticamente) el compuesto más fuertemente retenido en el cartucho. Se utilizaron distintos cartuchos de un mismo lote y por lo tanto de características idénticas.

#### **3.2.1 Condiciones para la Elución**

La primer parte que se trabajó fue la parte de elución, buscando las condiciones en que se garantizara la desorción completa del analito, al cargar una cantidad conocida de éste.

Las variables estudiadas fueron:

Composición del eluyente

pH del eluyente

Velocidad de elución

Volumen de elución

##### **3.2.1.1 Efecto de la composición del eluyente**

Con el objeto de intentar no utilizar concentraciones altas de disolventes no acuosos que puedan llegar a dañar el inmunoadsorbente por desnaturalización del anticuerpo, para este inmunoadsorbente únicamente se probaron mezclas metanol-agua de composición

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

variable. El cartucho se cargó con una cantidad fija de isotroturón en cada ensayo (volumen y concentración de la solución de carga constantes) y se evaluaron las recuperaciones con las diferentes mezclas de elución. Después de cada ciclo de adsorción – desorción, el cartucho se dejó en reposo en PBS durante una hora antes de iniciar la siguiente carga. Los resultados se muestran en la Figura 13.

Cabe señalar que estos experimentos se hicieron en dos cartuchos usados alternadamente. Después de la serie de ensayos no se observó disminución en la recuperación inicial del isotroturón. Lo anterior significa que el anticuerpo inmovilizado puede estar en contacto con mezclas ricas en metanol e incluso con metanol puro, por cortos periodos de tiempo sin sufrir una alteración o desnaturalización permanente.

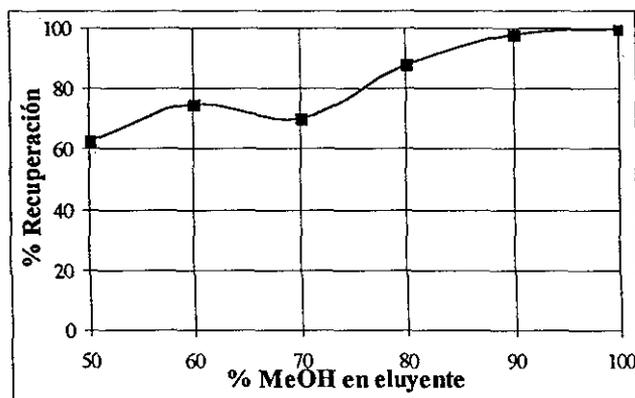


Figura 13. Efecto de la composición de eluyente. Volumen de elución, 1 mL. Cantidad de Isoproturón cargada, 73 ng. Volumen de carga, 3 mL.

En la Figura 13 se observa un aumento en la recuperación del Isoproturón al aumentar el contenido de metanol en el eluyente. Es posible que la disociación del complejo antígeno – anticuerpo se produzca por una modificación en la configuración o estructura terciaria de la molécula del anticuerpo, inducida por la presencia de fases ricas en disolvente orgánico. Sin embargo, como se mencionó anteriormente, este cambio no es permanente y el anticuerpo es capaz de recuperar su conformación original (activa) al estar sumergido nuevamente en PBS. A pesar de ello, se prefirió no exponer al anticuerpo a un

## **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

medio tan hostil como el metanol puro, con el objeto de prolongar la vida útil de los cartuchos.

Por lo tanto, se decidió utilizar en todos los experimentos posteriores una mezcla de elución compuesta por 60% de metanol y 40% de disolución acuosa; de esta manera se le hace la mínima "agresión" a la proteína por el disolvente y la recuperación obtenida se mejorará por medio de otras variables.

### **3.2.1.2 Efecto del pH en la mezcla de elución**

Por otro lado se observó que la variación del pH del eluyente hacia medios ácidos (a valores básicos se afecta la sílice utilizada para el soporte del anticuerpo) no tenía ningún efecto en la recuperación. El intervalo estudiado fue de pH 2.5 a 7.0.

Aunque algunos investigadores<sup>50</sup> han utilizado buffers ácidos como eluyentes en cartuchos de inmunoextracción, estos eluyentes han sido puramente acuosos. En nuestro caso, el eluyente contenía 60 % de metanol con el 40 % restante de medio acuoso ácido. Se pensó que el pH podría tener efecto de alguna de las siguientes formas: a) sobre el analito (cambiando de molécula a ión) cambiando la forma de interacción con el anticuerpo o bien b) sobre el anticuerpo desnaturalizándolo o cambiando su estructura tridimensional, evitando la interacción con el isotruturón. Los resultados obtenidos indican que no hay un efecto sinérgico entre la disminución de pH de la porción acuosa del eluyente y su contenido de metanol. Por ello, se decidió utilizar como eluyente la mezcla metanol - agua sin ajuste de pH.

### **3.2.1.3 Efecto de la velocidad de elución**

A velocidades de elución sumamente bajas, dejando pasar 1 mL de eluyente por gravedad a través del cartucho (velocidad promedio de 0.0125 mL/min), se obtuvo una recuperación de 93 % del Isotruturón. Al aumentar la velocidad de flujo a valores más prácticos, de 0.5 y 2 mL/min, se recuperó ~ 83 % . La diferencia observada no es

significativa ya que es comparable a la variabilidad de los resultados obtenidos en los cartuchos. En efecto, los resultados cambian ligeramente dependiendo del tiempo de reposo del cartucho entre experimentos subsecuentes (para los experimentos de esta sección el tiempo de reposo fue de 15 min), del mayor o menor uso del cartucho, del tiempo que permanece el cartucho guardado en refrigeración entre dos series de experimentos, etc. Por ello, en general siempre se trató de realizar todos los experimentos de una serie en el mismo día y procurando mantener constante el tiempo de reposo entre experimentos. Para disminuir el tiempo de los ensayos se decidió eluir a una velocidad promedio de 1 mL/min en los siguientes experimentos.

### 3.2.1.4 Efecto del volumen de elución

Los resultados del estudio de esta variable se muestran en la Figura 14. Para una cantidad de 73 ng de isotruturón cargados en el cartucho, es posible utilizar entre 1 y 5 mL de eluyente sin afectar la recuperación. Evidentemente, entre más pequeño sea el volumen de elución, mayor será la tasa de preconcentración lograda y por lo tanto la sensibilidad del método analítico. Los ensayos realizados mostraron que el mínimo volumen de eluyente que puede utilizarse sin afectar la recuperación es de 1 mL.

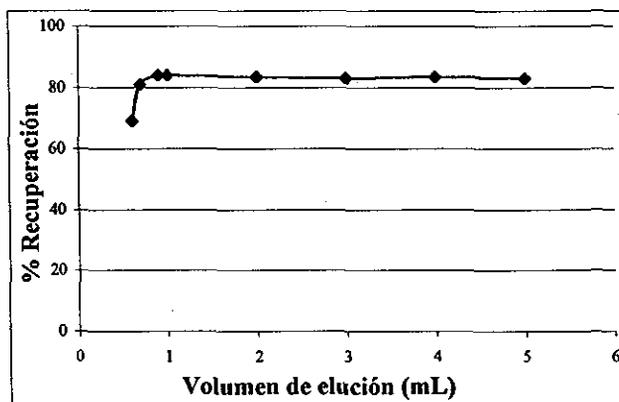


Figura 14. Efecto del volumen de elución. Carga de 73 ng de Isoproturón en 1 mL de PBS. Elución con  $\text{CH}_3\text{OH} - \text{H}_2\text{O}$  60:40 (v/v) a 1 mL/min.

### 3.2.1.5 Condiciones óptimas de elución.

De acuerdo con los resultados obtenidos, las condiciones óptimas de elución, considerando la sensibilidad del método, tiempo de análisis y % de recuperación del analito son:

2 mL de MeOH:H<sub>2</sub>O 60:40 v/v a flujo de 1 mL/min.

Cabe aclarar que con el uso repetido del cartucho la permeabilidad disminuye y es difícil operar a velocidades de flujo mayores manualmente. Por esta razón no se propone un flujo de 2 mL/min.

### 3.2.2 Condiciones para la preconcentración

Una vez determinadas las condiciones óptimas para la elución, se procedió a estudiar la parte de preconcentración. En este punto se buscaron las condiciones adecuadas para que la tasa de preconcentración y los porcentajes de recuperación fueran los máximos, tratando además de minimizar el tiempo total de la extracción en fase sólida.

Las variables estudiadas fueron las siguientes:

- Concentración del analito en la solución de carga
- Volumen de carga
- Velocidad de carga
- Concentración del buffer en la solución de carga
- pH de la solución de carga
- Capacidad del cartucho (medida como la cantidad máxima de Isoproturón que puede ser retenida –expresada en ng–)

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En todos los ensayos realizados en esta parte, el tiempo de reposo del cartucho utilizado, entre experimentos subsiguientes, fue de 15 min.

### 3.2.2.1 Efecto de la concentración del analito

La primera variable a estudiar en este punto fue la concentración del analito en la solución de carga. La Figura 15 presenta los resultados obtenidos para esta variable. Todos los experimentos marcados en la Figura 15 se realizaron en el mismo cartucho, el cual había sido utilizado previamente (antes de comenzar este estudio) en 13 ciclos de adsorción - desorción.

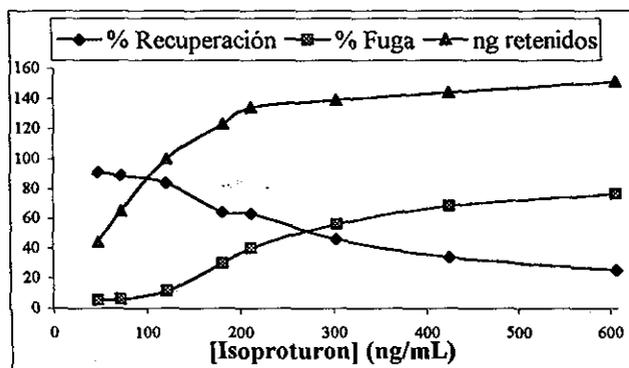


Figura 15. Efecto de la concentración de Isoproturón en la solución de carga. Carga de 1 mL de disolución del analito en PBS 0.02 M (pH = 7.4) a flujo de 1 mL/min.

En la figura podemos observar que la gráfica del porcentaje de fuga varía en forma sigmoideal ascendente con la concentración de isoproturón en la solución de carga. Por otro lado, podemos ver que la gráfica del porcentaje de recuperación varía de forma inversa a la de fuga.

Aunque esto último es evidente, cabe mencionar que la fuga y la recuperación se determinaron por procedimientos diferentes. Para la fuga se determinó la concentración de isoproturón en el efluente del cartucho obtenido al percolar la solución de carga. La recuperación se calculó a partir de la determinación de isoproturón en la mezcla metanol-

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

agua utilizada para eluir el cartucho. Los resultados obtenidos muestran que ambos procedimientos son válidos puesto que los valores obtenidos de uno y otro concuerdan satisfactoriamente.

También se representa la curva de cantidad retenida, cuya meseta correspondería al límite de retención por la capacidad del cartucho. Es interesante mencionar que este máximo en la cantidad retenida disminuye a medida que aumentan las veces que se utiliza el cartucho debido a que, por la manipulación física del inmunoabsorbente y contacto con el disolvente metanol-H<sub>2</sub>O, el cartucho se va deteriorando, probablemente debido a la desnaturalización del anticuerpo o bien a grupos funcionales que puedan oxidarse. No obstante, el cartucho sigue siendo utilizable y eficiente si se manejan concentraciones pequeñas, es decir que la cantidad de analito cargado esté muy por abajo de la capacidad del cartucho. En las siguientes figuras pueden verse los cambios cualitativos (Fig. 16) y cuantitativos (Fig. 17).

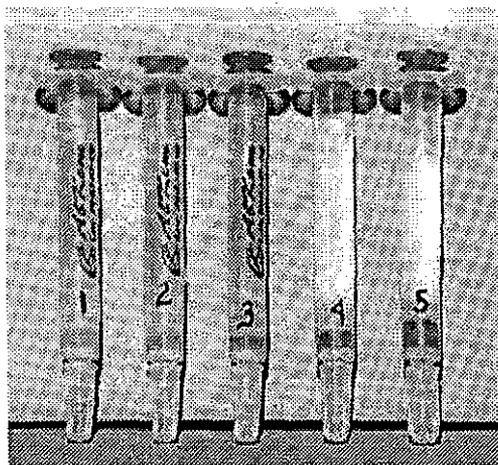


Figura 16. Apariencia de los cartuchos nuevos (1); después de 21 experimentos (2); después de 36 experimentos (3); después de 114 experimentos (4) y después 122 experimentos (5).

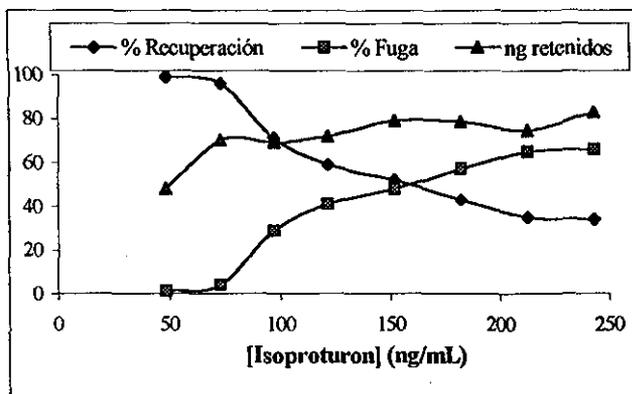


Figura 17. Efecto de la concentración de Isoproturon en la solución de carga. Ensayos en un cartucho usado previamente en 114 experimentos. Condiciones como en la Fig. 15

Para el análisis de las curvas de las figuras 15 y 17 es necesario tomar en cuenta algunos aspectos termodinámicos y cinéticos del proceso de extracción en fase sólida. Este corresponde de hecho a una cromatografía de análisis frontal.

El soluto disuelto en la fase móvil (la solución de carga) se introduce en la columna y avanza progresivamente a lo largo de ella, llenando a su paso los sitios activos del adsorbente y generando un frente de migración. Este frente es más o menos extendido, dependiendo de diversas condiciones experimentales (concentración del soluto en la solución de carga, flujo de la fase móvil, cinética del proceso adsorción – desorción, diámetro de las partículas del empaque, etc.) y de la distancia migrada. Cuando el frente emerge de la columna, el perfil de concentraciones del soluto a lo largo de éste tiene un aspecto sigmoidal (Fig. 18), el volumen de la solución de carga introducido en la columna hasta el momento en que empieza a emerger el frente se llama “volumen de fuga”, el volumen que corresponde al centro de masas o punto estequiométrico del frente (el punto medio) es el “volumen de retención” y el volumen del extremo final del frente recibe el nombre de “volumen de saturación”. La extensión o ensanchamiento final del frente está dada por la diferencia entre el volumen de saturación y el volumen de fuga; este ensanchamiento depende de los aspectos cinéticos del proceso. Por el contrario el volumen

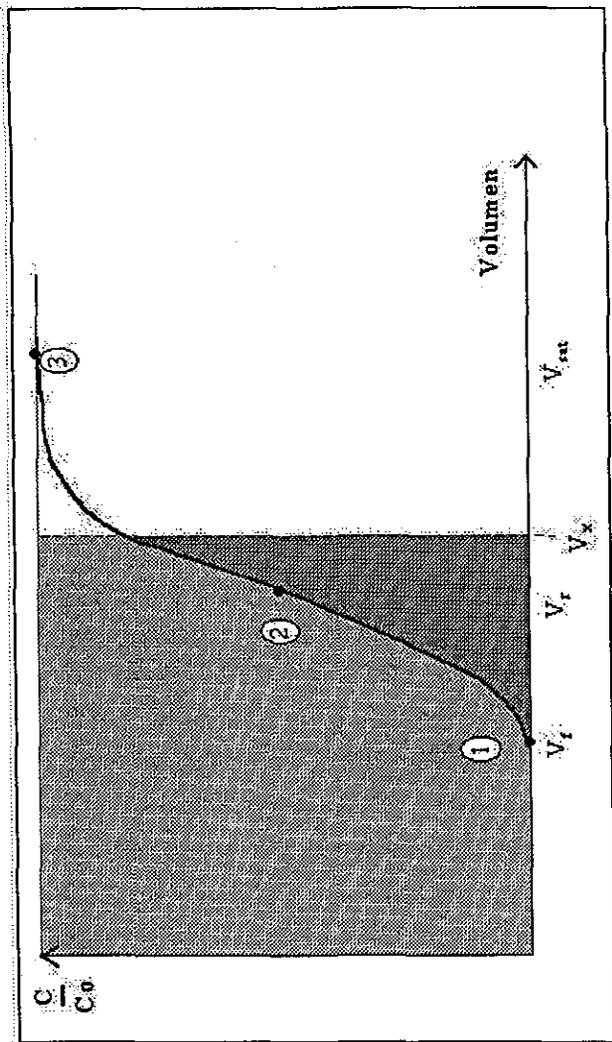


Figura 18. Imagen de un frente de migración del soluto.

- 1. Punto de inicio de fuga  $V_f$ . Volumen de fuga
- 2. Punto estequiométrico  $V_r$ . Volumen de retención
- 3. Punto de saturación  $V_{sat}$ . Volumen de saturación

Para un volumen de solución de analito  $V_x$ , cargado en el cartucho, el área bajo la curva es proporcional a la cantidad de soluto no retenida y el área sobre la curva es proporcional a la cantidad retenida.

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**

de retención es un parámetro termodinámico que depende del coeficiente de distribución del soluto en el sistema fase estacionaria – fase móvil empleado.

Cuando la fase estacionaria es un adsorbente con un número limitado de sitios activos (e. g. un inmunoadsorbente), la isoterma de distribución del soluto es convexa de tipo Langmuir. En este caso, el volumen correspondiente al punto estequiométrico del frente del soluto disminuye a medida que la concentración aumenta, es decir, el frente emerge de la columna a menores volúmenes de solución de carga. Por lo tanto, el volumen de fuga y el volumen de saturación también disminuyen. Esto se debe a que, dada la forma de la isoterma, el coeficiente de distribución del soluto disminuye al aumentar su concentración.

Por otra parte, el estudio cinético de procesos de análisis frontal, demuestra que el ensanchamiento del frente del soluto disminuye cuando la concentración aumenta. Esto significa que el volumen de fuga y el volumen de saturación se acercan al volumen de retención (los extremos se acercan al punto medio) y el frente se vuelve más vertical al aumentar la concentración del soluto. Con base en lo anterior, se discutirán las curvas de la Figura 14, dividiéndolas para su estudio en 3 regiones.

La primera región (Fig. 19-a) comprende concentraciones de soluto en la solución de carga menores a 100 ng/mL y se caracteriza por una recuperación alta (o una fuga pequeña) y prácticamente constante. La cantidad retenida del soluto aumenta proporcionalmente con la cantidad cargada y no depende estrictamente de la concentración. De hecho, se puede considerar que en esta región todo el soluto presente en la solución de carga es retenido (el porcentaje de recuperación no es forzosamente igual a 100, porque puede haber pérdidas de soluto en otros pasos como el lavado y/o la elución). Estas observaciones indican que el frente de migración del soluto no ha emergido del cartucho, es decir que el volumen de fuga (y por supuesto el volumen de retención y el volumen de saturación) es superior al volumen de carga (1 mL).

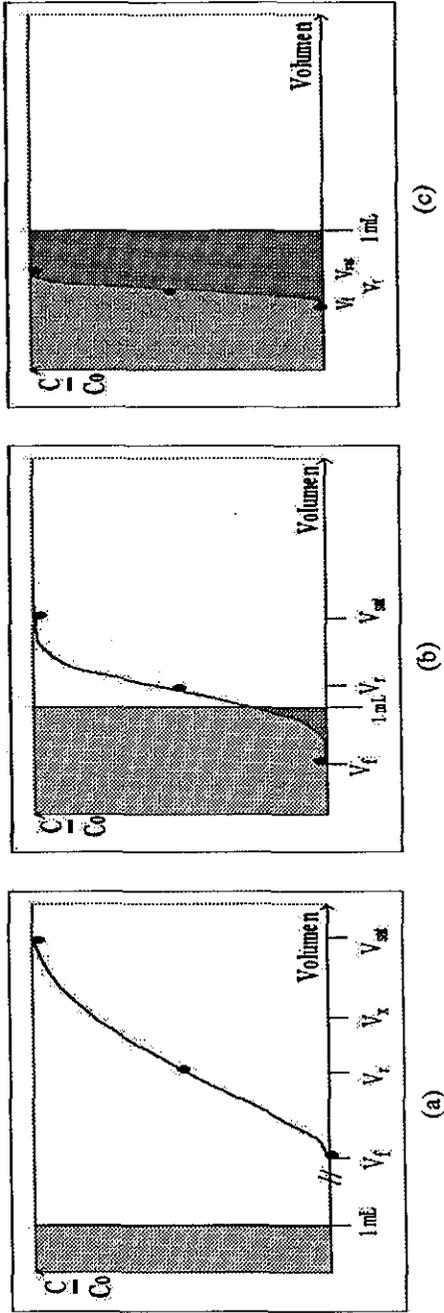


Figura 19. Efecto de la concentración de isoproturón en la solución de carga para un volumen cargado de 1 mL. (a) Imagen del frente de migración en la 1ª región (b) Imagen del frente de migración en la 2ª región (c) Imagen del frente de migración en la 3ª región. Cantidad retenida Cantidad no retenida

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

La segunda región (Fig. 9-b) incluye concentraciones desde alrededor de 100 ng/mL hasta la concentración que corresponde al inicio de la meseta en la curva de cantidad retenida de la Figura 15. En esta región sí existe un efecto de la concentración del soluto, pues a medida que ésta aumenta, el porcentaje de fuga se incrementa (y la recuperación disminuye) a pesar de que el cartucho no está saturado. Por lo tanto, aunque la cantidad retenida aumenta con la concentración, pues todavía hay sitios libres en el adsorbente, una proporción creciente del soluto cargado no es retenida. Es evidente que en esta región de concentraciones el volumen de retención del soluto ha disminuido suficientemente de modo tal que el frente ha comenzado a emerger del cartucho (volumen de fuga < 1 mL). A mayor concentración, mayor es la parte del frente que ha emergido del cartucho y mayor es la pérdida de soluto, hasta que todo el frente emerge del cartucho (volumen de saturación = 1 mL) y estas condiciones marcan el punto final de la segunda región. Los fenómenos que ocurren en esta región son típicos de los sistemas con un número de sitios de adsorción limitado. A medida que el número de moléculas de soluto en el sistema se aproxima al número de sitios activos presentes, la probabilidad de que una molécula particular encuentre un sitio de adsorción libre disminuye y por lo tanto la proporción de moléculas no retenidas aumenta. Debido a este fenómeno estadístico, la saturación del cartucho ocurre después del punto esperado, es decir cuando se ha cargado un exceso de soluto. Así, en la Fig. 15 el cartucho tiene una capacidad de alrededor de 140 ng de soluto pero la saturación (o meseta) se observa a partir del punto en el cual se cargan 200 ng del mismo.

Finalmente, la tercera región (Fig. 19-c) es la región de saturación de los sitios activos del adsorbente. En esta región, la cantidad de soluto retenido es constante e independiente de la concentración o la cantidad cargada. Por lo tanto, a medida que estas últimas aumentan, la recuperación disminuye. Es obvio que, en cualquier punto de esta región, el frente de migración del soluto emerge completamente del cartucho (volumen de saturación < 1 mL).

Regresando a la figura 17, podemos decir que parte del anticuerpo se ha dañado por el uso repetido del cartucho, dando como resultado una disminución en el número de sitios activos del adsorbente. La saturación se presenta para aproximadamente 80 ng de soluto

retenido. Las regiones están recorridas hacia valores de concentración menores y están menos definidas que en el caso anterior.

De acuerdo con los resultados obtenidos en esta sección y la discusión realizada, la retención del soluto es óptima en la región de bajas concentraciones (primera región), donde la cantidad de soluto cargado es muy inferior a la cantidad de soluto que corresponde a la saturación del cartucho. Por ello en los experimentos posteriores se trabajó con cargas menores a 100 ng.

### **3.2.2.2 Efecto de la velocidad de carga**

Para este estudio se cargó un volumen de 3 mL de una disolución de isoproturón a concentración de 24.3 ng/mL en PBS, lo que equivale a una carga total de 73 ng. El cartucho empleado tenía 25 usos previos a esta prueba.

Se realizaron cargas a flujos promedio de 1, 2.7, 3.5 y 4.4 mL/min. La recuperación obtenida en los cuatro ensayos no varió significativamente ( $< 10\%$ ), por lo que en las condiciones de este estudio se puede establecer que la velocidad de flujo no tiene un efecto apreciable sobre la cantidad de soluto retenido.

Cabe hacer notar que el volumen de retención de un soluto en un sistema cromatográfico es un parámetro termodinámico, y por lo tanto, no se afecta por el flujo. Sin embargo, la recuperación de un soluto en extracción en fase sólida sí puede verse afectada por el flujo, como se explica a continuación.

En un sistema de análisis frontal, el efecto del flujo en la retención del soluto está ligado con la velocidad de difusión de éste en los poros y sobre la superficie de la fase estacionaria y, generalmente en menor medida, con la velocidad de la reacción de interacción entre el soluto y el sitio activo. A medida que la velocidad de flujo aumenta, las moléculas del soluto tienen menos tiempo para difundir hacia los sitios activos del adsorbente e interactuar con ellos. En consecuencia, se produce una fuga prematura del

## *RESULTADOS Y DISCUSIÓN*

soluto aún cuando muchos sitios activos están aún libres; es decir, el volumen de inicio de fuga disminuye progresivamente al aumentar el flujo. Asimismo, el volumen de saturación aumenta porque la ocupación de todos los sitios activos requiere del paso de un exceso cada vez mayor de soluto a medida que se incrementa el flujo. El resultado de este proceso es un ensanchamiento del frente de migración, tanto más importante cuanto mayor es el flujo. Sin embargo, aunque los extremos del frente se alejan entre sí, el punto medio o punto estequiométrico (al cual está asociado el volumen de retención) no se modifica al aumentar el flujo (Fig. 20).

Por otra parte, como en todo proceso cromatográfico el ensanchamiento o dispersión del soluto depende del tamaño y distribución de tamaño de las partículas que conforman el lecho estacionario. Así, en columnas de extracción muy eficientes las variaciones del flujo (dentro de ciertos límites) tienen un efecto poco importante en el ensanchamiento de los frentes.

Los fenómenos anteriores se hacen patentes en la extracción en fase sólida cuando, al incrementar el flujo, el volumen de fuga disminuye a tal grado que resulta menor que el volumen de carga. En este caso se observará una disminución marcada en la recuperación del soluto a medida que el flujo es mayor.

En los ensayos realizados en esta sección se trabajó con un volumen de carga pequeño (3 mL). Aunque el flujo se aumentó más de cuatro veces, la recuperación del analito prácticamente no varió, por lo que se deduce que el volumen de fuga fue en todos los casos superior al volumen de carga.

De acuerdo con discusiones anteriores, el flujo óptimo dependerá de la concentración de Isoproturón en la solución de carga y del volumen cargado. Si estos parámetros aumentan simultáneamente, el flujo deberá reducirse para evitar o minimizar pérdidas del analito.

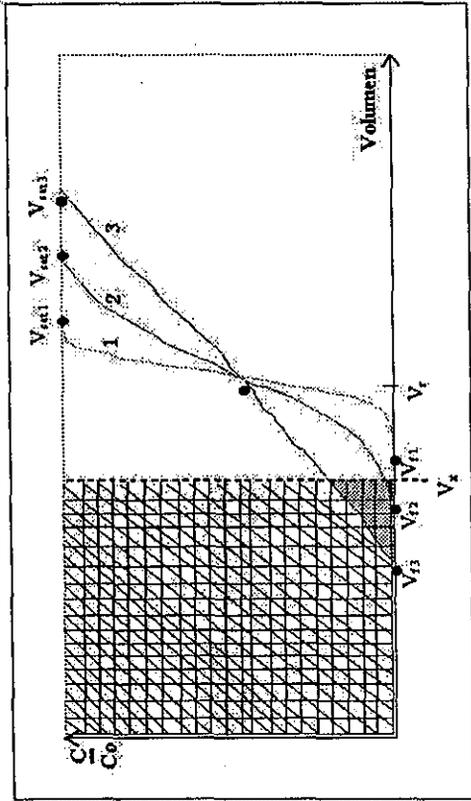


Figura 20. Efecto del flujo sobre el perfil de concentraciones del frente de migración del soluto. Las curvas 1, 2 y 3 representan los frentes de migración que se obtienen a velocidades de flujo progresivamente mayores durante la carga. El volumen de fuga ( $V_f$ ) disminuye al aumentar el flujo ( $V_B < V_2 < V_n$ ) y el volumen de saturación ( $V_{sat}$ ) aumenta con el flujo ( $V_{sat} > V_{sat} > V_{sat}$ ). El volumen de retención ( $V_r$ ) no es afectado por el flujo. Para un volumen de carga  $V_s$ , se observa lo siguiente:

- Si el flujo es pequeño (e. g. Curva 1) toda la cantidad cargada de soluto es retenida.
  - Cantidad retenida Cantidad no retenida = 0
- Si el flujo aumenta (p.ej. Curva 2) una pequeña parte del soluto cargado empieza a fugarse y el % de recuperación disminuye.
  - Cantidad retenida Cantidad no retenida
- A flujos mayores la proporción de soluto no retenido aumenta (p.ej. curva 3)
  - Cantidad retenida Cantidad no retenida

TESIS CON  
 FALLA DE ORIGEN

### 3.2.2.3 Efecto del Volumen de Carga

El efecto del volumen de carga se estudió en dos cartuchos con diferente número de usos previos, uno con 127 usos y el otro con 14 usos. En todos los ensayos se cargaron 73 ng de Isoproturón disueltos en el volumen estudiado, el cual se hizo variar entre 1 y 250 mL; por lo tanto, la concentración del analito en la solución de carga varió entre 73 ng/mL y 0.292 ng/mL. De acuerdo con los resultados anteriores (Figs. 15 y 17), la cantidad cargada se encuentra en la región óptima de trabajo del cartucho más nuevo, es decir, muy por abajo del límite de saturación; en cambio para el cartucho más usado, esta cantidad es cercana al límite de saturación. Para ambos cartuchos se emplearon velocidades de flujo de 1 mL/min a bajos volúmenes de carga y de 4 mL/min para volúmenes de carga de 100 mL o más. Esto fue con el objeto de reducir el tiempo requerido para la carga de altos volúmenes.

Los resultados de esta prueba se muestran en la Figura 21. Para ambos cartuchos la recuperación disminuye primero lentamente, luego más rápido y finalmente tiende a estabilizarse a medida que el volumen de carga aumenta. La principal diferencia en el comportamiento de los cartuchos se encuentra a los altos volúmenes de carga. Para el cartucho más nuevo la recuperación se estabiliza a partir de 100 mL de carga en un valor cercano a 75%, mientras que en el cartucho más usado la pérdida de soluto sigue aumentando lentamente entre 100 y 250 mL de carga, por lo que para este último volumen la recuperación ha descendido hasta aproximadamente 55%.

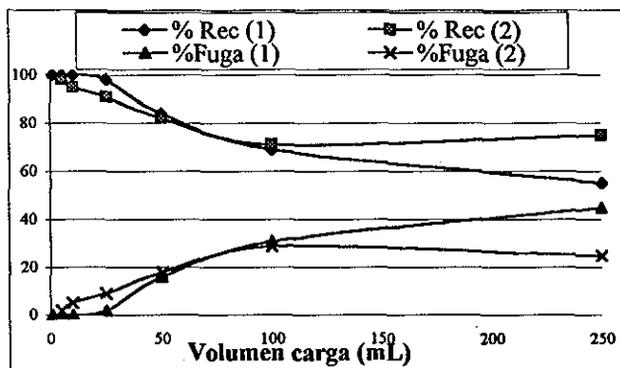


Fig. 21. Efecto del volumen de carga. Cantidad de isoproturón cargada, 73 ng. (1) cartucho con 127 usos, (2) cartucho con 14 usos.

La explicación del comportamiento observado es muy compleja debido a que al aumentar el volumen de carga disminuye paralelamente la concentración del analito en la solución cargada. Esto da origen a varios fenómenos que se contraponen.

Para una mayor claridad, se discutirá primero el proceso que ocurre en el sistema cuando se varía el volumen de carga a concentración constante. En dicho caso, al aumentar el volumen cargado, el frente de migración empieza a emerger a partir de un cierto volumen (volumen de fuga) hasta emerger totalmente (volumen de saturación). El perfil del frente emergido y los volúmenes correspondientes a sus puntos característicos no cambian aunque se siga aumentando el volumen de carga. En estas condiciones, desde el momento en que se alcanza el volumen de fuga, el % de recuperación del soluto empieza a disminuir y continúa disminuyendo gradualmente a medida que el volumen de carga aumenta (Fig. 22).

Por otra parte, si la concentración del soluto en la solución de carga disminuye, el coeficiente de distribución aumenta, como ya se ha mencionado anteriormente. Esto significa que, al cargar disoluciones con concentraciones progresivamente menores de soluto, los correspondientes frentes de migración avanzarán cada vez más lentamente en el cartucho y emergerán a volúmenes mayores.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

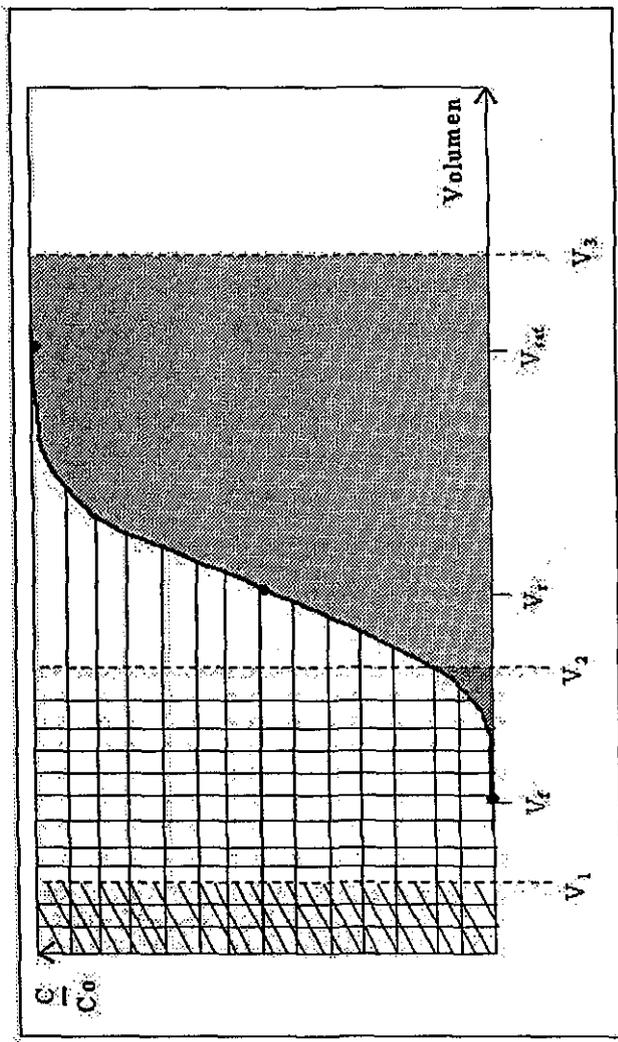


Figura 22. Variación de la recuperación en función del volumen de carga a concentración constante.

Para  $V_1$  de carga: Cantidad retenida  Cantidad no retenida = 0  
 Para  $V_2$  de carga: Cantidad retenida  Cantidad no retenida   
 Para  $V_3$  de carga: Cantidad retenida  Cantidad no retenida   
 El porcentaje de recuperación [(Cantidad retenida / cantidad no retenida) \* 100] disminuye continuamente al aumentar el volumen de carga.

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

Paralelamente, como en todo proceso cromatográfico, los frentes serán más extendidos entre mayor sea el volumen al que emergen. Como resultado de este ensanchamiento, el aumento en el volumen de fuga al disminuir la concentración es menor que el aumento en el volumen del punto estequiométrico (o volumen de retención), el cual a su vez es menor que el aumento en el volumen de saturación (23).

Este conjunto de fenómenos conducen a que la variación del porcentaje de recuperación (o porcentaje de fuga) con el volumen de carga sea mucho más suave que si se trabajara a concentración constante. De hecho, el desplazamiento de los frentes y la evolución de sus perfiles con la concentración conducen a la existencia de zonas de estabilidad en donde el % de recuperación prácticamente no cambia al variar el volumen de carga (como se observa en la curva del cartucho más nuevo en la Fig. 15) e incluso cabría la posibilidad de existencia de zonas con pendiente ligeramente positiva (ligero aumento del % de recuperación al aumentar el volumen de carga).

En el caso del cartucho con más usos, el empaque se ha compactado (efecto positivo) y el número de sitios activos ha disminuido por degradación del anticuerpo (efecto negativo). Esto ocasiona que, a los bajos volúmenes de carga (tal que el volumen de carga  $\ll$  volumen de retención) haya menor probabilidad de fuga de algunas moléculas de analito, por la mejor compactación del empaque y que a mayores volúmenes de carga, la recuperación sea más baja por la menor retención del analito.

Para los experimentos posteriores se decidió trabajar con volúmenes de carga no mayores a 100 mL para limitar la fuga del analito y minimizar el tiempo de carga.

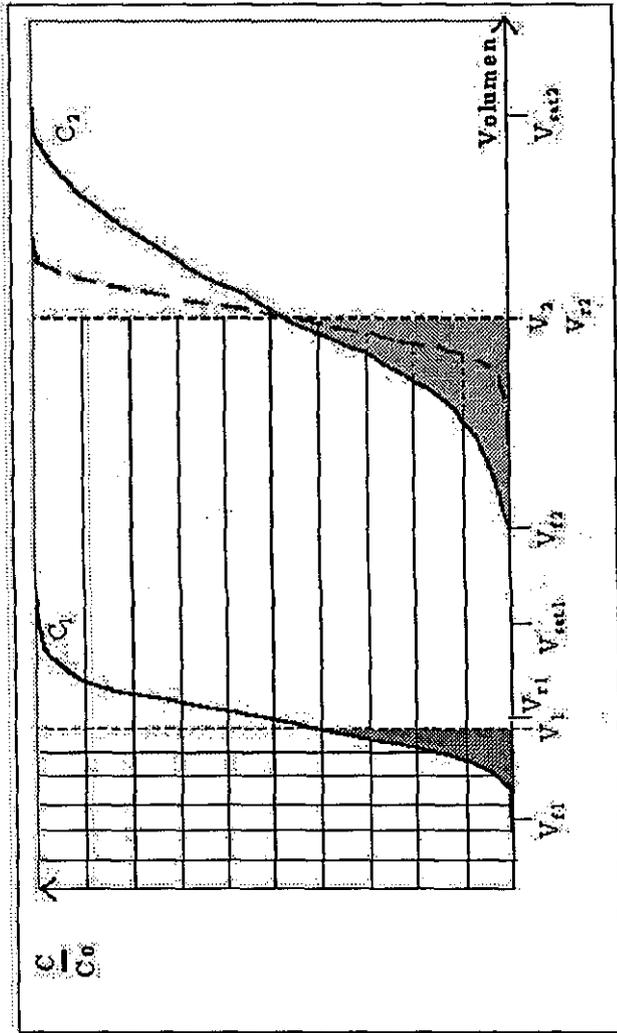


Figura 38. Variación de la recuperación en función del volumen de carga a concentración variable.  $C_1 > C_2$ .

Para  $V_1$  de carga ( $C_1$  de concentración): Cantidad retenida  Cantidad no retenida   
 Para  $V_2$  de carga ( $C_2$  de concentración): Cantidad retenida  Cantidad no retenida   
 El % de recuperación es similar en ambos casos aunque el volumen cargado en el caso 2 es aproximadamente 2.5 veces mayor al volumen cargado en el caso 1.  
 En línea punteada, frente hipotético no ensanchado para una concentración  $C_2$ . En este caso se observaría que para un volumen de carga  $V_2$  a concentración  $C_2$  el % de recuperación sería mayor que para un volumen de carga  $V_1$  a concentración  $C_1$ .

TESIS CON  
FALTA DE ORIGEN

### 3.2.2.4 Efecto del pH

También se hicieron experimentos variando el pH en la solución de carga en el intervalo de 3 a 7.5. Se cargaron 100 mL de una solución de isoproturón a concentración de 0.18 ng/mL (18 ng cargados), utilizando una velocidad de flujo de 4 mL/min. Se empleó un cartucho de Inmunoadsorción con 26 usos previos. La Figura 24 muestra los resultados obtenidos.

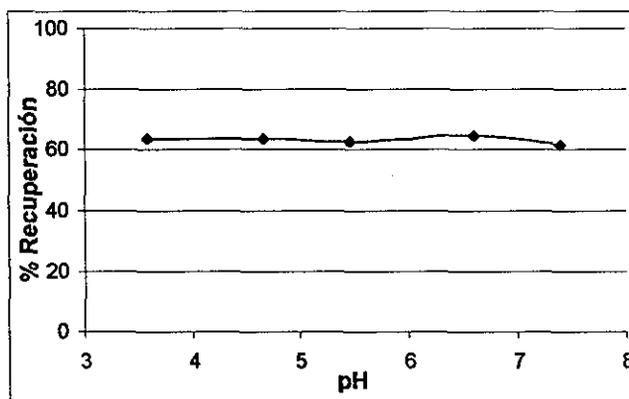


Figura 24. Efecto del pH en la solución de carga. Carga de 18 ng de Isoproturón en 100 mL de una mezcla de ácido acético, ácido fosfórico y ácido fórmico  $2 \times 10^{-3}$  M cada uno, ajustada al pH deseado con sosa. Flujo de 4 mL/min.

Como se observa, no se detectó ningún efecto del pH sobre la recuperación del Isoproturón. Por una parte, esto parece lógico ya que el analito parece estar en su forma molecular en el intervalo de pH estudiado (es decir, no se protonan ni los grupos aminos ni el grupo carbonilo). Sin embargo, considerando que el medio natural para una proteína (el anticuerpo) es un medio salino de fuerza iónica relativamente alta y de pH cercano a 7, se esperaba una disminución en la recuperación hacia los medios ácidos, si es que algún porcentaje del anticuerpo se desnaturizaba a consecuencia del cambio de pH, cosa que no se observó pues, aparentemente, el anticuerpo inmovilizado es capaz de seguir formando un complejo con el antígeno en soluciones medianamente ácidas.

Por otra parte, la recuperación en estos experimentos fue más baja de lo esperado, a pesar de que se trabajó con soluciones de baja concentración de analito y cantidades cargadas pequeñas. Esto se atribuye a que, en lugar de PBS 0.02 M en la solución de carga, se utilizó una mezcla de 3 ácidos a concentración  $2 \times 10^{-3}$  M cada uno, ajustada con sosa al pH deseado. La concentración total de buffer y sales en esta mezcla fue notablemente inferior a la utilizada en experimentos previos.

Aunque no se observó efecto del pH, se decidió establecer como condición óptima en la solución de carga un pH cercano a la neutralidad para favorecer al máximo la estabilidad del anticuerpo.

### 3.2.2.5 Efecto de la Concentración del Buffer

Considerando los resultados de la sección anterior, se decidió estudiar el efecto de la concentración del buffer sobre la recuperación del analito. Se empleó un cartucho con 31 usos previos, el cual se cargó con 100 mL de una solución de isotruturón, 0.18 ng/mL, en PBS a diferentes concentraciones (pH = 7.4).

Dado que el buffer salino PBS tiene fosfatos, KCl y NaCl en las proporciones 1 : 0.135 : 6.85, una variación de la concentración de PBS entre  $1 \times 10^{-4}$  M y  $2 \times 10^{-2}$  M implica una variación de la fuerza iónica de la disolución entre  $9.2 \times 10^{-4}$  M y  $1.9 \times 10^{-1}$  M, aproximadamente. La Figura 25 muestra los resultados obtenidos.

Se observa que a concentraciones del buffer menores a  $1 \times 10^{-3}$  M, o sea fuerzas iónicas menores a  $1 \times 10^{-2}$  M, la recuperación del analito disminuye.

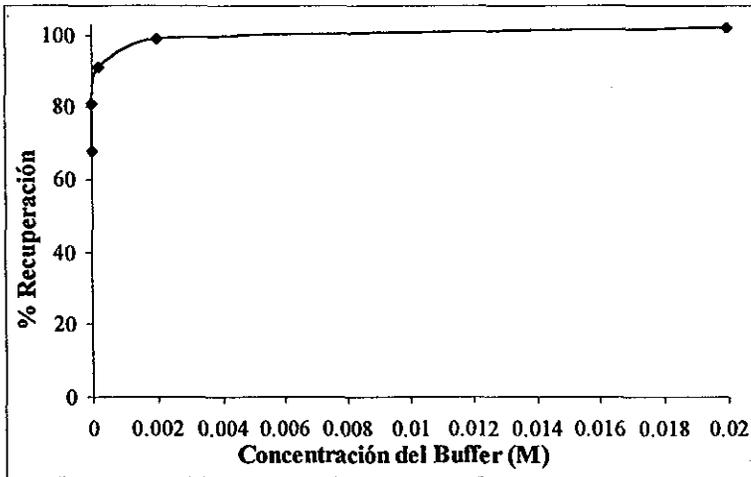


Figura 25. Efecto de la concentración del buffer en la solución de carga. Carga de 18 ng de isoproturón en 100 mL de PBS (pH = 7.4) a diferentes concentraciones. Flujo 5 mL/min.

Probablemente, el parámetro que influye en el efecto observado es la fuerza iónica. En los medios biológicos, las proteínas se encuentran sumergidas en soluciones de alta concentración salina (del orden de 0.1 M), por lo que es de esperarse que su funcionamiento sea óptimo en condiciones similares a las de su medio natural.

### 3.2.2.6 Condiciones óptimas para la preconcentración

De acuerdo con los resultados de las secciones anteriores, las condiciones óptimas dependen en gran medida de la muestra a estudiar, particularmente de la concentración del analito en ella y del grado de preconcentración que se requiera para el análisis cromatográfico posterior.

Cuando la muestra es relativamente concentrada y la inmunoeextracción se realiza principalmente con el fin de eliminar interferentes, se recomienda cargar volúmenes pequeños tales que la cantidad cargada de herbicida no sobrepase los 100 ng y utilizando una velocidad de flujo no mayor a 1 mL/min.

Si la muestra contiene concentraciones muy bajas del analito (del orden de la ppb) es posible cargar volúmenes mayores a flujos más altos. Se recomienda no sobrepasar los 100 mL, preferentemente 50 mL, con velocidades de carga no mayores a 5 mL/min.

En todos los casos se deberá adicionar PBS ( $1 \times 10^{-3}$  a  $2 \times 10^{-2}$  M) a la muestra para fijar el pH alrededor de 7 y la fuerza iónica entre  $1 \times 10^{-2}$  y  $2 \times 10^{-1}$  M.

### 3.2.3 Capacidad el cartucho

En relación con la capacidad del cartucho se tiene que mencionar que este parámetro está limitado por la cantidad de inmunoabsorbente que contiene, el cual varía ligeramente de un cartucho a otro. El volumen aproximado del lecho estacionario en los cartuchos es de 0.8 mL.

Para determinar la capacidad del cartucho se utilizaron 4 cartuchos nuevos. Se cargó una solución relativamente concentrada de isotroturón, de acuerdo con la capacidad teórica reportada por el fabricante (500 ng de Isoproturón). Esto es, se cargaron 500 ng de Isoproturón en 1 mL de solución, realizando el experimento en las condiciones óptimas encontradas para la preconcentración y elución.

Para este lote de cartuchos, se determinó una capacidad de  $213 \text{ ng} \pm 28$  ( $n = 4$ ,  $1 - \alpha = 0.95$ ).

El resto del isotroturón (la diferencia con 500 ng) se encontró en la solución de carga percolada. Esta cantidad corresponde al Isoproturón no retenido después de la saturación de los sitios activos.

### **3.2.4 Método Preliminar para la EFS**

Con base en todas las variables estudiadas tanto en la elución como en la preconcentración, finalmente se pudieron establecer las condiciones óptimas para la etapa de extracción en fase sólida del Isoproturón. En la Figura 26 se presenta el esquema de extracción propuesto y las condiciones para los pasos de:

Adsorción

Lavado

Elución

Regeneración

Esta propuesta presupone una muestra a muy baja concentración del analito, la cual se desea preconcentrar y purificar para su posterior análisis.

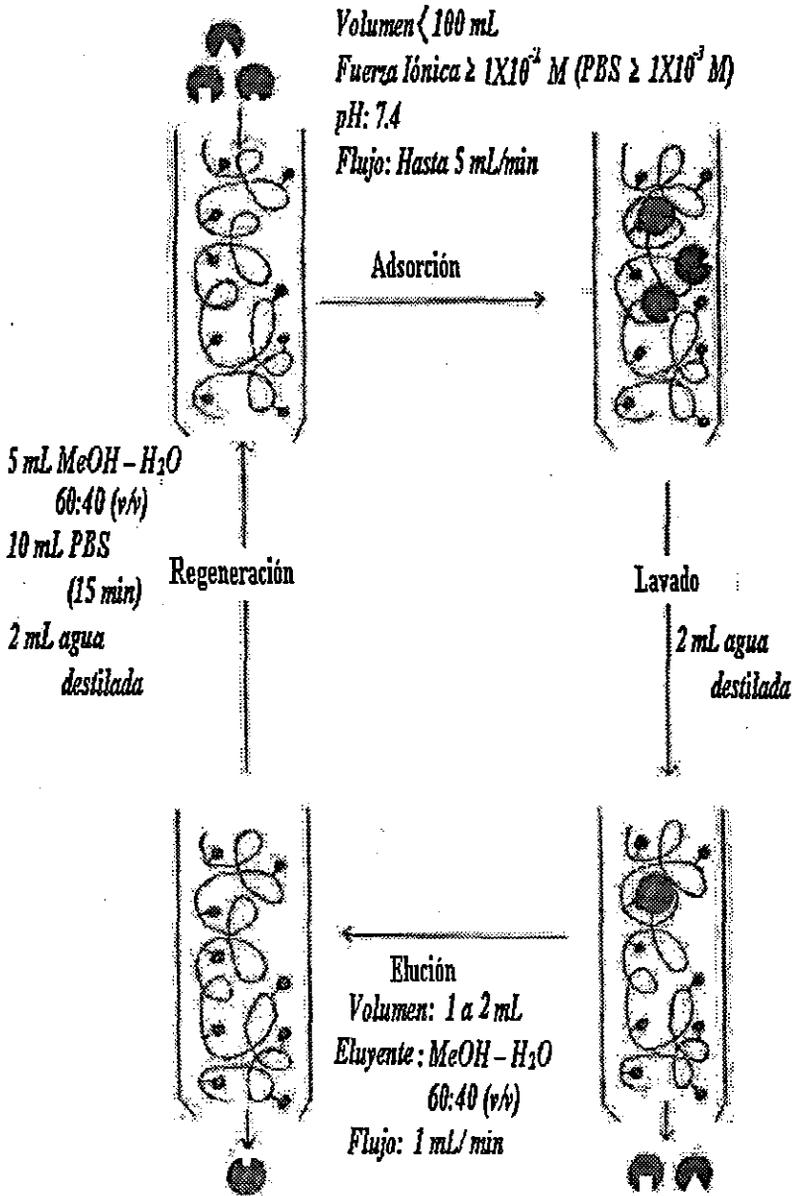


Figura 20. Esquema de trabajo preliminar para la etapa de extracción en fase sólida.

### 3.2.5 Reactividad Cruzada

#### 3.2.5.1 Adsorción de las fenilureas en cargas independientes

Una vez establecidas las condiciones óptimas para la inmunoextracción de Isoproturón, se hizo un estudio del comportamiento del cartucho frente al resto de los analitos del grupo de herbicidas estudiados.

La Figura 27 presenta los resultados obtenidos al cargar cada de uno de los analitos en forma independiente (no en mezcla)

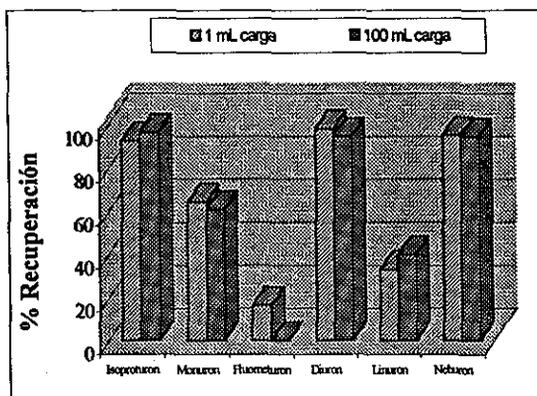


Figura 27. Porcentaje de recuperación de los analitos en cargas independientes. Volumen de carga, 1 y 100 mL. Cantidad de analito cargada, 75 ng. Fuerza iónica  $\sim 1 \times 10^{-2} \text{ M}$ , con PBS  $1 \times 10^{-3} \text{ M}$  (pH 7.4)

En esta gráfica observamos que el inmunoadsorbente interacciona en buena medida, además de con el isoproturón, con el diurón, y el neburón, en menor grado con monurón, linurón y muy poco con el fluometurón, cuando se cargan por separado, es decir un solo analito a la vez.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

### 3.2.5.2 Adsorción de Isoproturón en presencia de analitos del mismo grupo funcional

Con base en los resultados obtenidos en el inciso anterior (*i*), se estudió el efecto de la presencia de distintas cantidades de un soluto no retenido (Fluometurón) y uno medianamente retenido (Monurón) en la recuperación de una cantidad fija de Isoproturón. El comportamiento se ilustra en la Figura 28.

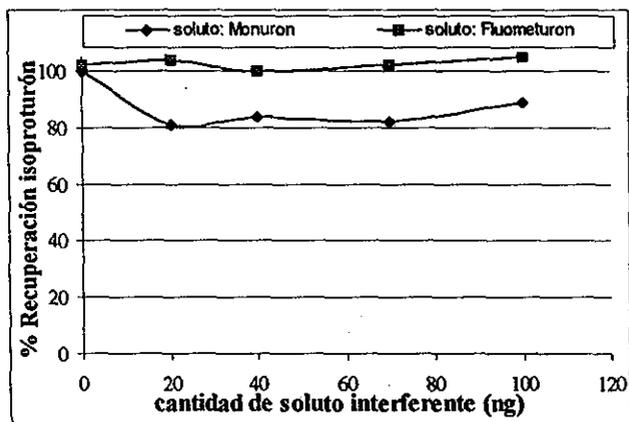


Figura 28. Efecto de la presencia del fluometurón y el monurón en la recuperación del Isoproturón. Volumen de carga, 100 mL; cantidad de isoproturón cargada 18 ng; fuerza iónica  $1 \times 10^{-2}$  M, con PBS  $1 \times 10^{-3}$  M (pH 7.4); velocidad de carga, 5 mL/min.

Se puede observar que la recuperación de Isoproturón no se ve afectada por la presencia del soluto no retenido (Fluometurón). Por otra parte, cuando existe un soluto que se retiene además del isoproturón, en este caso monurón, sí disminuye ligeramente la recuperación del primero, debido a que entran los dos solutos a competir por los sitios activos del inmuoadsorbente. Sin embargo, resulta extraño observar que no hay una dependencia con la cantidad creciente del soluto interferente, es decir, que la recuperación de Isoproturón es la misma a distintas concentraciones del analito “secundario” en la solución de carga.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la Tabla VIII se muestra la recuperación del monurón en estos ensayos. Como puede observarse, la recuperación del monurón se afecta en mayor grado por la presencia de isoproturón que el inverso (efecto de la presencia de monurón sobre la recuperación de Isoproturón). El fenómeno de competencia ocasiona que sólo se retengan al máximo 9 ng de monurón, lo que es muy inferior a la cantidad retenida cuando este soluto se cargó en forma independiente (Fig. 27). En este último caso, para 75 ng de monurón cargados en 100 mL, se recuperó el 55% o sea aproximadamente 41 ng. La baja cantidad de monurón que se retiene en la carga simultánea de dos analitos (Isoproturón y monurón) explica, hasta cierto punto, el hecho de que la recuperación del Isoproturón no cambie al aumentar la concentración de monurón en la solución de carga.

Tabla VIII. Recuperación de Monurón en presencia de Isoproturón.

Cantidad cargada de monurón (ng)	% Recuperación	Cantidad recuperada (ng)
5	*	*
20	*	*
40	18	7
70	10	7
100	9	9

\*No detectado en el eluato

Para poder analizar un poco mejor los efectos de competencia se hicieron experimentos complementarios realizando cargas de mezclas diversas de fenilureas.

En un primer ensayo se cargaron las seis fenilureas simultáneamente en 1 mL de solución conteniendo 25 ng de cada herbicida. Los resultados de cantidad recuperada y porcentaje de recuperación se presentan en la Tabla 9. En un segundo ensayo se eliminaron el isoproturón y el monurón, cargando las cuatro fenilureas restantes en diferentes volúmenes, pero manteniendo constante la cantidad de cada analito en la solución de carga. Los resultados de estos experimentos se presentan en la Tabla 10.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tabla IX. Recuperación de las seis fenilureas cargadas simultáneamente.

	% Recuperación	Cantidad recuperada (ng)
Monurón	29	7
Fluometurón	0	0
Isoproturón	64	16
Diurón	75	19
Linurón	35	9
Neburón	34	8

Tabla X. Efecto del volumen de carga sobre la recuperación de Fluometurón, Diurón, Linurón y Neburón cargados simultáneamente. Carga de 25 ng de cada compuesto.

Volumen de carga (mL)	Fluometurón		Diurón		Linurón		Neburón	
	%	ng	%	ng	%	ng	%	ng
1	15	4	67	17	41	10	31	8
25	13	3	60	15	0	0	0	0
75	0	0	40	10	0	0	0	0

Conjuntando las observaciones y resultados de los diversos ensayos, se llegó a las siguientes conclusiones:

1. El linurón y el neburón se retienen fuertemente (al menos hasta 75 ng de analito) cuando se cargan en forma independiente ya sea en un volumen de solución acuosa (con PBS) pequeño o en un volumen relativamente grande. Sin embargo, cuando se cargan en mezcla con otras fenilureas, su retención disminuye marcadamente para volúmenes de carga muy pequeños (1 mL) y se vuelve nula para volúmenes de carga mayores. De aquí se deduce que estos compuestos en forma independiente son retenidos probablemente por efectos hidrofóbicos, ya sea por adsorción en el soporte o por adsorción no específica sobre la molécula del anticuerpo inmovilizado. Cuando se encuentran en presencia de otros compuestos de hidrofobicidad comparable (e. g. linurón en presencia de neburón y viceversa) y/o en presencia de compuestos que sí se retienen por interacción específica con el anticuerpo, la retención del linurón y del

neburón se debilita y acaban siendo eluidos del cartucho por la propia solución de carga.

2. El fluometurón tal vez es reconocido por el sitio activo de algunas moléculas de anticuerpo, pero la interacción es tan débil que el compuesto es eluido al aumentar el volumen de carga. En presencia de isotroturón, la retención del fluometurón es nula, cualquiera que sea el volumen de carga. Esto permite pensar que los sitios activos con los que interacciona el fluometurón son mucho más afines al Isotropurón, por lo que este último soluto desplaza al primero completamente. Se puede notar que no sucede lo mismo en presencia de diurón; es decir, un poco de fluometurón alcanza a ser retenido (a bajos volúmenes de carga) aunque esté presente el diurón. La explicación de lo anterior sólo puede darse considerando que los sitios activos en el inmunoabsorbente no son homogéneos. Los sitios con los que interacciona preferentemente el diurón no son los mismos que aquellos con que interacciona preferentemente el Isotropurón.
3. El monurón es un soluto medianamente retenido cuando se carga en forma independiente. Dado que este compuesto es el menos hidrofóbico de la familia estudiada y puesto que no es eluido al aumentar el volumen de carga, se deduce que su retención es debida a interacciones específicas con el anticuerpo. De acuerdo con los resultados obtenidos, se concluye que el monurón compite con el Isotropurón por el mismo tipo de sitios activos; sin embargo, las interacciones de este último son más fuertes por lo que en su presencia, la retención del monurón disminuye significativamente aunque no se vuelve nula, es decir, el monurón interacciona con el anticuerpo más fuertemente que el fluometurón pero más débilmente que el isotroturón.
4. El diurón y el isotroturón son los solutos que interaccionan en mayor grado con el inmunoabsorbente. A volúmenes de carga muy pequeños, al procesar la mezcla de seis fenilureas, se observó que el diurón era ligeramente más retenido que el isotroturón. Sin embargo, al aumentar el volumen de carga (mezcla de 4 fenilureas) para una misma cantidad cargada, la recuperación del diurón disminuye, por lo que se puede establecer que parte de la retención a bajos volúmenes de carga era debida a interacciones hidrofóbicas. En cambio el isotroturón es sólo retenido por interacciones específicas. Se sospecha que el diurón y el isotroturón interaccionan preferentemente con sitios

activos de diferente tipo en el inmunoabsorbente, aunque no se descarta cierto grado de competencia entre ellos.

### 3.2.5.3 Adsorción de isoproturón en presencia de analitos de diferentes grupos funcionales

Se utilizaron dos conocidos contaminantes no feniluréicos, metilparatión y metiocarb para ver como influía su presencia en la recuperación de Isoproturón. En la Figura 29 se compara la recuperación del Isoproturón cargado sólo y en mezcla con los pesticidas mencionados. Asimismo, se muestra la recuperación de estos últimos determinada en los eluatos obtenidos.

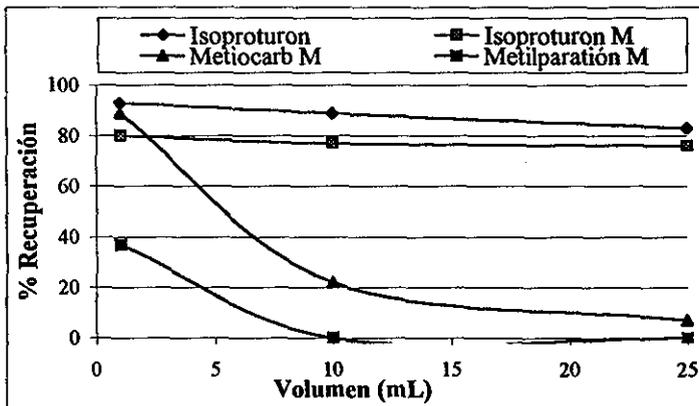


Figura 29. Efecto de la presencia de Metiocarb y Metilparatión sobre la recuperación de Isoproturón a volúmenes de carga variables. Carga de 50 ng de Isoproturón sólo y en mezcla (M) con dos pesticidas de familias diferentes (50 ng cada uno). Análisis por HPLC en fase reversa; fase móvil  $\text{CH}_3\text{CN}:\text{H}_2\text{O}$  (55:45 (v/v), detección UV a 230 nm.

Para el primer punto de Metilparatión, la diferencia con el 100 % de recuperación (64 % faltante) se obtuvo en el percolado de la solución de carga (1 mL) y en el lavado poscarga (2 mL agua). En el resto de los experimentos no se analizaron los percolados debido a la dilución.

## **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

En la Figura 29 se ve que del metiocarb se recupera prácticamente el total de la cantidad cargada a un volumen de carga pequeño; sin embargo, al aumentar el volumen de carga su recuperación disminuye drásticamente a 20 % con un volumen de carga de 10 mL, lo que sugiere adsorción no específica en el inmunoabsorbente. Al aumentar el volumen de carga, el disolvente mismo sirve para arrastrar al compuesto de los sitios a los cuales se adsorbió inespecíficamente.

En cuanto al metil-paratión se observa que no se recupera en el eluato en cantidad importante y se recupera sin embargo en el percolado y también en el lavado postcarga. Esto quiere decir que la pequeña cantidad que se queda del compuesto en el inmunoabsorbente es debido a interacciones no específicas que se eliminan también al aumentar el volumen de carga o bien por lavados adecuados.

Finalmente, en lo que se refiere al Isoproturón, se observa que su recuperación se ve poco afectada (< 10%) por la presencia de analitos de otras familias, aún cuando estos últimos alcancen un cierto grado de retención por interacciones no específicas con el soporte. Aunque no se descarta que una parte del isoproturón pudiera ser retenida por interacciones no específicas, el poco efecto que tienen el volumen de carga y la presencia de otros solutos (que compiten por los sitios de adsorción no específica) indica que el porcentaje de isoproturón retenido por este tipo de interacciones es mínimo.

Una conclusión importante que puede deducirse de éste y de los estudios precedentes sobre reactividad cruzada, es la amplia recomendación de cargar volúmenes de muestra de por lo menos 25 mL cuando se trabaja con inmunoabsorbentes. En efecto, los resultados obtenidos indican que de esta manera se logra eliminar en buena medida a los solutos que se retienen por interacciones no específicas. Así, el volumen de carga resulta ser un parámetro que influye sobre la selectividad de la extracción y no sólo sobre la sensibilidad final del método analítico.

### **3.3 ESTABLECIMIENTO Y EVALUACIÓN ESTADÍSTICA DE UN MÉTODO ANALÍTICO PARA LA DETERMINACIÓN DE TRAZAS DE ISOPROTURÓN Y DIURÓN EN MUESTRAS DE AGUA.**

#### **3.3.1 Establecimiento del método**

Inicialmente se había planeado montar un método para la determinación simultánea de los herbicidas isoproturón, fluometurón y diurón (estos dos últimos utilizados en México) en muestras de agua. Sin embargo, dados que se demostró que el fluometurón no se retiene específicamente, se decidió estudiar el método únicamente para la determinación del isoproturón y el diurón.

Con el objeto de lograr un grado de preconcentración adecuado para determinar concentraciones pequeñas (nivel traza – ppb-) de los analitos en las muestras acuosas y considerando los resultados del estudio previo de retención del Isoproturón, se decidió fijar el volumen de carga en 50 mL.

Las etapas operacionales del método analítico fueron las siguientes:

**ETAPA 1.** Filtración de la muestra (para eliminar sustancias suspendidas posiblemente contenidas en las muestras reales)

**ETAPA 2.** Extracción en fase sólida. (De acuerdo con los resultados obtenidos en la sección 3.2 Caracterización del Inmunoabsorbente)

Acondicionamiento del cartucho con PBS.

Adsorción de la muestra en el cartucho.

Lavado (para eliminar compuestos interferentes)

Elución y obtención de los analitos de interés

### ETAPA 3. Análisis cromatográfico de los eluatos obtenidos en la etapa 2. (De acuerdo con los resultados obtenidos en la Sección 3.1 Separación Cromatográfica).

Las muestras sintéticas fueron preparadas en un frasco de vidrio ámbar, añadiendo PBS hasta concentración 0.02 M y dopando con alicuotas apropiadas de las soluciones estándar de los analitos para obtener la concentración deseada. Posteriormente, cada muestra fue filtrada en una membrana de Nylon 66 con poro de 0.40  $\mu\text{m}$  utilizando vacío. Finalmente, las muestras fueron sometidas al proceso de EFS y analizadas.

Se realizó un ensayo preliminar para determinar si había pérdida de analitos durante la etapa de filtración. Para ello, una muestra dopada a concentraciones relativamente altas de los analitos fue percolada a través de la membrana de Nylon 66. El filtrado fue inyectado directamente al cromatógrafo y analizado. La recuperación de los dos analitos fue del 100% lo que comprueba que el Isoproturón y el Diurón no se adsorben sobre las paredes de los recipientes ni en la membrana de filtración.

Se presentan enseguida los resultados procesados para la evaluación estadística del método. Las determinaciones se hicieron por cuadruplicado, utilizando para cada réplica un cartucho diferente durante la EFS. Los cuatro cartuchos empleados fueron nuevos (del mismo lote), es decir, no habían sido utilizados previamente en experimentos de adsorción-desorción. La dispersión de los resultados obtenidos en los diferentes cartuchos se expresa como barras verticales en las gráficas presentadas posteriormente.

#### 3.3.2 Linealidad

El intervalo lineal del método se estimó con base en los valores de los coeficientes de regresión obtenidos al graficar la respuesta del detector contra la concentración de los analitos en la solución de carga. La gráfica obtenida se presenta en la Figura 30. Cabe mencionar que a concentraciones mayores a 3 ng/mL, las curvas se desvían de la linealidad, probablemente porque la cantidad cargada ( $> 150$  ng de cada soluto) sobrepasa la región de

adsorción lineal (ver discusión en la sección 3.2.2.1 Efecto de la concentración de isoproturón).

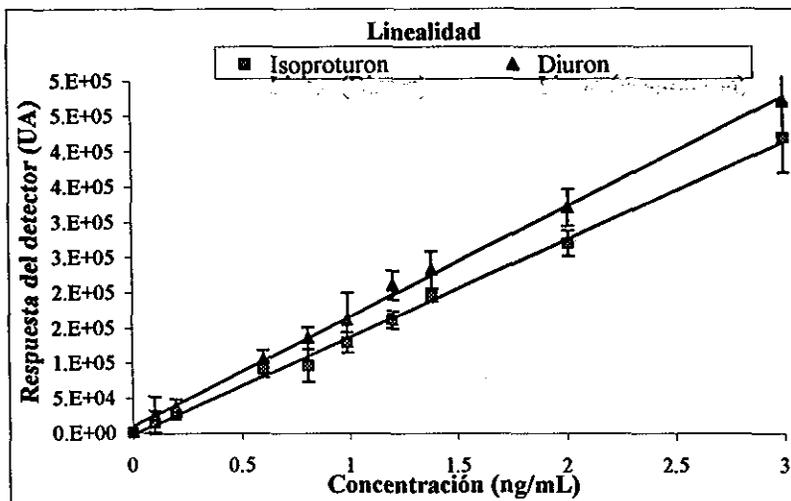


Figura 30. Gráfica para la evaluación del intervalo lineal del método. Preconcentración de 50 mL de agua dopada a diferentes concentraciones de los herbicidas Isoproturón y Diurón. Análisis por cromatografía de fase reversa C<sub>18</sub> con detección UV a 254 nm.

Tabla XI. Ecuaciones de regresión del estudio de linealidad del método.

Soluto	Ecuación de regresión $y = b x + a$	Coefficiente de determinación $r^2$
Isoproturón	$y = 138629x - 2103$	0.997
Diurón	$y = 156306x + 9515$	0.998

En la Tabla XI se puede ver que los coeficientes de regresión de los datos obtenidos son cercanos a la unidad, por lo que podemos constatar que el modelo de línea recta se ajusta para representar el comportamiento de los datos obtenidos.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los valores de  $a$  y  $b$  obtenidos en las ecuaciones de ajuste son estimadores de regresión de la  $A$  y  $B$  de la recta de regresión real:  $y = Bx + A$ .

Para evaluar la ordenada al origen de cada recta de regresión, es necesario realizar una prueba estadística para verificar que las rectas de cada soluto pasan por el origen del sistema de coordenadas, es decir, es necesario probar si estadísticamente el estimador  $a$  es igual a cero para un nivel de significancia  $\alpha = 0.05$

Sea la hipótesis nula  $H_0: A = 0$  y la hipótesis alterna  $H_1: A \neq 0$ . Se emplea el estadístico de prueba:

$$t = \left( \frac{a - A}{S_e} \right) \sqrt{\frac{nS_{xx}}{S_{xx} + (n\bar{x})^2}}$$

donde  $n$  es el número de puntos sobre la recta de regresión,  $\bar{x}$  es el valor promedio de los valores  $x_i$ , y

$$S_e = \sqrt{\frac{S_{xx}S_{yy} - (S_{xy})^2}{n(n-2)S_{xx}}}$$

siendo:

$$S_{xx} = n \sum_{i=1}^n x_i^2 - \left( \sum_{i=1}^n x_i \right)^2$$

$$S_{yy} = n \sum_{i=1}^n y_i^2 - \left( \sum_{i=1}^n y_i \right)^2$$

$$S_{xy} = n \sum_{i=1}^n x_i y_i - \left( \sum_{i=1}^n x_i \right) \left( \sum_{i=1}^n y_i \right)$$

Empleando un nivel de significancia  $\alpha$  dado, se rechaza la hipótesis nula si:

$t < -t_{\alpha/2}$  o  $t > t_{\alpha/2}$ , donde  $t_{\alpha/2}$  es el valor de la  $t$  de Student para un nivel de significancia  $\alpha$  con  $n-2$  grados de libertad.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en la verificación de la hipótesis nula para las fenilureas estudiadas, empleando un nivel de significancia  $\alpha = 0.05$ , se presentan en la Tabla 12.

Tabla XII. Verificación de la hipótesis nula para el estudio de linealidad.<sup>47</sup>

Soluto	$t_{\text{calculado}}$	n	$t_{\alpha/2, n-2}$ gl (tablas)	¿Aceptar $H_0$ ?
Isoproturón	-0.2576	11	2.31	Si
Diurón	0.8986	11	2.31	Si

Los límites del intervalo de confianza para el coeficiente  $\alpha$  de las rectas de regresión se estimaron mediante la expresión:

$$\alpha \pm t_{\alpha/2} \cdot S_e \cdot \sqrt{\frac{S_{xx} + (n\bar{x})^2}{n \cdot S_{xx}}}$$

Los intervalos de confianza para los coeficientes  $\alpha$  de las ecuaciones de regresión de las fenilureas estudiadas, empleando un nivel de confianza  $\alpha = 0.05$ , se presentan en la Tabla XIII.

Tabla XIII. Intervalos de confianza de los coeficientes  $\alpha$  de las rectas de regresión. Estudio de linealidad.

Soluto	Intervalo de confianza (Área, cuentas)
Isoproturón	$-17044 < \alpha < 12838$
Diurón	$-9860 < \alpha < 28\ 888$

Con este análisis se puede concluir que no existen errores sistemáticos en el método. El intervalo de linealidad para el método se establece por lo tanto de 0 ppb a 3 ppb para volúmenes de carga de 50 mL, y concentrando 3 ng/mL hasta 75 ng/mL finales, se logra un factor de concentración de 25. Aunque el intervalo lineal visto en función de concentraciones es muy pequeño, en realidad corresponde a un intervalo lineal en cantidad de soluto que va de 0 a 150 ng. Por otra parte, el orden de concentraciones que permite

determinar el método propuesto es congruente con las regulaciones establecidas para la calidad del agua en Estados Unidos.

Para el caso de agua potable, la EPA y la NPS (National Pesticide Survey) de E.E.U.U. han fijado concentraciones máximas permisibles del orden de algunas unidades de partes por billón para herbicidas feniluréticos. El límite de cuantificación del método oficial propuesto por estos organismos para la determinación de fenilureas (el cual está basado en una extracción líquido – líquido con diclorometano) es de 0.6 a 0.9 ng/mL, dependiendo del compuesto.<sup>48</sup>

Las normas europeas son mucho más estrictas ya que fijan una concentración máxima de 0.1 ng/mL por plaguicida individual y de 0.5 ng/mL para pesticidas totales en agua potable, independientemente del tipo y toxicidad de dichos pesticidas<sup>48</sup>. Es evidente que el método propuesto en este trabajo permite determinar estas concentraciones para el Diurón e Isoproturón pero prácticamente en el límite de sus capacidades.

### 3.3.3 Porcentaje de recuperación a diferentes concentraciones del analito en la solución de carga

Utilizando los datos de las curvas anteriores, se determinó el porcentaje de recuperación global de los analitos en el intervalo de concentraciones antes definido. Para este fin se evaluaron las pendientes obtenidas al graficar la cantidad recuperada de los analitos contra la cantidad cargada.

La gráfica obtenida se presenta en la Figura 31, y el análisis estadístico de los datos se muestra en la Tabla XIV.

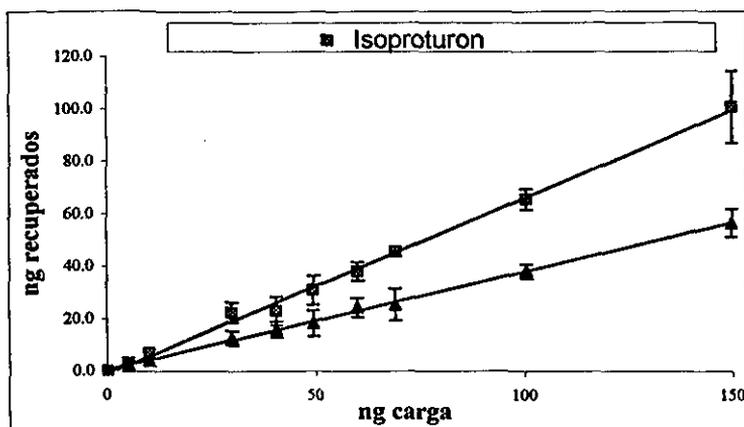


Figura 31. Gráfica para la evaluación del porcentaje de recuperación de los analitos a diferentes concentraciones.

Tabla XIV. Ecuaciones de regresión del estudio del porcentaje de recuperación de los analitos a diferentes concentraciones.

Soluto	Ecuación de regresión	Coefficiente de determinación $r^2$
Isoproturón	$y = 0.6686x - 0.9374$	0.997
Diurón	$y = 0.3734x + 0.5293$	0.999

En la gráfica podemos observar, en primer lugar, que el modelo de línea recta es útil para la representación del comportamiento de los datos obtenidos, ya que los coeficientes de regresión son cercanos a la unidad. Sin embargo, como ya se mencionó anteriormente, a valores mayores de cantidad cargada la pendiente cambia y tiende a disminuir, debido a que se saturan los sitios activos del inmuoadsorbente. La cantidad máxima retenida por el cartucho en el intervalo lineal definido fue de aproximadamente 100 ng de Isoproturón y además alrededor de 60 ng de Diurón.

De acuerdo con los valores de las pendientes obtenidas, la recuperación de los herbicidas en el intervalo de concentraciones acotado, utilizando el método establecido es de:

67 % para el Isoproturón.

37 % para el Diurón.

Estos resultados confirman lo que ya se había observado en una sección anterior (sección 3.2.5 Reactividad cruzada), la recuperación del Diurón a volúmenes de carga altos disminuye notablemente. Este efecto es además acentuado por la competencia ejercida por el Isoproturón. Inversamente, la recuperación del Isoproturón disminuye, con respecto a cuando se encuentra sólo en la muestra, debido a la competencia ejercida por el Diurón.

El hecho de que la recuperación de los analitos no sea del 100 % no impide la aplicación del método propuesto. Bastará con realizar una calibración previa (como en la Fig. 30, Respuesta vs Concentración) para obtener la concentración de los solutos con un grado de exactitud aceptable. Una vez comprobada la linealidad del método (en el intervalo establecido) es posible realizar la calibración con una o dos soluciones estándar. El (o los) estándar (es) y la muestra se someten al mismo proceso (filtración, EFS y análisis HPLC) y por comparación de las áreas de los picos se deduce la concentración de los analitos en la muestra problema. Debido a que la preparación de muestra es muy simple, el procesamiento del (o los) estándar (es) de calibración es rápido y no aumenta sustancialmente el tiempo de análisis.

### **3.3.4 Precisión (como repetibilidad), Exactitud, Límite de Detección y Límite de Cuantificación.**

La precisión se expresa matemáticamente como la desviación estándar,  $\sigma$ , estimada analíticamente por  $S$  o más comúnmente por el coeficiente de variación (CV) de una serie de muestras analizadas en las condiciones del método<sup>46</sup>.

En cuanto al límite de detección, éste se determinó a partir de las consideraciones de la USEPA (United States Environment Protection Agency), que establece que deben analizarse un mínimo de siete muestras mediante el método desarrollado<sup>49</sup>. El límite de detección del método se estima haciendo uso de la siguiente expresión:

$$LDM = t_{(n-1, 1-\alpha=0.99)} * Sc$$

Donde  $t_{(n-1, 1-\alpha=0.99)}$  es el valor de la t de Student apropiado para un nivel de confianza del 99%, con (n-1) grados de libertad y Sc es la desviación estándar expresada en unidades de concentración.

En este caso se analizaron 7 muestras a concentración de 0.8 ng/mL de cada soluto (40 ng en 50 mL) y se obtuvo la cantidad recuperada expresada también como concentración. De estos valores se obtuvieron la desviación estándar, el coeficiente de variación y el límite de detección correspondiente a cada analito. Los resultados se presentan en la Tabla XV.

Tabla XV. Parámetros estadísticos para calcular la precisión (s) y LDM ( n = 7)

	Concentración Cargada (ng/mL)	Concentración Determinada por el Método (ng/mL)	Desviación Estándar	Coficiente de Variación	LDM (ng/mL)
Isoproturón	0.80	0.82	0.0247	2.98	0.0917
Diurón	0.80	0.76	0.0315	4.11	0.1167

La exactitud de un método corresponde a la diferencia entre un valor obtenido por el método y el valor verdadero aceptado. La falta de exactitud es también conocida como error sistemático. Para evaluar la exactitud del método se adoptó como hipótesis nula aquella mediante la cual un método *no se encuentra sujeto a errores sistemáticos*, esto es, que la diferencia entre el valor determinado y el conocido puede atribuirse únicamente a errores aleatorios.

Para decidir si la diferencia entre la media muestral  $X_m$  y el valor verdadero  $\mu$ , es significativa, utilizamos la siguiente ecuación:

$$t = \left| (X_m - \mu) \sqrt{\frac{n}{s}} \right|$$

En esta ecuación:  $t$  = t Student calculada  
 $X_m$  = Media muestral  
 $\mu$  = Valor verdadero  
 $n$  = tamaño de la muestra  
 $s$  = desviación estándar

Utilizando los datos de la tabla anterior (Tabla 15) se obtienen los resultados reportados en la Tabla XVI.

Tabla 16. Parámetros estadísticos para determinar la exactitud ( $n = 7$ )

	Concentración Cargada ( $\mu$ )	Concentración Determinada por el Método ( $X_m$ )	Desviación Estándar (s)	t $\alpha = 0.05$ n-1 g.l.	t <sub>calculada</sub>
Isoproturón	0.80	0.82	0.0247	2.45	0.34
Diurón	0.80	0.76	0.0315	2.45	0.6

En esta tabla se observa que los valores calculados de t son menores que los valores de tablas, por lo tanto se acepta la hipótesis nula y se puede decir que (al nivel de confianza del 95 %) el método es exacto tanto para la determinación del Isoproturón como para la determinación de Diurón.

En lo que se refiere a la precisión del método, ésta es menor al 5 % (coeficiente de variación de la Tabla XV), lo que puede considerarse excelente dados los bajos niveles de concentración de los analitos.

Finalmente, los límites de detección del método (92 ppt para Isoproturón y 117 ppt para Diurón) permiten proponerlo para el análisis confiable de Isoproturón y Diurón en aguas superficiales y potables, de acuerdo a la legislación de Estados Unidos. En efecto, se

estima que para poder usar un método en análisis ambientales, los límites de detección de éste deben ser por lo menos cinco veces menores que las concentraciones máximas permisibles fijadas para el compuesto en cuestión<sup>48</sup>.

Por el contrario, el método no alcanza a cumplir con la condición anterior si se toman en cuenta las estrictas regulaciones europeas. En este caso, se podrían realizar modificaciones al método aumentando por ejemplo el volumen de carga a 100 mL para disminuir los límites de detección. Sin embargo, esta modificación implicaría volver a realizar el estudio estadístico del método.

Por otra parte, los límites de cuantificación de un método se pueden definir de diversas maneras dependiendo de la precisión y exactitud mínimas deseadas o requeridas en el análisis. Un criterio comúnmente usado es tomar como límite de cuantificación la concentración que corresponde a 10 veces la desviación estándar de la ordenada al origen de la curva de Area vs Concentración. Otra alternativa es multiplicar por 10 la desviación estándar obtenida en el análisis (mínimo 7 réplicas) de una muestra adicionada a concentraciones no mayores a 10 veces el límite de detección del método.

Los límites de cuantificación calculados para el método propuesto utilizando los dos criterios señalados se presentan en la Tabla XVII.

Tabla XVII. Límites de Cuantificación del Método.

Soluto	Límite de cuantificación (ng/mL)	
	Criterio 1*	Criterio 2**
Isoproturón	0.64	0.25
Diurón	0.66	0.32

\* 10 veces la desviación estándar de la ordenada al origen de la curva Area vs Concentración

\* 10 veces la desviación estándar de la muestra fortificada a 0.8 ng/mL

Los límites de cuantificación obtenidos de acuerdo con el criterio 2, que se considera más representativo del comportamiento del método a muy bajas concentraciones

son 0.3 ng/mL para el Diurón y 0.25 ng/mL para el Isoproturón. Estos límites son ligeramente menores que los reportados por la EPA y la NPS en el método oficial para la determinación de fenilureas en agua (Método 4 de la NPS).

Los resultados obtenidos en el análisis estadístico del método (precisión, exactitud, límite de detección y límite de cuantificación) muestran que con un método rápido y sencillo, basado en la EFS, es posible tener una calidad analítica comparable, si no es que superior, a la de los métodos "oficiales" basados en los largos y tediosos procedimientos de la extracción líquido-líquido.

### 3.4 ESTABILIDAD DE LOS ANALITOS EN AGUA PURA Y EN LOS CARTUCHOS.

Se preparó una mezcla de isoproturón y diurón en agua a una concentración de 25 ng/mL, se distribuyó la disolución en cinco contenedores diferentes y se almacenaron en refrigeración. También se cargaron cinco cartuchos nuevos, cada uno con 50 ng de cada analito en 50 mL de PBS y se almacenaron junto con las disoluciones. En días fijos se retiró de refrigeración una muestra de la disolución en agua y se cuantificaron los analitos comparándolos con un estándar de preparación reciente. Los resultados se muestran en la Figura 32.

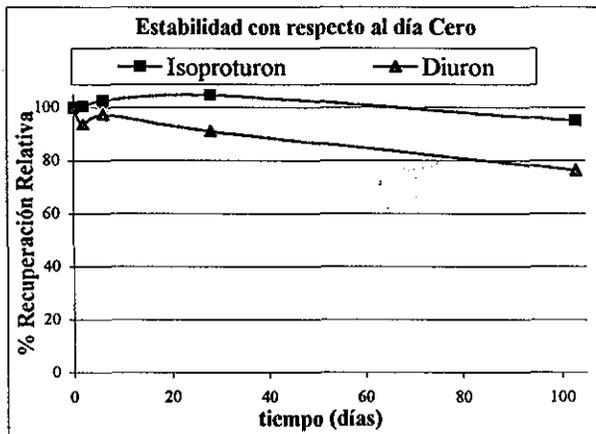


Figura 32. Estabilidad de los compuestos en agua pura. Concentración 25 ng/ mL.

Como puede observarse en la Fig. 32, tanto el diurón como el isoproturón son muy estables en agua pura (grado reactivo), si ésta se mantiene en refrigeración. Prácticamente se puede decir que los analitos no sufren modificación alguna durante 4 semanas en la disolución acuosa. Incluso 103 días después de preparada la disolución, el grado de degradación es muy leve, menos de 25% para el diurón y menos de 10% para el isoproturón.

Por otro lado, en los mismos días se retiró también un cartucho, se eluyó con 2 mL de eluyente (concentración teórica final 25 ng/mL) y se cuantificaron los analitos. Las muestras fueron comparadas con una mezcla de los analitos a concentración de 25 ng/mL recientemente preparada. Los resultados se presentan en la Figura 33.

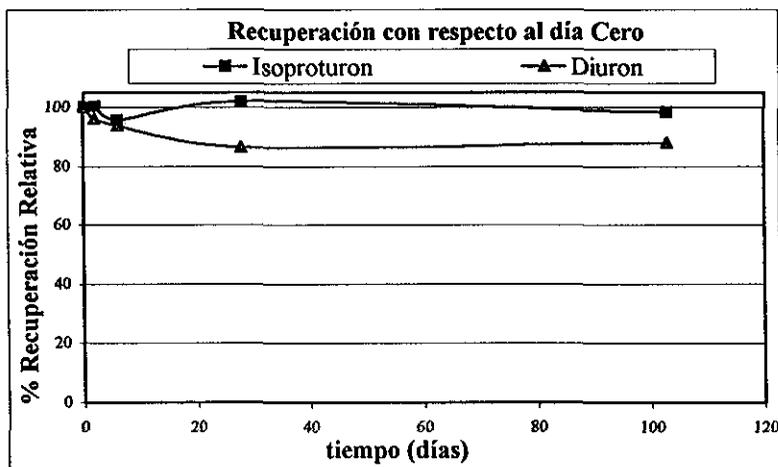


Figura 33. Estabilidad de los compuestos en los cartuchos. Carga de 50 ng de analito en 50 mL.

Estos resultados indican que la estabilidad de los analitos en el estado adsorbido es ligeramente superior a su estabilidad en agua. A los 103 días, el diurón se degradó menos del 20% y el isoproturón se mantuvo totalmente estable.

Así, es posible proponer a los cartuchos de inmunoextracción como una alternativa eficaz y conveniente para el transporte de muestras de agua en programas de monitoreo ambiental. En efecto, los cartuchos pueden ser llevados al sitio de muestreo y cargados con el agua a analizar "in situ". Dado su pequeño tamaño y ligereza, es posible transportar una gran cantidad de cartuchos y por lo tanto coleccionar una buena cantidad de muestras en sitios lejanos o de difícil acceso, para después llevarlos al laboratorio de análisis. Los resultados obtenidos en el estudio realizado demuestran que la integridad de los analitos (Isoproturón y Diurón) en los cartuchos se mantiene durante largos periodos de tiempo.

### **3.5 APLICACIÓN DEL MÉTODO A MUESTRAS REALES**

Una vez evaluado el método analítico desarrollado, se aplicó al análisis de los herbicidas (Isoproturón y Diurón) en muestras de agua potable, superficial y subterránea.

El agua potable utilizada fue obtenida en Ciudad Universitaria, el agua de río fue coleccionada a las faldas del Nevado de Toluca, en el Estado de México, y el agua subterránea fue coleccionada en una de las cuevas de las Grutas de Tolantongo, en el estado de Hidalgo.

Las primeras observaciones que se les hizo a estas muestras de agua fueron medidas fisicoquímicas como pH, conductividad, y apariencia física. Todas las muestras presentaban un aspecto cristalino, transparente y sin partículas suspendidas a la vista. Sin embargo, antes de realizar las mediciones con los electrodos se sometieron a una etapa de filtración. Los datos obtenidos se presentan en la Tabla XVIII.

Tabla XVIII. Medidas de pH y Conductividad de las muestras de agua utilizadas. Se presentan también las características del agua desionizada y del buffer de fosfatos utilizado en el método.

	pH	Conductividad
Agua deionizada	5.9	2 $\mu$ S
Agua potable	7.2	100 $\mu$ S
Agua de río	6.9	140 $\mu$ S
Agua subterránea	7.9	1 500 $\mu$ S
<i>Buffer fosfatos, Co = 0.02 M</i>	7.1	24 000 $\mu$ S

Se observa que las muestras de agua potable y de río presentan un pH cercano a la neutralidad. En cuanto a la muestra de agua subterránea tiene un pH ligeramente básico debido probablemente a la presencia de sales disueltas de carbonato y/o sulfatos existentes en estos niveles subterráneos.

La medida de conductividad nos da una idea del nivel de sales disueltas en forma de iones que contienen las muestras de agua en comparación con el agua desionizada y principalmente en comparación con el buffer de fosfatos que se utiliza en el método. Se puede observar que, en general, las muestras de agua tienen una cantidad pequeñísima de iones disueltos con respecto a la cantidad de iones que contiene el buffer de fosfatos.

Con base en los datos obtenidos se decidió manejar muestras de 45 mL de cada tipo de agua mezcladas con 5 mL de una solución concentrada de buffer de fosfatos (0.2 M), para obtener finalmente un volumen de muestra de 50 mL con una concentración de buffer de 0.02 y fijar además el pH alrededor de la neutralidad, condiciones requeridas para la aplicación del método.

En primera instancia se realizó el análisis de las muestras de agua con el fin de observar el comportamiento de las aguas al aplicarles el método desarrollado. Los cromatogramas obtenidos se muestran en la figura 34 a 37, en los incisos (a) correspondientes a los blancos.

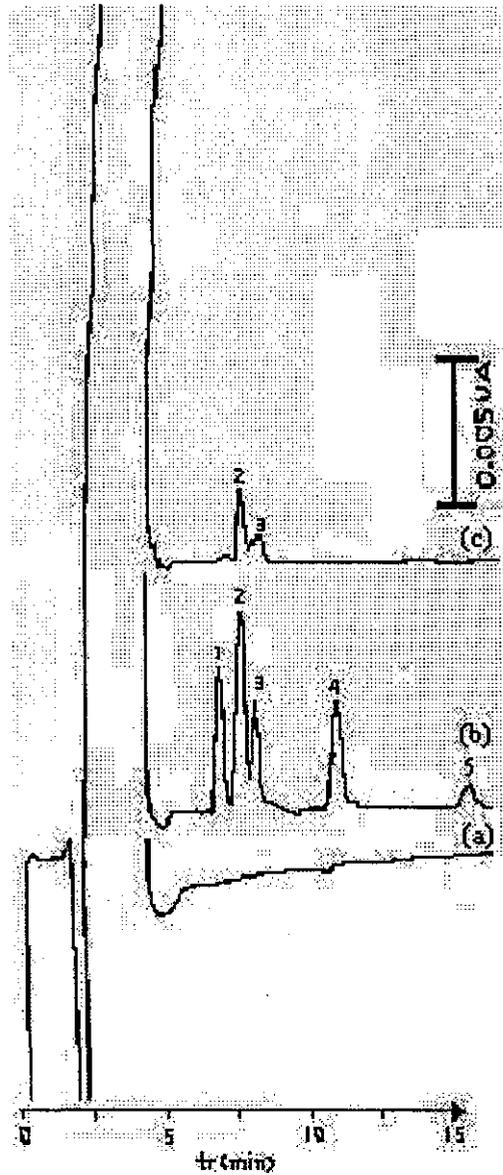


Figura 34. Cromatogramas correspondientes al análisis de la muestra de agua desionizada. (a) Muestra de agua blanco (b) solución estándar de una mezcla de fluometurón (1), isotproturón (2), diurón (3), metiocarb (4) y metilparatión (5) y (c) Muestra dopada con 40 ng de cada analito la cual se analizó según el método establecido.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

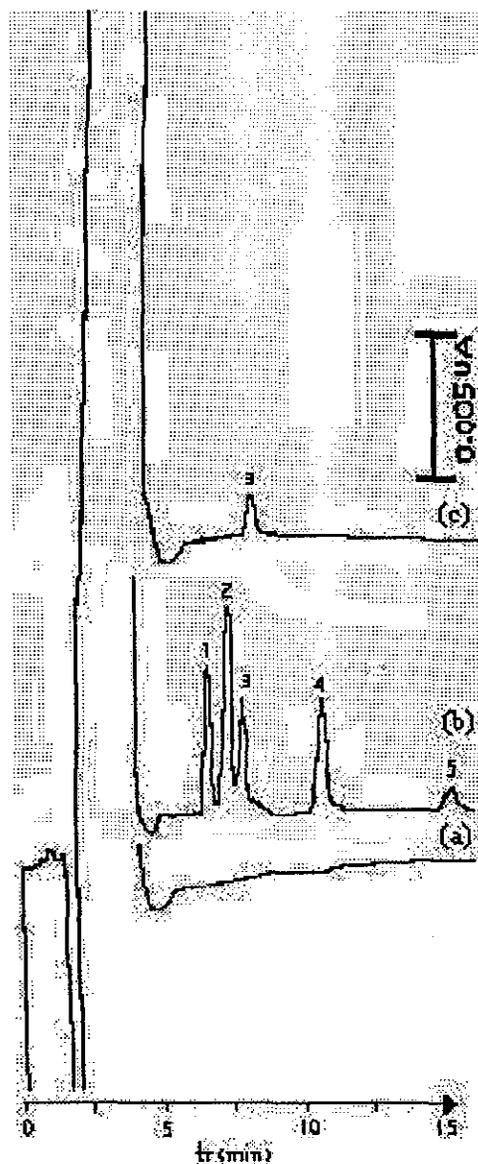


Figura 35. Cromatogramas correspondientes al análisis de la muestra de agua potable. (a) Muestra de agua blanco (b) solución estándar de una mezcla de fluometurón (1), isoproturón (2), diurón (3), metiocarb (4) y metilparatión (5) y (c) Muestra dopada con 40 ng de cada analito la cual se analizó según el método establecido.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

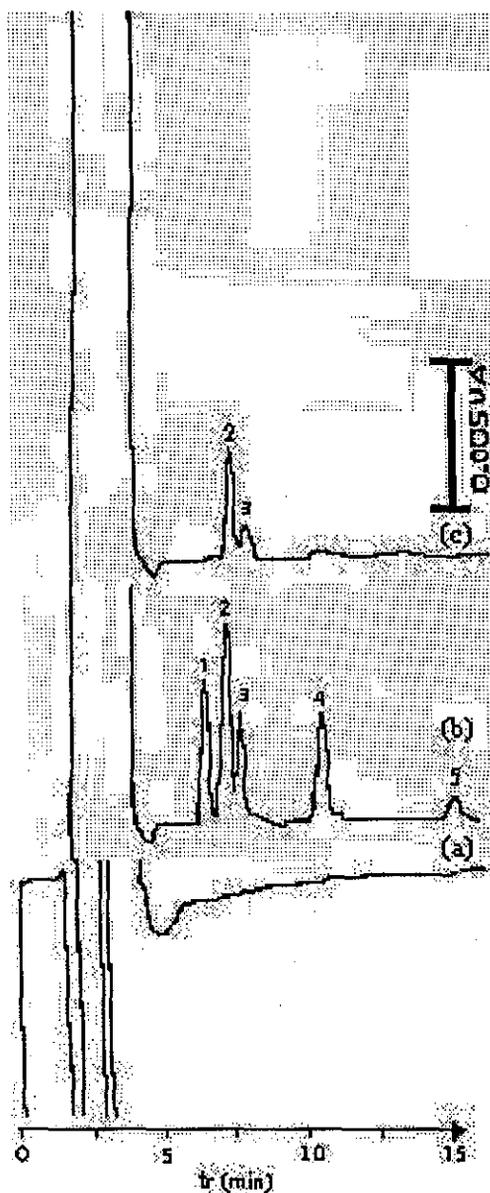


Figura 36. Cromatogramas correspondientes al análisis de la muestra de agua de río. (a) Muestra de agua blanco (b) solución estándar de una mezcla de fluometurón (1), isoproturón (2), diurón (3), metiocarb (4) y metilparatión (5) y (c) Muestra dopada con 40 ng de cada analito la cual se analizó según el método establecido.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

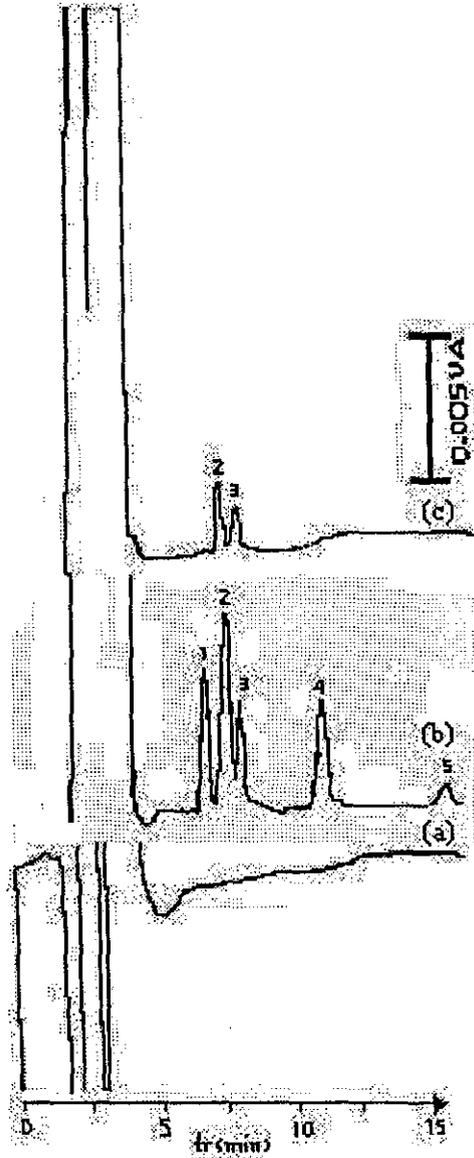


Figura 37. Cromatogramas correspondientes al análisis de la muestra de agua subterránea. (a) Muestra de agua blanco (b) solución estándar de una mezcla de fluometurón (1), isoproturón (2), diurón (3), metiocarb (4) y metilparatión (5) y (c) Muestra dopada con 40 ng de cada analito la cual se analizó según el método establecido.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## *RESULTADOS Y DISCUSIÓN*

Lo que se observa en estas figuras son cromatogramas “limpios” en el intervalo de 5 a 15 minutos. Las muestras de agua no contienen compuestos que pudieran haberse preconcentrado y que hubieran podido interferir con el análisis del Diurón y el Isoproturón. Este hecho confirma además la excelente selectividad y especificidad del inmunoabsorbente.

Al adicionar PBS a la muestra de agua subterránea para el ajuste de pH y concentración de sales se observó un precipitado ocasionado quizá por los fosfatos del buffer que reaccionaron con iones Calcio y Magnesio presentes en el agua subterránea. Sin embargo, esto no representó un problema para realizar la preconcentración debido a que se filtró la muestra antes de ser percolada al cartucho de inmunoabsorción. Las muestras de agua potable y de río no sufrieron cambios físicos aparentes. Tampoco los cartuchos utilizados para analizar las muestras de agua cambiaron de aspecto físico y pudieron utilizarse con efectividad en los análisis posteriores.

Otro de los experimentos realizados fue el estudio de la estabilidad de los compuestos de interés (diurón e isoproturón) en estas muestras. Para ello prepararon muestras de cada agua dopadas con los analitos a una concentración de 4 ng/mL y se midió la recuperación con respecto al tiempo (cuantificación por inyección directa de 100  $\mu$ L de muestra). Durante este estudio las muestras permanecieron a temperatura ambiente. Los resultados se presentan en la figura 38. Se consideró como tiempo cero cuando se preparaba la muestra, es decir, se dopó el agua y se analizó inmediatamente en el cromatógrafo.

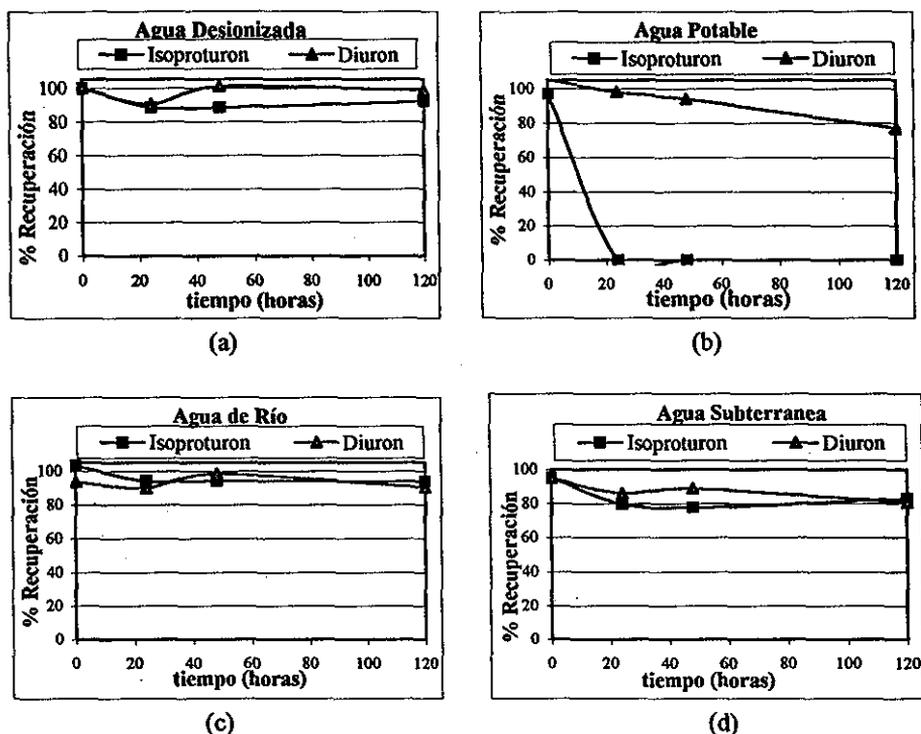


Figura 38. Evaluación de la estabilidad de los analitos con respecto al tiempo en las aguas naturales. (a) en agua desionizada (b) en agua potable (c) en agua de río (d) en agua subterránea. Concentración de los analitos: 4 ng/mL.

En la Figura 38 se observa que los compuestos son estables en el agua desionizada, el agua de río y el agua subterránea, en el intervalo de 0 a 120 horas. En cuanto al agua potable se observa que el diurón desaparece lentamente al paso del tiempo, pero el Isoproturón desaparece drásticamente en el intervalo de 0 a 20 horas.

Para verificar el comportamiento de los compuestos en el agua potable se realizó un nuevo estudio de estabilidad pero con intervalos menores de tiempo. Los resultados se presentan en la Tabla XIX.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tabla XIX. Estabilidad de los analitos en agua potable. Concentración de los analitos: 4 ng/mL.

tiempo (min)	% Recuperación Isoproturón	% Recuperación Diurón
0	77	93
15	43	90
27	*	94
37	*	91

\* Ya no se observó el pico correspondiente en el cromatograma

Se observa que, efectivamente el isotproturón no es estable en el agua potable ya que no se detecta en los cromatogramas alrededor de los 15 minutos después de haber dopado la muestra de agua. Esto podría ser debido a alguna reacción del cloro contenido en el agua potable con el isotproturón, posiblemente de oxidación. En cuanto al diurón se puede ver que es estable por más tiempo, como se observó en la Figura 38b.

Finalmente se evaluó la recuperación de los analitos en los cartuchos. Para ello se utilizaron muestras de 45 mL con 5 mL de PBS (volumen de carga = 50 mL) las cuales se doparon con 40 ng de cada analito (isoproturón y diurón) teniendo una concentración de 0.8 ng / mL de cada analito. Las condiciones de pH y concentración del buffer fueron las del método (concentración total buffer 0.02 M y pH = 7.4). En las Figuras 34 a 37, incisos (c) se muestran los cromatogramas obtenidos correspondientes a cada muestra. En la Figura 39 se muestran los porcentajes de recuperación obtenidos al comparar las áreas de los picos de la muestra contra los de un estándar de isotproturón y diurón, a concentración de 20 ng/mL, inyectado directamente en el cromatógrafo.

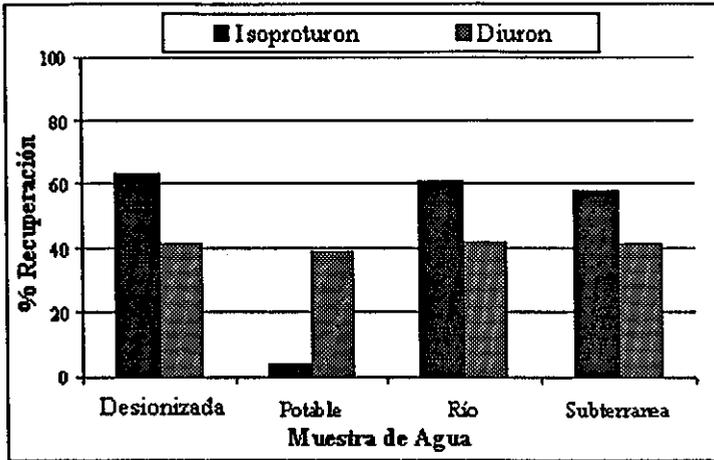


Figura 39. Recuperación de los analitos en las muestras de agua naturales. Se presenta la comparación con agua desionizada.

En general se pueden observar recuperaciones similares a las obtenidas en la validación del método (aproximadamente 60 % para el Isoproturón y aproximadamente 40 % para el diurón). Estas recuperaciones son aceptables para las tres muestras de agua (potable, río y subterránea) a excepción del isoproturón en el agua potable, debido a la inestabilidad determinada previamente. En la Tabla XX se reportan las cantidades determinadas por el método para el isoproturón y el diurón.

Tabla XX. Cantidades determinadas de Isoproturón y Diurón en aguas naturales analizadas por el método establecido.

Muestra	Volumen cargado (mL)	Isoproturón		Diurón	
		Cantidad cargada (ng)	Cantidad determinada (ng)	Cantidad cargada (ng)	Cantidad determinada (ng)
Agua Desionizada	50	20	19	20	18
Agua Potable	50	20	1	20	21
Agua de Río	50	20	18	20	20
Agua Subterránea	50	20	18	20	21

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

### A) Sobre el inmunoabsorbente

Se demostró que el inmunoabsorbente utilizado, adquirido comercialmente, retiene específicamente al Isoproturón y al Diurón por interacción de estos herbicidas con los sitios activos del anticuerpo inmovilizado. Otros miembros de la familia de fenilureas como el linurón y el neburón alcanzan a ser retenidos pero inespecíficamente (probablemente por efectos hidrofóbicos), por lo que su recuperación es muy variable dependiendo de las condiciones experimentales. El monurón y el fluometurón presentan alguna interacción con el sitio activo del anticuerpo, pero ésta es muy débil, lo que se traduce en bajas recuperaciones especialmente cuando el Isoproturón está presente en la muestra.

En general, en presencia de isoproturón y/o diurón en la muestra y cuando se cargan en el cartucho de extracción volúmenes elevados de ésta, la retención de las demás fenilureas es despreciable. Asimismo, en esas condiciones (altos volúmenes de carga) la retención de pesticidas de otras familias (e. g. metiocarb y metil-paratión) es prácticamente nula.

En consecuencia, los cartuchos empacados con el inmunoabsorbente estudiado pueden considerarse como una alternativa útil y efectiva para la preconcentración específica de trazas de las fenilureas isoproturón y diurón a partir de muestras acuosas. Además de su alta selectividad, estos cartuchos son de manejo relativamente sencillo y presentan la gran ventaja de ser regenerables, por lo que pueden ser utilizados confiablemente en múltiples experimentos de extracción siempre y cuando no se rebase la capacidad del inmunoabsorbente.

### B) Sobre el método analítico

Se desarrolló un método analítico que permite determinar los contaminantes feniluréticos isoproturón y diurón a muy bajos niveles de concentración en agua. El método está basado en la extracción y preconcentración selectiva de los analitos en un

inmunoabsorbente y su separación y cuantificación por cromatografía de líquidos con detección UV.

Este método es simple, rápido, robusto y muy sensible ya que la preparación de muestra es sumamente sencilla y se realiza en un tiempo relativamente corto, dando como resultado un extracto muy limpio. Esto último permite a su vez efectuar el análisis cromatográfico en condiciones óptimas, por elución isocrática y a alta sensibilidad de detección, con una columna convencional de fase reversa y un detector UV.

Los reactivos empleados en la preparación de muestra (agua, metanol y buffer de fosfatos) son fácilmente accesibles, poco costosos y su peligrosidad y toxicidad, tanto para el experimentador como para el medio ambiente, son mínimos. Por otra parte, aunque los cartuchos de inmunoextracción son todavía relativamente caros, la regenerabilidad del inmunoabsorbente y la posibilidad de reutilizar repetidamente el cartucho disminuyen sustancialmente los costos del análisis.

El estudio estadístico realizado permitió establecer que el método propuesto es lineal en el intervalo de concentraciones de 0 a 3 partes por billón de isotroturón y diurón, lo que en cantidad de soluto corresponde a un intervalo de 0 a 150 ng en 50 mL de la muestra acuosa procesada. Asimismo, se demostró que el método es exacto y de una precisión excelente para los dos compuestos (coeficientes de variación < 5%), considerando los bajos niveles de concentración trabajados.

Los límites de detección del método, determinados a partir de las consideraciones estadísticas establecidas por la USEPA, fueron de 92 ppt para el isotroturón y de 117 ppt para el diurón. A su vez, los límites de cuantificación fueron de 250 ppt para el primer compuesto y de 320 ppt para el segundo. Estos límites son menores que los reportados en el método oficial de la EPA y la NPS para fenilureas en agua.

La aplicación del método para la determinación de isotroturón y diurón en muestras de agua superficial (río) y subterránea dio resultados muy satisfactorios. Los

cromatogramas obtenidos de las muestras sin dopar fueron muy limpios, no presentando ninguna señal que pudiera interferir en la determinación de los analitos de interés. Por otra parte, los cromatogramas de las muestras dopadas con tres fenilureas (fluometurón, diurón e isoproturón) y dos herbicidas de otras familias (metiocarb y metilparatión) sólo presentaron las señales correspondientes a isoproturón y diurón. Además, la recuperación de estos analitos en las dos muestras reales ensayadas fue similar a la obtenida en muestras sintéticas (agua grado reactivo dopada). Lo anterior confirma la buena exactitud y excelente selectividad del método, así como su aplicabilidad a diversos tipos de aguas naturales.

Por tanto, se propone este método como un medio adecuado y confiable para el monitoreo ambiental de aguas superficiales y subterráneas. En efecto, la exactitud, precisión, selectividad y sensibilidad del método para la determinación de trazas de isoproturón y diurón en este tipo de aguas son congruentes con las cantidades máximas permitidos para fenilureas en aguas naturales y tratadas, establecidas en las normas de calidad del agua por la legislación ambiental de Estados Unidos.

### C) Sobre la estabilidad de las fenilureas en agua y en los cartuchos

Los estudios realizados para determinar y comparar la estabilidad de isoproturón y diurón disueltos en diversos tipos de agua (de río, subterránea, potable y grado reactivo) y adsorbidos en los cartuchos de inmunoextracción mostraron que estos compuestos son muy persistentes en el agua y son aún más estables en los cartuchos. La única excepción fue en el caso del agua potable en la cual el isoproturón se degradó muy rápidamente (~15 minutos), por lo que se concluye que no tiene ningún interés determinar este compuesto en aguas tratadas por cloración.

Los resultados anteriores permiten proponer a los cartuchos de inmunoextracción como una alternativa cómoda y eficaz para el transporte de muestras de agua. Así, una gran cantidad de muestras pueden ser procesadas en campo (cargadas en los cartuchos *in situ*) y fácilmente transportadas desde los sitios de muestra hacia el laboratorio de análisis.

1. B. Hock, A. Dankwardt, K. Kramer, A. Marx. Immunochemical techniques: antibody production for pesticide analysis. A review. *Analytical Chimica Acta* 311 (1995) 393-405.
2. Meulenberg, E. P., Mulder, W. H., Stoks, P. G. Immunoassays for Pesticides. *Environmental Science and Technology* 29(3) (1995) 553-561.
3. Vanderlaan, M., Stanker, L., Watkins, B. Immunochemical Techniques in Trace Residue Analysis. In Immunoassays for Trace Chemical Analysis. ACS Symposium Ser. 451. ACS Washington D. C. 1991. 2-13.
4. Brecht, A., Abuknesha, R., Multi-analyte Immunoassays Application to Environmental Analysis. *Trends in Analytical Chemistry* 14(7) (1995) 361-371.
5. Chiron, S., Papilloud, S., Haerdi, W., Barceló, D. Automated On-Line Liquid-Solid Extraction Followed by Liquid Chromatography-High-Flow Pneumatically Assisted Electrospray Mass Spectrometry for the Determination of Acidic Herbicides in Environmental Waters. *Analytical Chemistry* 67(9) (1995) 1637-1643.
6. Ouyang, S., Xu, Y., Chen, Y. H. Selective determination of a group of organic compounds in complex sample matrixes by LC/MIMS with on-line immunoaffinity extraction. *Analytical Chemistry* 70 (1998) 931-935.
7. Irth, H., Oosterkamp, A. J., Tjaden, U. R., van der Greef, J. Strategies for on-line coupling of immunoassays to high-performance liquid chromatography. *Trends in Analytical Chemistry* 14(7) (1995) 355-361.
8. Wong, R. B., Pont, J. L., Johnson, D. H., Zulalian, J., Chin, T., Karu, A. E. "Immunoaffinity Chromatography Applications in Pesticide Metabolism and Residue Analysis" in Immunoanalysis of Agrochemicals, Chapter 17, *American Chemical Society*, USA, 1995.
9. Frutos, M. Chromatography-Immunology coupling, a powerful tool for environmental analysis. *Trends in Analytical Chemistry* 14(3) (1995) 133-140.
10. Minnaard, W. A., Slobodník, J., Vreuls, J. J., Hupe, K.-P., Brinkman, U. A. Th. Rapid liquid chromatographic screening of organic micro pollutants in aqueous samples using a single short column for trace enrichment and separation. *Journal of Chromatography A* 696 (1995) 333-340.

11. Balinova, A. Solid-phase extraction followed by high-performance liquid chromatographic analysis for monitoring herbicides in drinking water. *Journal of Chromatography* **643** (1993) 203-207.
12. N. Masqué, R. M. Marcé, F. Borull. New polymeric and other types of sorbents for solid-phase extraction of polar organic micropollutants from environmental water. *Trends in Analytical Chemistry* **17(6)** (1998) 384-394.
13. Crescenzi, C., Di Corcia, A., Passariello, G., Samperi, R., Turnes Carou, M. J. *Journal of Chromatography A* **733** (1996) 41-55.
14. Masqué, N., Marcé, R. M., Borull, F. Comparison of different sorbents for on-line solid-phase extraction of pesticides and phenolic compounds from natural water followed by liquid Chromatography. *Journal of Chromatography A* **793** (1998) 257-263.
15. Puig, D., Barceló, D. *Journal of Chromatography A* **733** (1996) 371-381.
16. Hagestam, I. H., Pinkerton, T. C. Internal Surface Reversed-Phase Supports for Liquid Chromatography, *Analytical Chemistry* **57** (1986) 1757-1763.
17. Hagestam, I. H., Pinkerton, T. C. Internal Surface Reversed-Phase Silica Support prepared with Chymotrypsin. *Journal of Chromatography* **351** (1986) 239-248.
18. Hagestam, I. H., Pinkerton, T. C. Production of "Internal Surface Reversed-Phase" Supports: The hydrolysis of selected substrates from silica using chymotrypsin. *Journal of Chromatography*, **368** (1986) 77-84.
19. Nakagawa, T., Shibukawa, A., Shimono, N., Kawashima, T., Tanaka, H. Retention properties of internal-surface reversed-phase silica packing and recovery of drugs from human plasma. *Journal of Chromatography*, **420** (1987) 297-311.
20. Hagiinaka, J., Yasuda, N., Wakai, J., Matsunaga, H., Yasuda, H., Kimura, Y. Internal-Surface Reversed-Phase silica support for direct injection determination of drugs in biological fluids by Liquid Chromatography. *Analytical Chemistry*, **61** (21) (1989) 2445-2448.
21. Haupt, K., Mosbach, K. Plastic antibodies: developments and applications. *Tibtech* **16** (1998) 468-475.
22. Hammock B. D., Gee. S. J. Impact of Emerging Technologies on Immunochemical Methods for Environmental Analysis en "Immunoanalysis of Agrochemicals.

- Emerging Technologies". American Chemical Society Symposium Series, (1995) Capítulo 1, 1-19.
23. Sherry, J. P. Immunodetection of Ecosystem Contaminants en "Immunoanalysis of Agrochemicals. Emerging Technologies". American Chemical Society Symposium Series, (1995) Capítulo 14, 335-353.
24. Hock, B. Antibodies for immunosensors. A review. *Analytical Chimica Acta* 347 (1997) 177-186.
25. Clower, M. "Immunoassays for trace chemical analysis.". American Chemical Society Symposium Series, (1991) Capítulo 5, 49-58.
26. Rojas-Espinosa, O. *Inmunología (de memoria)*, Editorial Médica Panamericana, México, D. F. 1996.
27. Holme D. J. , Peck H. *Analytical Biochemistry*. Chapter 7: Immunological Methods. Ed. Longman. USA, 1983.
28. Lehninger, A. L. *Biochemistry: The molecular basis of cell structure and function*. 2nd edition. Worth Publishers Inc. New York 1975.
29. Van Ginkel, L. A. Immunoaffinity Chromatography, its applicability and limitations in multi-residue analysis of anabolic and doping agents. *Journal of Chromatography*, 564 (1994) 363-384.
30. Karger, B. L., Snyder, L. R., Horvath, C. *An Introduction to Separation Science*. Ed. John Wiley and Sons. U.S.A. 1973.
31. Bell, Ch. W., Roberts, V. A., Scholthof, K-B. G., Zshang, G., Karu, A. E. Recombinant antibodies to Diuron en "Immunoanalysis of Agrochemicals. Emerging Technologies". American Chemical Society Symposium Series, (1995) Capítulo 4, 50-71.
32. Matson, R. S., Little, M. C. Strategy for the immobilization of monoclonal antibodies on solid-phase supports. *Journal of Chromatography* 458 (1988) 67-77.
33. Orthner, C. L., Highsmith, F. A. Tharakan, J., Madurawe, R. D., Morcol, T., Velander, W. H. Comparison of the performance of Immunosorbents prepared by site-directed or random coupling of monoclonal antibodies. *Journal of Chromatography* 558 (1991) 55-70.

34. Wu, D., Walters, R. R. Protein immobilization on sílica supports. A ligan density study. *Journal of Chromatography* **458** (1988) 169-174.
35. Lu, B., Xie, J., Lu, Ch., Wu, Ch., Wei, Y. Oriented immobilization of Fab fragments on sílica surfaces. *Analytical Chemistry* **67** (1995) 83-87.
36. González-Martínez, M.A., Puchades, R., Maquieira, A. On-line Immunoanalysis for environmental pollutants: from batch assays to automated sensors. *Trends in Analytical Chemistry* **18(3)** (1999) 204-218.
37. Pichon, V., Bouzige, M., Miège, C., Hennion, M-C. Immunosorbents: Natural molecular recognition materials for sample preparation of complex environmental matrices. *Trends in Analytical Chemistry* **18(3)** (1999) 219-235.
38. Ferrer, I., Barceló, D. Validation of new solid-phase extraction mterials for the selective enrichment of organic contaminants from environmental samples. *Trends in Analytical Chemistry* **18(3)** (1999) 180-192.
39. Casarett and Doull's Toxicology. The basic science of poisons, 3rd edition. Macmillan Publishing Company. 1986, USA.
40. Osborn, D. Effect of Effect of pesticides on non-target organisms. Toxic Hazard Assessment of Chemical. Edited by M. L. Richardson. Royal Society of Chemical. London, 1986.
41. Catálogo oficial de plaguicidas. CICLOPLAFEST. Comisión Intersecretarial para el control del proceso y uso de plaguicidas, fertilizantes y sustancias tóxicas. México, 1997.
42. Boyd, E. M., Krupa, V. Protein-Deficient Diet and Diurón Toxicity. *J. Agr. Food Chem.* **18(6)** (1970) 1104-1107.
43. Diario Oficial de la Federación. 3 Enero 1991.
44. The Merck Index, 11th edition. Published by Merck & Co., Inc. USA, 1989.
45. Cázares Ibáñez Edgar Arturo. Tesis de Maestría: Metodología para la determinación de trazas de hidrocarburos aromáticos polinucleares en agua por extracción en fase sólida en línea con cromatografía de líquidos. Facultad de Química, UNAM. México, D. F. 2000.
46. Miller, J.C., Miller, J.N. Estadística para Química Analítica, 2ª edición. Addison-Wesley Iberoamericana, E.U.A., 1993.

47. Miller, I., Freund, J.E., Probabilidad y Estadística para Ingenieros. Ed. Reverté Mexicana, S. A. México, D. F., 1973.
48. Barceló, D. Environmental Protection Agency and other Methods for the determination of priority pesticides and their transformation products in water, *Journal of Chromatography* 643 (1993) 117-143)
49. USEPA. Appendix B to part 136. Definition and procedure for the determination of the Method Detection Limit. Revision 1.11. Fed. Regist. 49, 43430 (1984c).
50. Pichon, V., Chen, L., Hennion, M-C., Daniel, R., Martel, A., Le Goffic, F., Abian, J., Barcelo, D. Preparation and Evaluation of Immunosorbents for Selective Trace Enrichment of Phenylurea and Triazine Herbicides in Environmental Waters, *Analytical Chemistry*, 67 (1995) 2451-2460.
51. Dupas, S., Scribe, P.P., Dubernet, J.F., On-line and off-line solid-liquid extraction and liquid chromatographic analysis at trace levels, for monitoring of herbicides and their degradation products in river and fluvio-estuarine freshwater – seawater interfaces, *Journal of Chromatography A*, 737 (1996) 117-126.
52. Minnaard, W. A., Slobodnik, J., Vreuls, J. J., Hupe, K-P., Brinkman, U.A. Th., Rapid liquid chromatographic screening of organic micropollutants in aqueous samples using a single short column for trace enrichment and Separation, *Journal of Chromatography A*, 696 (1995) 333-340.
53. Balinova, A. Solid-phase extraction followed by high-performance liquid chromatographic analysis for monitoring herbicides in drinking water. *Journal of Chromatography*, 643 (1993) 203-207.
54. Ferrer, I., Pichon, V., Hennion, M. C., Barceló, D. Automated sample preparation with extraction columns by means of anti-isoproturon Immunosorbents for the determination of phenylurea herbicides in water followed by liquid-chromatography diode array detection and liquid Chromatography atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry, *Journal of Chromatography A*, 777 (1997) 91-98.
55. Lawrence, J.F., Ménard, C., Hennion, M-C., Pichon, V., Le Goffic, R., Durand, N. Use of immunoaffinity Chromatography as a simplified cleanup technique for the

- liquid chromatographic determination of phenylurea herbicides in plant materialk, *Journal of Chromatography A*, **732** (1996) 277-281.
56. Gerecke, A.C., Tixier, C., Bartels, T., Schwarzenbach, R.P., Muller, S.R. Determination of phenylurea herbicides in natural waters at concentrations below 1 ng/ l using solid-phase extraction, derivatization, and solid-phase microextraction-gas chromatography-mass spectrometry, *Journal of Chromatography A*, **930** (2001) 9-19.
57. Li, Fangshi; Martens, Dieter; Kettrup, Antonius, Simultaneous determination of sixteen phenylurea herbicides in water by high performance liquid chromatography and solid phase extraction. Department of Applied Chemistry, Nanjing University of Technology, Nanjing, Peop. Rep. China. *Sepu* (2001), 19(6), 534-537. CODEN: SEPUER ISSN: 1000-8713. Journal written in English. CAN 136:188940 AN 2001:924351 CAPLUS (Copyright 2002 ACS)