

00582
20



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO

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

**Desarrollo, evaluación y caracterización de
inmunoabsorbentes para la extracción en fase sólida
de pesticidas a partir de muestras acuosas y su determinación
por cromatografía de líquidos**

TESIS
PARA OPTAR POR EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA

M en C. Juan Carlos Vázquez Lira



**Ciencias
Químicas**

TUTOR: Dra. Luz Elena Vera Ávila

AÑO: 2003

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

A



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.

**TESIS
FALLA
DE
ORIGEN**

PAGINACIÓN DISCONTINUA

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Autorizo a la Dirección General de Estudios de Posgrado de la UNAM a difundir en Internet el contenido de mi trabajo de tesis.

NOMBRE: Juan Carlos Vázquez Lira

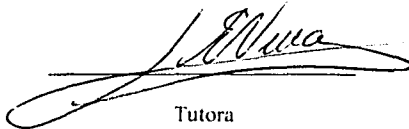
FECHA: 17/11/2003

JURADO ASIGNADO

Presidente: Dr. Ignacio González Martínez
Primer Vocal: Dra. María Aurora Armienta Hernández
Segundo Vocal: Dra. Martha Patricia García Camacho
Tercer Vocal: Dr. Alberto Rojas Hernández
Secretario: Dr. José Federico del Río Portilla
Primer Suplente: Dra. Evangelina Camacho Frías
Segundo Suplente: Dra. Adriana Morales Pérez

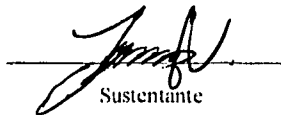
Lugar donde se desarrollo el tema:

Laboratorio de Cromatografía de Líquidos, Departamento de Química Analítica, Facultad de Química, División de Estudios de Posgrado.



Tutora

Dra. Luz Elena Vera Ávila



Sustentante

M. en C. Juan Carlos Vázquez Lira

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

AGRADECIMIENTOS

Para la realización del presente trabajo se contó con apoyo financiero del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por medio del proyecto con clave 34827-A.

Agradezco profundamente a CONACYT por la beca otorgada durante mis estudios de doctorado.

Agradezco a la Dirección General de Estudios de Posgrado (DEGEP) por la beca complementaria otorgada en mis estudios de doctorado.

Doy gracias de manera muy especial a la Dra. Luz Elena Vera Ávila por la dirección del presente trabajo. A su vez le estoy profundamente agradecido por la paciencia, enseñanza y comprensión en todo momento independientemente del trabajo escolar.

A la M. en C. Rosario Covarrubias Herrera por proporcionarme su experiencia en todo momento a nivel técnico en el desarrollo experimental y por brindarme el apoyo humano incondicionalmente.

A mí muy querida Universidad Nacional Autónoma de México

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

DEDICATORIAS

El presente trabajo es solo una muestra de la profunda y más sincera gratitud a mis padres Juan Vázquez López y Amelia Lira García quienes me han brindado todo su apoyo y han sacrificado infinidad de cosas por proporcionarme los medios necesarios tanto humanos como económicos. Gracias padres míos por creer en mí y por demostrarme que cualquier cosa se puede lograr. Mi admiración y respeto. Gracias a Dios.

A mi hermano Ramsés que lo he visto crecer en todos los aspectos, que algún día llegará más lejos que yo. La disciplina y constancia tiene sus recompensas. Estoy orgulloso de ti.

A mi tío Abel por que sus consejos me ayudaron en los momentos oscuros.

A María Luisa Martínez Velasco quien ha estado presente en todo momento con su amor y apoyo incondicional. Te agradezco muy profundamente la alegría e ilusión que le has brindado a mi vida.

Doy gracias de manera muy especial a la Sra. Maria Luisa Velasco de León quien ha creído en mí y me ha brindado todo su apoyo.

A Luis Tomás Martínez Velasco por brindarme su ayuda y confiar en mí. Me da gusto verte realizado, somos colegas ya que transmitimos lo aprendido.

A mis amigos Octavio Godínez, Vicente Hernández, José Luis Balderas, Elizabeth Basulto, Enrique Morales, Yazmín Osomo y tantos otros que me han brindado su amistad; los llevo en mi corazón.

En especial al M. en C. Alejandro Ruiz Cancino (†) donde quiera que este, gracias por haberme encaminado a la ciencia y por contagiarme el entusiasmo de la investigación.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

INDICE

CONTENIDO	PAG.
INDICE.....	i
NOMENCLATURA.....	viii
I. RESUMEN.....	1
II. ABSTRACT.....	4
III. INTRODUCCION.....	6
IV. OBJETIVOS.....	8
1. Objetivo general.....	8
2. Objetivos específicos.....	8
V. HIPÓTESIS.....	10
VI. FUNDAMENTACION, GENERALIDADES Y ANTECEDENTES.....	11
6.1 Fundametación	12
6.2. Inmunoadsorbentes (IAs).....	15
6.3. Preparación de IAs para análisis ambiental.....	27
6.4. Pesticidas.....	34
6.5. Propiedades de los pesticidas en estudio (haptenos blanco).....	38
6.8. Métodos de análisis de los pesticidas en estudio	45
6.9. Caracterización de materiales.....	48
VII. DESARROLLO EXPERIMENTAL.....	57
7.1. Equipo.....	57
7.2. Accesorios.....	58
7.3. Disolventes y reactivos.....	58
7.4. Biomoléculas.....	60
7.5. Preparación de soluciones.....	60
7.6. Determinación de la actividad de los anticuerpos.....	62
7.7. Inmovilización física de anticuerpos por el método de sol-gel.....	64
7.8. Condiciones cromatográficas de separación, detección y cuantificación de los pesticidas en estudio.....	66
7.9. Evaluación de los IAs obtenidos.....	69
7.10. Caracterización física de los IAs.....	74
VIII. RESULTADOS.....	75
8.1. Determinación de la actividad de los anticuerpos.....	75
8.2. Encapsulamiento vía sol-gel.....	76
8.3. Evaluación de los IAs con anti-2,4-D.....	82
8.4. Evaluación de los IAs con anti-clortolurón.....	94
8.5. Evaluación de los IAs con anti-malatión.....	94
8.6. Establecimiento y evaluación estadística de un método analítico para la determinación de trazas de malatión en muestras acuosas.....	103
8.7. Evaluación de los IAs con anti-atrazina.....	112
8.8. Establecimiento y evaluación estadística de un método analítico para la determinación de trazas de simazina atrazina y propazina en muestras acuosas.....	120

TESIS CON
 FALLA DE ORIGEN

8.9. Caracterización física de los IAs.....	132
IX. DISCUSION DERESULTADOS.....	138
9.1. Actividad de los anticuerpos.....	138
9.2. Termodinámica de la reacción hapteno-anticuerpo.....	139
9.3. Optimización del proceso sol-gel.....	142
9.4. Evaluación de los IAs.....	176
9.5. Caracterización de los IAs.....	198
X. CONCLUSIONES.....	206
XI. ANEXOS.....	209
11.1. Anexo A	209
11.2. Anexo B.....	217
XII. BIBLIOGRAFIA.....	225
XIII. ARTICULO.....	231

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

INDICE DE FIGURAS

Figura VI.1	Etapas fundamentales de la cromatografía de afinidad.	16
Figura VI.2	Estructura de una IgG.	20
Figura VI.3	Representación esquemática y comparativa de las Igs.	22
Figura VI.4	Especificidad de un anticuerpo y reactividad cruzada.	25
Figura VI.5	Reacción de anclaje de anticuerpos método 1.	28
Figura VI.6	Reacción de anclaje de anticuerpos método 2.	29
Figura VI.7	Mecanismo de reacción de la hidrólisis (ácida y básica) y de la condensación en la formación del gel.	32
Figura VI.8	Inmovilización física de anticuerpos en una matriz de sílica.	33
Figura VI.9	Estructuras de los herbicidas de la familia clorofenoxi.	39
Figura VI.10	Estructuras de los insecticidas análogos al malatión.	39
Figura VI.11	Estructura de los herbicidas de la familia de las triazinas.	40
Figura VI.12	Degradación enzimática del 2,4-D	41
Figura VI.13	Degradación enzimática de atrazina	42
Figura VI.14	Degradación in vivo del malatión.	43
Figura VI.15	Esquema de un microscopio de barrido diferencial.	50
Figura VI.16	Señales utilizadas en SEM.	51
Figura VI.17	Diagrama típico de un calorímetro diferencial de barrido	55
Figura VIII.1	Estructuras químicas de los derivados e inmunógeno del 2,4-D	76
Figura VIII.2	Procedimiento de un protocolo de inmunoeextracción.	79
Figura VIII.3	Efecto de la composición del eluyente en la recuperación del 2,4-D éster.	84
Figura VIII.4	Efecto del volumen de elución en la recuperación del 2,4-D éster (n=2).	85
Figura VIII.5	Efecto de la velocidad de flujo durante la carga sobre la cantidad retenida de 2,4-D éster (n=4).	85
Figura VIII.6	Efecto del tiempo de recuperación del IA entre ciclos de operación sucesivos	86
Figura VIII.7	Efecto del volumen de muestra en la retención del 2,4-D éster (n=4).	86
Figura VIII.8	% de Recuperación del analito y capacidad de los cartuchos de inmunoeextracción dopados con anti-2,4-D.	88
Figura VIII.9	Efecto de la concentración del buffer en la retención del 2,4-D éster.	90
Figura VIII.10	Estabilidad de un IA (xerogel) dopado con 500 µg de anti-2,4-D.	91
Figura VIII.11	Respuesta del detector UV (215 nm) frente a distintas concentraciones del pesticida malatión.	94
Figura VIII.12	Efecto de la velocidad de flujo durante la carga en la retención de malatión (n=4).	98
Figura VIII.13	Efecto del volumen de muestra en la retención de malatión (n=3).	99

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Figura VIII.14.	% de Recuperación del analito y capacidad de los cartuchos de inmunoeextracción dopados con anti-malati6n.	100
Figura VIII.15	Estabilidad del IA (xerogel) dopado con 500 µg de anti-malati6n	101
Figura VIII.16	Analitos empleados en la evaluaci6n del IA dopado con anti-malati6n	102
Figura VIII.17	Linealidad del m6todo analitico para la determinaci6n de malati6n.	105
Figura VIII.18	Ensayo de especificidad del IA dopado con anti-malati6n.	111
Figura VIII.19	Respuesta del detector UV (220 nm) frente a distintas concentraciones de los herbicidas simazina, atrazina y propazina.	112
Figura VIII.20	Efecto de la velocidad de flujo durante la carga en la retenci6n de atrazina.	115
Figura VIII.21	Efecto del volumen de muestra en la retenci6n de atrazina.	115
Figura VIII.22	% de Recuperaci6n del analito y capacidad de los cartuchos de inmunoeextracci6n dopados con anti-atrazina.	116
Figura VIII.23	Estabilidad de los cartuchos de inmunoeextracci6n dopados con diferentes cantidades de anti-atrazina.	117
Figura VIII.24	Linealidad del m6todo analitico para la determinaci6n de simazina, atrazina y propazina.	121
Figura VIII.25	Cromatogramas correspondientes al an6lisis de muestras de agua de la presa Necaxa dopadas con atrazina, simazina y propazina.	127
Figura VIII.26	Cromatogramas correspondientes al estudio de especificidad del IA dopado con 700 µg de anti-atrazina.	129
Figura VIII.27	Cromatogramas correspondientes a la determinaci6n simult6nea de las triazinas en un IA dopado con 700 µg de anti-atrazina.	131
Figura VIII.28	Microfotografías obtenidas por SEM de un gel blanco y de hidrogeles y xerogeles dopados con anti-2,4-D.	132
Figura VIII.29	Curvas obtenidas por calorimetría diferencial de barrido de los geles dopados y gel blanco	134
Figura VIII.30	Distribuci6n del volumen poroso en funci6n del tamaño de poro para los geles dopados con anticuerpo y el gel blanco.	135
Figura IX.1	Etapas del proceso de sol-gel.	143
Figura IX.2	Susceptibilidad a la hidr6lisis por efecto del sustituyente	144
Figura IX.3	Diagrama ternario del equilibrio TEOS:ETOH:H ₂ O	145
Figura IX.4	Efecto de la proporci6n molar Agua:TEOS en el tiempo de gelificaci6n en un medio 6cido	148
Figura IX.5	Efecto del catalizador 6cido en el tiempo de gelificaci6n	149
Figura IX.6	Mecanismo de reacci6n de la hidr6lisis de un alc6xido empleando como catalizador al HF.	150
Figura IX.7	Cartuchos de extracci6n empleados	151

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Índice de Figuras v

Figura IX.8	Representación hipotética del encapsulamiento de rojo de metilo en la matriz de sílice.	152
Figura IX.9	Método común de encapsulamiento de anticuerpos.	153
Figura IX.10	Equilibrio de una proteína globular en solución.	154
Figura IX.11	Cambios energéticos en la estabilidad de una proteína.	156
Figura IX.12	Efecto del tipo de hidrólisis en la formación de la red del gel.	159
Figura IX.13	Formación de la red de sílica de la hidrólisis ácida de un alcóxido	159
Figura IX.14	Formación del sistema coloidal en la hidrólisis ácida de alcóxidos de silicio	160
Figura IX.15	Parámetros que afectan la transición sol-gel.	163
Figura IX.16	Simulación computarizada de la encapsulación de un anticuerpo en una matriz de sílica	164
Figura IX.17	Sinéresis de una red inmadura de gel.	168
Figura IX.18	Secado de un hidrogel.	169
Figura IX.19	Efecto de la porosidad y orientación de una biomolécula en la conservación de su actividad en el estado encapsulado.	170
Figura IX.20	Secado y rehidratación del citocromo c en el estado encapsulado	171
Figura IX.21	Frente de migración de un soluto en un cartucho de inmunoextracción	178
Figura IX.22	Curva teórica del efecto del flujo sobre el perfil de concentraciones del frente de migración de un hapteno	180
Figura IX.23	Efecto del lavado del IA en la eliminación de interacción no específica con el anticuerpo.	183
Figura IX.24	Perfiles de elución del 2,4-D éster en el IA dopado con 300 µg de anti-2,4-D empleando mezclas acuosas con MeOH.	186
Figura IX.25	Perfiles de elución del 2,4-D éster en el IA dopado con 300 µg de anti-2,4-D empleando mezclas acuosas con ACN	186
Figura IX.26	Perfiles de elución de malatión en el IA dopado con 500 µg de anti-malatión empleando mezclas acuosas con ACN.	188
Figura IX.27	Perfiles de elución de atrazina en el IA dopado con 300 mg de anti-atrazina empleando mezclas acuosas con ACN.	190
Figura IX.28	Relación de la constante de afinidad con la complejidad del hapteno.	192
Figura IX.29	Desarrollo de inmunógenos para triazinas.	193
Figura IX.30	Estabilidad de los IAs dopados con 500 µg de anticuerpo.	195
Figura IX.31	Disposición de las partículas de un gel en diferentes estados de hidratación.	200

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

INDICE DE TABLAS

Tabla VI.1	Ventajas y desventajas de los métodos para el anclaje de anticuerpos.	28
Tabla VI.2	Propiedades químicas de los plaguicidas analizados en el estudio	38
Tabla VI.3.	Algunos métodos utilizados para el análisis en agua de los pesticidas en estudio.	46
Tabla VI.4	Comparación de métodos para la caracterización de porosidad en geles.	59
Tabla VII.1	Medición de la actividad de los anticuerpos.	63
Tabla VII.2	Condiciones experimentales del análisis cromatográfico para 2,4-D y 2,4-D éster.	67
Tabla VII.3	Condiciones experimentales del análisis cromatográfico del pesticida malatión.	68
Tabla VII.4	Análisis cromatográfico de los herbicidas de la familia de las triazinas.	69
Tabla VII.5	Condiciones preliminares para el acondicionamiento, carga, lavado y elución de los cartuchos de inmunoeextracción dopados con anti-2,4-D.	70
Tabla VII.6	Estudio para encontrar el mejor método de acondicionamiento, carga, lavado y elución de los cartuchos de inmunoeextracción con anti-malatión.	71
Tabla VII.7	Análisis cromatográfico isocrático para el estudio de especificidad en un IA dopado con 700 µg de anti-atrazina empleando agua de presa	73
Tabla VIII.1	Comparación de actividad de los anticuerpos utilizados.	75
Tabla VIII.2.	Ensayos realizados en el encapsulamiento del anti-2,4-D (n=2).	79
Tabla VIII.3	Efecto del secado del gel en la retención del 2,4-D éster (500 µg de anti-2,4-D encapsulado).	81
Tabla VIII.4	Efecto de las modificaciones experimentales en la obtención del IA para 2,4-D.	82
Tabla VIII.5	Contenido de ACN necesario para evitar la retención no específica en cartuchos empacados con geles sin dopar (gel banco).	83
Tabla VIII.6	Relación entre la masa retenida de 2,4-D éster y la cantidad de anticuerpo inmovilizado	89
Tabla VIII.7	Reactividad cruzada del IA dopado con 500 µg de anti-2,4-D.	92
Tabla VIII.8	Aumento del rendimiento de la reacción por efecto de la agitación del sol durante el proceso.	96
Tabla VIII.9	Capacidad de IAs para malatión con diferentes cantidades de anticuerpo encapsulado.	101
Tabla VIII.10	Resultados de la prueba de hipótesis para los coeficientes r, a y b. (n=7, α=0.05)	106
Tabla VIII.11	Intervalo de confianza para el coeficiente a.	107

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Índice de Tablas vii

Tabla VIII.12	Intervalo de linealidad del método para la determinación de malatión.	107
Tabla VIII.13	Precisión del método analítico para la determinación de trazas de malatión en muestras de agua.	107
Tabla VIII.14	Parámetros estadísticos para la determinación de la exactitud (n=7).	108
Tabla VIII.15	Comparación de los LDD y LDC del método para la determinación de malatión	109
Tabla VIII.16	Estudio fisicoquímico del agua de la presa Tenango.	110
Tabla VIII.17	Regresión lineal de la respuesta del detector para la determinación de atrazina, simazina y propazina.	113
Tabla VIII.18	Capacidad del IA dopado con anti-atrazina empleando diferentes cantidades de anticuerpo encapsulado.	117
Tabla VIII.19	Reactividad cruzada del IA dopado con 700 µg de anti-atrazina.	118
Tabla VIII.20	Ecuaciones de regresión del estudio de linealidad del método para la determinación de atrazina, simazina y propazina	121
Tabla VIII.21	Resultados de las pruebas de hipótesis sobre los coeficientes r, a y b en la determinación de triazinas.	122
Tabla VIII.22	Intervalos de confianza para el coeficiente a en la determinación de triazinas.	122
Tabla VIII.23	Intervalos de linealidad del método para cada triazina.	123
Tabla VIII.24	Precisión del método analítico para la determinación de trazas de triazinas en muestras de agua.	123
Tabla VIII.25	Parámetros estadísticos para la determinación de la exactitud (n=7) en la determinación de triazinas.	124
Tabla VIII.26	Comparación de los LDD y LDC del método analítico para la determinación de algunas triazinas en agua.	125
Tabla VIII.27	Estudio fisicoquímico del agua de la presa Necaxa.	126
Tabla VIII.28	Cantidades determinadas de triazinas en agua de la presa Necaxa analizadas por el método analítico establecido.	128
Tabla VIII.29	Cantidad determinada de atrazina en el estudio de especificidad del IA empleando agua de la presa Necaxa analizada por el método analítico establecido.	128
Tabla VIII.30	Determinación simultánea de 3 triazinas determinadas en agua de la presa Necaxa analizada por el método analítico establecido.	130
Tabla VIII.31	Datos Obtenidos del estudio de termoporometría.	136
Tabla IX.1	Evaluación de la K _b de los anticuerpos empleados por su correspondiente antígeno.	141
Tabla IX.2	Propiedades de algunos alcóxidos basados en silicio.	144
Tabla IX.3	Condiciones establecidas para la preparación de IAs por sol-gel.	175

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

NOMENCLATURA.

A	Angstroms
Ag	Antígeno
Ab	Anticuerpo
ACN	Acetonitrilo
BET	Ecuación de Brunauer-Emmet -Teller
C	Concentración de soluto en el efluente
Co	Concentración de soluto en la muestra (influyente)
C-18	Columna de fase enlazada octadecilsilano
CG	Cromatografía de gases
D.I.	Diámetro interno.
Da	Dalton
DAD	Detector de arreglo de diodos
DSC	Calorimetría diferencial de barrido
DTP	Distribución de tamaño de poro.
EFS	Extracción en fase sólida
ELL	Extracción líquido-líquido
EM	Espectrometría de masas
FAO	Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y Alimentación.
FIA	Análisis por inyección de flujo
HPLC	Cromatografía de líquidos de alta resolución
IA	Inmunoadsorbente
IAS	Inmunoadsorbentes
IgG	Inmunoglobulina
IgGs	Inmunoglobulinas
KDa	Kilodalton
K _b	Constante de afinidad del complejo antígeno-anticuerpo
K _{so}	Coefficiente de absorción al suelo
K _{oc}	Coefficiente de carbono orgánico
LDD	Límite de detección
LDC	Límite de cuantificación
M	Molaridad
MeOH	Metanol
MPa	Megapascuales
N	Normalidad
NPS	Inspección nacional de pesticidas en E.U.
ng	Nanogramo
PBS	Solución salina en buffer de fosfatos
SEM	Microscopía electrónica de barrido
ppb	Partes por billón.
t ^{1/2}	Tiempo de vida media
USEPA	Agencia de protección al medio ambiente en E.U.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

UV	Ultravioleta
Vf	Volumen de fuga
Ve	Volumen estequiométrico
Vs	Volumen de saturación
Vx	Volumen en un punto cualquiera

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

I. RESUMEN.

El desarrollo, caracterización y aplicación de nuevos materiales para la determinación selectiva y sensible de contaminantes orgánicos en matrices ambientales es uno de los principales focos de interés actuales en el campo de la Química Analítica. En este contexto, los inmunoadsorbentes, constituidos por un soporte sólido que contiene anticuerpos inmovilizados, representan una de las más destacadas propuestas surgidas en la última década para la extracción y preconcentración selectiva de compuestos traza a partir de matrices acuosas complejas.

En este trabajo, se reportan los resultados obtenidos en la preparación y evaluación de inmunoadsorbentes, así como su aplicación en métodos analíticos desarrollados para la determinación de algunos pesticidas en aguas superficiales.

Para la preparación de los inmunoadsorbentes se optó por explorar la vía basada en la inmovilización física de los anticuerpos. Así, se desarrolló y optimizó un método para encapsular macromoléculas biológicas en una matriz de sílice mediante la técnica de sol-gel. El cuidadoso control y ajuste de los diversos parámetros y condiciones experimentales a lo largo del proceso sol-gel permitió preservar en buena medida la reactividad química característica de las biomoléculas, las cuales quedaron atrapadas permanentemente en un material altamente poroso. De esta manera, se logró establecer una metodología eficaz, reproducible y relativamente simple para la preparación de hidrogeles y xerogeles de sílica dopados con anticuerpos selectivos a diversos pesticidas.

La evaluación química de los biomateriales obtenidos con los anticuerpos anti-2,4-D, anti-malatió y anti-atrazina inmovilizados se realizó mediante experimentos de extracción en fase sólida (EFS) en cartuchos empacados con los inmunoadsorbentes previamente molidos. Estos estudios corroboraron la selectividad de los adsorbentes y mostraron la buena estabilidad de los anticuerpos encapsulados en sol-gel y la interesante posibilidad de utilizar repetidamente el material en ciclos de adsorción-desorción sin que se alteraran significativamente sus propiedades de retención. Asimismo, se comprobó que los cartuchos empacados con xerogeles dopados presentaban mayor retención y mejor resistencia a la

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

presión que los empacados con hidrogeles. Los primeros pudieron ser cargados con volúmenes de muestra relativamente grandes (al menos 250 mL) a velocidades de flujo moderadamente altas (4-5 mL/min) sin que se observara disminución en la capacidad de retención del cartucho. Esta importante característica refleja, por una parte, la fuerza de interacción antígeno-anticuerpo y la rapidez de la reacción de acoplamiento entre ambas especies y, por otra parte, indica la alta porosidad del material que conlleva a una rápida cinética de difusión del soluto en el interior de la partícula. Esto último fue confirmado mediante la caracterización física de los inmunoadsorbentes por microscopía electrónica de barrido y termoporometría.

Las interesantes características de los inmunoadsorbentes sol-gel fueron aprovechadas para desarrollar métodos analíticos rápidos y simples para la determinación de malatión y de las triazinas atrazina, propazina y simazina a niveles de concentración del orden de la ppb (parte por billón = $1 \mu\text{g/L}$) en muestras acuosas. Los extractos concentrados y purificados obtenidos del cartucho de inmuoextracción fueron analizados por cromatografía de líquidos con detección UV. La precisión, exactitud y sensibilidad de los métodos desarrollados fue demostrada mediante el análisis estadístico de los resultados obtenidos con muestras dopadas. Los límites de detección alcanzados para volúmenes de muestra procesada de 50 mL oscilaron entre 0.1-0.2 $\mu\text{g/L}$; sin embargo, estos límites pueden ser aún reducidos al menos hasta la quinta parte, aumentando el volumen de muestra cargada en los cartuchos de inmuoextracción. Así, los métodos analíticos basados en la extracción de la muestra por inmuoafinidad permiten cumplir con las normas más exigentes establecidas para la calidad de las aguas naturales y potables. Finalmente, la selectividad fue verificada por el análisis de muestras de agua de presa dopadas con el (los) analito (s) de interés y con otros pesticidas de diferentes familias. Los cromatogramas obtenidos mostraron que sólo el analito-hapteno o análogos estructurales de la misma familia (p.ej. simazina y propazina en el caso del inmunoadsorbente preparado con antiatrazina) fueron reconocidos por el correspondiente anticuerpo y extraídos de la muestra.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

En conclusión, los resultados obtenidos en este trabajo muestran que el método desarrollado para la preparación de inmunoabsorbentes via sol-gel es una alternativa eficaz, más simple, menos costosa y más reproducible que los métodos basados en el enlazamiento químico del anticuerpo a un soporte sólido. Asimismo, se confirma que el uso de inmunoabsorbentes para la EFS de muestras acuosas presenta grandes ventajas sobre otros métodos de preparación de muestra cuando el objetivo del análisis es la detección y cuantificación de un compuesto particular (o algunos compuestos de la misma familia) a bajos niveles de concentración en matrices complejas.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

II. ABSTRACT

The development, characterization and application of new materials for the sensitive and selective determination of organic pollutants in environmental matrices are actually one of the main focus of interest in Analytical Chemistry. In this context, the immunosorbents which consist of specific antibodies immobilized in a solid support represent one of the most interesting proposals of the last decade for the selective extraction and preconcentration of trace compounds from complex aqueous matrices.

This work reports the results obtained in the preparation and evaluation of immunosorbents, and their application in analytical methods for the determination of some pesticides in surface water.

The physical immobilization of antibodies was chosen for the preparation of immunosorbents. Thus, a method for the encapsulation of biological macromolecules in a silica matrix was developed and optimized using the sol-gel technique. The careful control and adjustment of several parameters and experimental conditions during the sol-gel process permitted us to preserve an important proportion of the characteristic chemical reactivity of biomolecules, which remained permanently trapped inside the highly porous network of the obtained material. In this way, it was possible to establish an efficient, reproducible and relatively simple methodology for the preparation of silica hydrogels and xerogels doped with specific antibodies raised against different pesticides.

The chemical evaluation of biomaterials containing anti-2,4-D, anti-malathion and anti-atrazine immobilized antibodies was carried out by means of solid-phase extraction (SPE) experiments in cartridges packed with the ground immunosorbents. From these studies, the selectivity of the sorbents, the stability of the sol-gel encapsulated antibodies, and the interesting possibility of extensive cartridge reuse were confirmed. Indeed, the retention properties of the material were not altered after its use in repeated adsorption-desorption cycles. Besides, it was found that the cartridges packed with doped xerogels presented a higher retention and a better resistance to the effects of pressure than those packed with hydrogels. Thus, the former could be loaded with relatively large sample volumes (≤ 250 mL)

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

at moderately high flowrates (4-5 mL/min) without observing any loss in their retention capacity. On one side, this important characteristic reflects the intensity of the hapten-antibody interaction and the rapidity of the coupling reaction between both species. Besides, it is also indicative of the high porosity of the material that allows a rapid solute diffusion kinetics at the interior of the particle. The physical characterization of the immunosorbents by scanning electron microscopy (SEM) and thermoporometry confirmed the aerogel-like structure of the doped xerogels and hydrogels.

The interesting characteristics of the prepared biogels were exploited to develop rapid and simple analytical methods for the determination of malathion and three triazines, atrazine, propazine and simazine at the ppb (part per billion = 1 µg/L) concentration level in aqueous samples. The pre-concentrated and purified extracts from the immunoextraction cartridge were analyzed by liquid chromatography with UV detection. The accuracy, precision and sensitivity of these methods were statistically verified using the results obtained from the analysis of fortified samples. Detection limits around 0.1-0.2 µg/L were obtained with processed sample volumes of 50 mL; however it is possible to lower these limits, at least five times, by increasing the volume of sample loaded in the cartridges. In this way, the analytical methods based on immunoaffinity extraction of the sample can arrive to easily fulfill the exigencies of the strictest regulations for the quality of natural and potable waters. Finally, the selectivity was tested with dam water samples fortified with the analyte (s) of interest and with other pesticides from different families. The obtained chromatograms showed that only the analyte-hapten or structurally related compounds from the same family (i.e. simazine and propazine in the case of the antiatrazine immunosorbent) were recognized by the corresponding antibody and were extracted from the sample.

In conclusion, the results obtained in this work show that the developed method for the preparation of immunosorbent via sol-gel is an efficient alternative, simpler, less costly and more reproducible than the methods based on the chemical bonding of the antibody to a solid support. It is also confirmed that the use of immunosorbents for the SPE of aqueous samples presents important advantages over other sample preparation methods for the detection and quantitation of a particular compound (or some compounds of the same family) at low concentration levels in complex matrices.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

III. INTRODUCCION.

El desarrollo de nuevas metodologías para la preparación de muestra ha traído consigo infinidad de ventajas, siendo la más crucial la reducción en el tiempo de análisis requerido para obtener resultados exactos y precisos. Como parte de un procedimiento analítico, la preparación de muestra es una etapa crítica ya que puede contribuir con un mayor error en las determinaciones en todas las áreas de aplicación. Por ejemplo, en el campo del análisis de muestras ambientales y particularmente de muestras acuosas, los métodos tradicionales involucran una serie de operaciones eminentemente manuales (extracciones líquido-líquido, evaporación de disolvente, formación eventual de derivados, etc.) que son largas, tediosas y generalmente poco precisas.

En los últimos años estos métodos han sido progresivamente sustituidos por la extracción en fase sólida (EFS) utilizando discos, cartuchos o pequeñas precolumnas empacadas con un adsorbente adecuado. Así, la EFS se emplea para la extracción, preconcentración y purificación de analitos de interés a partir de la matriz acuosa. La EFS se puede operar en dos modalidades, la primera llamada "fuera de línea" en donde los analitos se desorben con un volumen pequeño de un disolvente generalmente orgánico, el cual en algunos casos es evaporado para concentrar aún más la muestra ó bien para reconstituir el extracto en un disolvente compatible con el método de análisis posterior; la segunda modalidad, más rápida y eficiente, se denomina "en línea", en ella los analitos se desorben en el mismo medio donde serán cuantificados, por ejemplo la fase móvil utilizada en un cromatógrafo de gases o de líquidos.

A pesar de las grandes ventajas que ha representado el uso de la EFS como técnica de preparación de muestra, persisten algunos problemas asociados con la falta de selectividad de los adsorbentes hasta ahora utilizados. En efecto, cuando se analizan compuestos minoritarios (trazas) en matrices complejas, es común utilizar un adsorbente de alta capacidad para concentrar adecuadamente a los solutos de interés. Sin embargo, muchos otros compuestos presentes en la matriz son también extraídos y concentrados con el riesgo de tener fuertes interferencias durante el análisis posterior del extracto. Por ello, ha

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

sido necesario complicar los métodos analíticos introduciendo otros pasos de EFS con diferentes adsorbentes para purificar el extracto y evitar interferencias.

Una variante muy reciente de la EFS es el empleo de los llamados inmunoadsorbentes, los cuales son fases selectivas con anticuerpos inmovilizados en un soporte sólido o en gel. Las aplicaciones más novedosas de estas fases se han enfocado hacia la determinación de contaminantes entre los que destacan los pesticidas. Con esto se abre todo un nuevo campo de investigación dirigido al desarrollo de materiales y protocolos de inmunoextracción para diversos pesticidas basados en la interacción específica antígeno-anticuerpo.

Dentro de este campo de investigación se encuadra el presente trabajo cuyo objetivo es desarrollar nuevos inmunoadsorbentes por el método de sol-gel, para herbicidas de la familia de los ácidos fenoxiacéticos y de las triazinas, así como para el insecticida organofosforado malatión.

La optimización del proceso de encapsulación del anticuerpo, la caracterización química y física del biomaterial obtenido y la determinación de las condiciones óptimas de inmunoextracción para cada tipo de pesticida forman parte integral de la investigación realizada y se describen y discuten ampliamente a lo largo del trabajo. Finalmente, dado que en Química Analítica ningún desarrollo tecnológico o metodológico está completo hasta demostrar su aplicación en muestras reales, en el caso presente los inmunoadsorbentes son utilizados en la determinación de trazas de malatión o de atrazina, simazina y propazina en agua de presa. El establecimiento de protocolos de análisis rápidos y sencillos y los excelentes resultados obtenidos en la certificación de los métodos analíticos, claramente demuestran las enormes ventajas de la inmunoextracción para la determinación de compuestos minoritarios en matrices complejas.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

IV. OBJETIVOS.

4.1. OBJETIVO GENERAL.

Desarrollar fases selectivas constituidas por inmunoadsorbentes basados en anticuerpos policlonales, para la extracción en fase sólida de herbicidas clorfenoxi, triazinas y malatión a partir de muestras acuosas, como una alternativa rápida, novedosa y eficiente para preparación de muestras. Asimismo, desarrollar metodologías analíticas basadas en esta forma de preparación de muestra para la determinación de trazas de estos pesticidas en aguas superficiales.

4.2. OBJETIVOS ESPECIFICOS.

- ✓ Realizar la determinación de actividad de todos los anticuerpos utilizados (anti-2,4-D, anti-clortoluron anti-malatión y anti-atrazina) en su estado libre.
- ✓ Seleccionar un precursor adecuado para la inmovilización física de los anticuerpos por la técnica de sol-gel y determinar las condiciones adecuadas de reacción para que dicha inmovilización sea eficiente y que los anticuerpos conserven sus propiedades biológicas.
- ✓ Determinar el comportamiento y principales características de los cartuchos de inmunoextracción empacados con los inmunoadsorbentes desarrollados (capacidad de carga, cinética de adsorción-desorción, entre otros), usando muestras de agua grado reactivo dopadas con herbicidas clorfenoxi, malatión y sus metabolitos o triazinas, según corresponda.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

- ✓ Establecer las condiciones experimentales para la separación cromatográfica, detección y cuantificación de los analitos de prueba antes mencionados.

- ✓ Determinar la estabilidad y las condiciones de uso y almacenaje de los cartuchos de inmunoeextracción preparados.

- ✓ Establecer las condiciones óptimas para la EFS de los diferentes grupos de pesticidas a partir de matrices acuosas, en las cuales su concentración se encuentra a nivel de trazas (ppb).

- ✓ Realizar estudios de reactividad cruzada con los diferentes inmunoadsorbentes desarrollados.

- ✓ Considerando los resultados de los estudios previos, establecer métodos analíticos para la determinación selectiva y sensible de malatión y atrazina en aguas superficiales. Determinar linealidad, precisión y exactitud de estos métodos.

- ✓ Caracterizar los inmunoadsorbentes desarrollados a través de microscopía electrónica de barrido para estimar la porosidad superficial del material. Asimismo, realizar una determinación de tamaño de partícula por microscopía óptica.

- ✓ Caracterizar diversas propiedades físicas de los inmunoadsorbentes a través de un estudio termoporimétrico.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

V. HIPÓTESIS.

Es posible obtener inmunoabsorbentes selectivos para herbicidas o insecticidas mediante el encapsulamiento de anticuerpos adecuados en los poros de un soporte inerte. El inmunoabsorbente así obtenido, permitirá extraer estos pesticidas selectiva y cuantitativamente de muestras acuosas variadas.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

VI. FUNDAMENTACIÓN, GENERALIDADES Y ANTECEDENTES.

6.1. FUNDAMENTACIÓN

La preocupación por el cuidado del medio ambiente ha traído como consecuencia un establecimiento de normas estrictas que regulan las concentraciones máximas permisibles de productos tóxicos en los diferentes compartimentos ambientales. Estas normas a menudo son muy exigentes para las técnicas analíticas instrumentales comúnmente empleadas en el monitoreo ecológico, las cuales no alcanzan a tener por sí solas la sensibilidad y selectividad requeridas para estos análisis, particularmente en el caso de los llamados "microcontaminantes orgánicos" (pesticidas, hidrocarburos aromáticos polinucleares, policlorobifenilos etc.). Estos productos son muy tóxicos aún a niveles de concentración del orden de trazas (partes por billón – ppb), por lo que su presencia en el suelo, aire o agua está fuertemente regulada.

La determinación de estos contaminantes a los niveles de concentración establecidos en las normas ecológicas, en matrices que contienen muchos otros productos orgánicos millones de veces más concentrados, es un problema sumamente difícil. Para resolverlo ha sido necesario recurrir al empleo de técnicas sofisticadas y/o complicadas de preparación de muestra.

Así, en los últimos años, muchos trabajos de investigación se han enfocado hacia el desarrollo de nuevos materiales adsorbentes y mejores metodologías para extraer, concentrar y purificar los contaminantes traza a partir de diferentes matrices ambientales, previo a su análisis destacan particularmente los inmunoadsorbentes (IAs) que, por su gran selectividad, representan una de las más interesantes opciones para la extracción en fase sólida (EFS) de compuestos minoritarios en matrices complejas. De hecho, algunos IAs para sustancias tóxicas (aflatoxinas) y pesticidas (fenilureas y triazinas) han empezado a ser comercializados en años recientes y varios más se encuentran actualmente en desarrollo en diversos centros de investigación (bencidinas, imidazolinonas, hidrocarburos poliaromáticos).¹⁻⁸ Sin embargo, hasta ahora se han encontrado reportes sobre el desarrollo

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

de IAs para algunos pesticidas ampliamente utilizados en México como lo son los herbicidas clorofenoxi y los insecticidas organofosforados.

Para el desarrollo de un nuevo inmunoabsorbente (IA) es indispensable centrar la materia prima principal que es el anticuerpo. Aunque los grandes progresos en el área de la Inmunología han hecho teóricamente posible la generación de anticuerpos contra cualquier sustancia, la disponibilidad comercial actual de anticuerpos para pesticidas es muy limitada. Esto es debido en gran parte a la dificultad que representa producir un anticuerpo contra una pequeña molécula no inmunogénica, lo que se traduce en un alto costo. Primero es necesario diseñar y sintetizar inmunógenos de prueba, funcionalizando la molécula del pesticida en diversas posiciones y acoplándolo a una proteína acarreadora. Los conjugados hapteno-proteína son inyectados en animales inmunológicamente competentes y varios meses después se colecta el antisuero para aislar, mediante una serie de pasos de separación y purificación, la fracción inmunoglobulínica. Finalmente, la actividad pesticida de las fracciones purificadas es determinada por inmunoensayos para seleccionar el o los inmunógenos más exitosos y a partir de ellos realizar el proceso de producción de anticuerpos a mayor escala.⁹⁻¹¹ Debido a esto y al todavía escaso conocimiento de la técnica de inmuoextracción en fase sólida, la producción y uso de anticuerpos para pesticidas se limita a algunas pequeñas empresas muy especializadas y a laboratorios de investigación biotecnológica. Sin embargo, a medida que los usuarios potenciales, en el campo de la Química Analítica Ambiental, conozcan y se convenzan de las ventajas de los IAs para la preparación de muestra, es de esperarse un marcado aumento de la variedad y disponibilidad de anticuerpos y una disminución en su costo.

La segunda etapa en el desarrollo de un IA es la inmovilización del anticuerpo. Esta se puede realizar por dos vías, la química basada en la formación de un enlace covalente entre el anticuerpo y un soporte funcionalizado, y la vía física basada en la encapsulación de la biomolécula en un soporte poroso mediante la técnica de sol-gel. Hasta ahora, el método más comúnmente utilizado ha sido el enlazamiento covalente, el cual es incluso empleado para la preparación de los IAs que ya han sido comercializados. Sin embargo, durante la reacción de acoplamiento el anticuerpo es expuesto a condiciones drásticas y continua manipulación, lo que puede afectar su estructura tridimensional y provocar su

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

inactivación. Adicionalmente, la molécula enlazada puede quedar mal orientada, con sus sitios activos bloqueados por el propio soporte.¹²⁻¹⁴ Por otra parte, el proceso sol-gel se realiza bajo condiciones más suaves y a temperatura ambiente, lo que resulta ventajoso cuando se desean inmovilizar moléculas delicadas. Además, como la molécula no está ligada al soporte sino sólo atrapada en los poros de éste, no se presentan problemas de mala orientación y la accesibilidad de los solutos a los sitios activos de la especie atrapada está menos restringida. Por ello, esta técnica ha sido utilizada para inmovilizar una gran variedad de biomoléculas (enzimas, anticuerpos catalíticos, ácidos nucleicos, etc.)¹⁵⁻¹⁸ e incluso células vivas, con aplicaciones potenciales como biosensores, bioreactores y aún como órganos artificiales. Las ventajas de los biomateriales sol-gel han despertado interés en el área ambiental y algunos investigadores han comenzado a explotar el uso de la técnica para la preparación de IAs o inmunosensores por encapsulamiento de enzimas (paratiión hidrolasa, peroxidasa de rábano, glucosa oxidasa, fosfata ácida)^{19, 20} y anticuerpos (anti-atrazina,²¹ anti-isoproturón²² y anti-pireno^{23, 24}).

Aunque se han realizado grandes progresos en la última década en lo que respecta al encapsulamiento sol-gel de biomoléculas, todavía es necesario optimizar el proceso para lograr obtener biomateriales más activos, estables y resistentes. Problemas como la pérdida de actividad de la especie encapsulada por efecto del precursor utilizado para la formación del gel (generalmente alcóxidos metálicos) o de los subproductos generados (alcoholes), deben ser controlados. Asimismo, deben buscarse condiciones apropiadas para limitar el colapso de los poros y el encogimiento del material durante las etapas de maduración y secado, ya que la compresión del soporte puede afectar a la biomolécula atrapada y la pérdida de porosidad incide sobre la cinética de difusión de los solutos de interés hacia el interior del gel.

Considerando lo anteriormente expuesto, en este trabajo se contemplaron tres metas principales y se diseñaron una serie de acciones para su cumplimiento, como se describe brevemente a continuación.

- 1) Establecer un protocolo sol-gel de alta efectividad para el encapsulamiento de anticuerpos.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

A través de una serie de ensayos para la preparación de geles de sílice, primero no dopadas y después dopadas con moléculas orgánicas progresivamente más complejas hasta llegar a los anticuerpos, se buscó determinar los puntos críticos del proceso sol-gel y optimizar las condiciones experimentales en cada etapa de éste, con el fin de preservar tanto la actividad y conformación de la molécula dopante como la porosidad de la matriz sólida.

2) Desarrollar IAs para pesticidas de uso común en México.

Dado que la producción de anticuerpos no se contemplaba en el proyecto, se realizó una intensa exploración del mercado entre compañías especializadas en enzimas y anticuerpos. Se pudieron adquirir finalmente anticuerpos para clortolurón, atrazina, malatión y ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D). Los 4 pesticidas son utilizados en México, pero en mucho mayor grado los dos últimos. El trabajo comprendió no sólo el encapsulamiento de los anticuerpos sino un profundo estudio del comportamiento y características químicas de los IAs sintetizados, así como una caracterización cualitativa y cuantitativa de sus propiedades físicas más importantes.

3) Desarrollar nuevas metodologías analíticas sensibles, selectivas y más simples para la determinación de trazas de pesticidas en aguas superficiales por inmunoextracción-cromatografía de líquidos.

En este caso las acciones realizadas consistieron en establecer puntualmente el protocolo del método analítico, certificar su calidad mediante las correspondientes figuras estadísticas y determinar sus alcances y limitaciones. Debido a las características de los anticuerpos con los que se trabajó se establecieron métodos para malatión y las triazinas atrazina, propazina y simazina.

En las siguientes secciones de este capítulo se describen en mayor detalle algunas cuestiones relacionadas con los IAs y su preparación que sólo fueron brevemente mencionadas en esta parte. Aunque algunos conceptos, principalmente biológicos, pueden parecer muy básicos, éstos sirven de soporte para la interpretación y discusión de resultados

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

en capítulos posteriores. Además, se debe considerar que el presente trabajo es de particular interés para las áreas de Química Analítica y Química Ambiental, cuyos especialistas no están generalmente muy familiarizados con las propiedades, comportamiento y estructura de las macromoléculas biológicas.

6.2. INMUNOADSORBENTES (IAs).^{2, 6, 10, 25}

Un **inmunoadsorbente (IA)** está constituido por un antígeno o un anticuerpo enlazado covalentemente, atrapado o adsorbido en un soporte macroporoso o en gel, con la finalidad de separar selectivamente anticuerpos o antígenos de una mezcla de sustancias. Este tipo de separaciones forma parte de un amplio grupo de métodos conocidos como cromatografía de afinidad, o más precisamente de inmunofinidad.

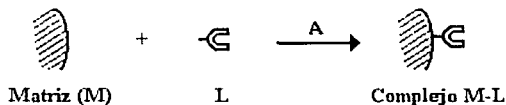
El primer antecedente de una separación por afinidad lo encontramos en los trabajos desarrollados en 1910 para la purificación de amilasa sobre la base de un almidón insoluble. Posteriormente, en 1967 algunos autores reportaron que las moléculas que contenían grupos amino primarios podían ser acopladas a matrices de polisacáridos activadas con bromuro de cianógeno y ya en 1972, Pharmacia había desarrollado la Sepharosa-4B activada con bromuro de cianógeno, un gel listo para la inmovilización del ligando. En la actualidad existen una serie de productos (geles) activados para la inmovilización de ligandos a través de diferentes grupos funcionales. En la cromatografía de afinidad la molécula a ser purificada es adsorbida de forma reversible y específica, a una sustancia complementaria (ligando) inmovilizada en un soporte insoluble (matriz). La fuerte y selectiva interacción del ligando de afinidad con la molécula de interés permite procesar grandes volúmenes de muestra, obteniendo un importante efecto concentrador. La selectividad de las separaciones depende fundamentalmente de la especificidad natural de las moléculas interactuantes. Por sus características, este método puede ser usado para:

- Purificar sustancias de mezclas biológicas complejas.
- Separar la forma nativa de la desnaturalizada de una misma sustancia.
- Recuperar pequeñas cantidades de material biológico de grandes cantidades de sustancias contaminantes.

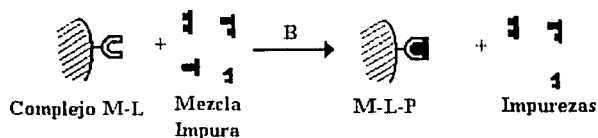
TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Las etapas básicas en la cromatografía de afinidad se ilustran en la figura VI.1.²⁶

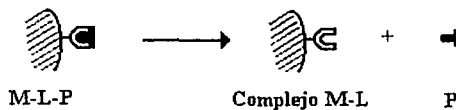
1- Inmovilización del ligando (L).



2- Adsorción de la sustancia a purificar (P).



3- Desorción de la sustancia fijada.

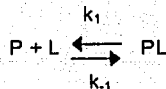


A: Enlace covalente

B: Enlace reversible y específico

Figura VI.1. Etapas fundamentales de la cromatografía de afinidad.

La interacción entre las dos moléculas, producto (P) y ligando (L), puede representarse por el siguiente equilibrio:



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

donde:

P es la molécula que debe ser purificada

L es el ligando

k_1 y k_{-1} son las constantes de velocidad de asociación y disociación de este equilibrio respectivamente.

La constante de asociación (k_b) es igual a la relación k_1/k_{-1} y representa la afinidad entre el ligando y la molécula de interés.

Los sistemas biológicos más usados en la cromatografía de afinidad son los pares biológicos:

Enzima - Inhibidor, cofactor, virus

Anticuerpo - Antígeno

Hormona - Receptor

Vitamina - Proteína transportadora

Macromoléculas que interactúan con metales - Iones metálicos

Para comprender el funcionamiento de un IA es necesario definir algunos términos:

- **Antígeno (Ag):** son aquellas sustancias capaces de inducir una respuesta inmune específica y deben de cumplir una serie de propiedades inmunológicas tales como: inmunogenicidad [capacidad de producir una respuesta inmune específica, celular o humoral], antigenicidad [capacidad de combinarse con anticuerpos Ac o receptores de células T (TCR)], alergenicidad [capacidad de activar ciertos tipos de respuestas humorales o celulares que producen síntomas de alergia]. Un hecho importante es que si una molécula es inmunogénica también es antigénica, pero una molécula antigénica no siempre es inmunogénica.²⁷
- **Hapteno:** es aquel grupo químico definido, de pequeño tamaño, que por sí mismo es incapaz de desencadenar una respuesta inmune (es decir, no es inmunógeno), pero que unido covalentemente a una molécula portadora se comporta como inmunógeno.²⁸

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

- **Epitopo:** son determinantes antigénicos, es decir son cada uno de los sitios discretos de una macromolécula o de un hapteno que son reconocidos individualmente por un anticuerpo específico o TCR. Son las regiones inmunológicamente activas de un inmunógeno.²⁸
- **Parátopo:** son los sitios de unión del anticuerpo con los epitopos del antígeno.²⁹
- **Adyuvante:** son sustancias que cuando se mezclan con un **Ag** y se inyectan a un animal mejoran la inmunogenicidad.²⁹
- **Anticuerpo Ab:** son moléculas inducidas por el organismo y producidas por linfocitos B (LB) ante los componentes (**Ag**) o inmunógenos presentes en cualquier elemento no reconocible (esporas, polen, virus, bacterias, hongos, protozoarios, helmintos, sustancias químicas, etcétera).²⁸⁻³⁰

6.2.1. Estructura de las Inmunoglobulinas.²⁸⁻³¹

Los anticuerpos son proteínas llamadas inmunoglobulinas (Ig). Su nombre se debe a que, durante los experimentos de electroforesis del plasma sanguíneo realizados por Kabat & Tiselius (1939), se demostró que la llamada fracción γ -globulínica de las proteínas del suero era la responsable de la actividad anticuerpo (por esta razón a los anticuerpos se les ha denominado durante mucho tiempo como γ -globulinas). Existen 5 tipos de estas biomoléculas (IgG, IgM, IgD, IgA, IgE) con diferencias estructurales y antigénicas.

La estructura básica de una Ig está constituida por 4 cadenas peptídicas, dos ligeras (214 residuos de aminoácidos) y dos pesadas (446 residuos de aminoácidos), como se muestra en la figura 4. Estudios posteriores de secuenciación de aminoácidos establecieron exactamente su conformación y estructura de la siguiente manera:

Dominios globulares plegados: son regiones de 100 – 110 aminoácidos de longitud con un puente disulfuro único que conecta dos residuos de aminoácidos dentro de la misma región. Las cadenas ligeras siempre contienen dos dominios, mientras que las pesadas poseen 4 ó 5. Las cadenas pesadas (H) tienen un peso de 50.000 Daltons (Da) cada una y las cadenas Ligeras (L) de 25.000 Da. Cada cadena L está unida a una H por un puente disulfuro y a su vez, las dos cadenas H está unidas entre sí por puentes disulfuro.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Dominio N-terminal: es el dominio globular que corresponde al extremo terminal NH_2 en cualquier cadena H o L, se denomina **región variable** VH o VL. Cada dominio VH está ubicado en un punto directamente adyacente a un dominio VL, dicho par de dominios forman un sitio de unión de antígeno; por lo tanto, cada unidad básica de 4 cadenas contiene 2 sitios de unión de antígeno separados pero idénticos (divalente).

Región constante: son los otros dominios globulares de las cadenas peptídicas denominados CH1, CH2, CH3 ó CH4 (según el número de dominios que posee la cadena H y comenzando desde el dominio más cercano a VH) y CL para la cadena ligera. Cada dominio CH1 interactúa de cerca con un dominio CL y ambos se entazan mediante un puente disulfuro. En la región CH3 se encuentran residuos de carbohidratos.

Región de bisagra: corresponde a la base de cada brazo de la Ig (conformación T o Y), localizada entre los dominios CH1 y CH2. Las Ig resultan más susceptibles a digestión proteica cerca de la región bisagra. La papaína rompe esta región, dividiendo así la Ig en tres fragmentos de tamaño similar.

Fragmentos Fab: están constituidos por los dominios VH, VL, CH1 y CL por lo que contienen los sitios de unión hacia los antígenos. Cada fragmento Fab es monovalente.

Fragmentos Fc: es el tercer fragmento de la Ig donde están incluidas las porciones carboxilo terminales de las dos cadenas pesadas, que se mantienen unidas por un doble puente disulfuro. Estos fragmentos con frecuencia cristalizan y por ello se designan **fragmentos Fc**. La mayoría de las propiedades biológicas secundarias de la Ig están determinadas por las secuencias de aminoácidos en la región Fc de la proteína. Ésta también es la región reconocida por los receptores Fc que se encuentran en muchos tipos celulares. La pepsina ocasiona una ruptura del lado carboxilo-terminal de la bisagra. Esto genera.

- Un fragmento único denominado F(ab)'_2 , el cual corresponde a dos fragmentos Fab unidos por el doble puente disulfuro. Este fragmento tiene actividad divalente hacia la unión con su antígeno.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

- La porción Fc restante es en gran medida degradada por la pepsina y generalmente no sobrevive como fragmento con propiedades funcionales intactas.

En la figura VI.2 se muestran las diferentes regiones, dominios y fragmentos antes descritos para el caso de una inmunoglobulina del tipo IgG.

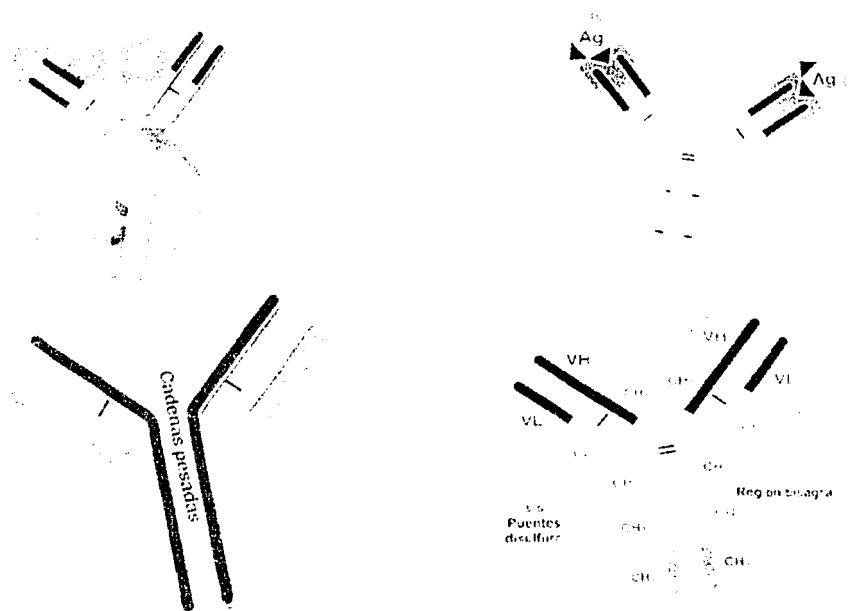


Figura VI.2. Estructura de una IgG.³⁰

6.2.2. Tipos de Inmunoglobulinas.

IgG: representa aproximadamente el 75% de las Ig séricas totales del adulto normal y es el anticuerpo más abundantemente producido en la respuesta humoral secundaria. La

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

IgG es la única Ig que puede traspasar la barrera hemato-placentaria y se encarga por tanto de la protección del neonato durante los primeros meses de vida. La IgG enlazada con su antígeno puede fijar el complemento del suero, siendo la IgG4 la única que activa complemento exclusivamente por vía alterna. Los macrófagos y algunos otros tipos celulares expresan receptores de superficie que fijan las porciones Fc de las IgG. Estos receptores interactúan principalmente con el dominio CH2 y enlazan IgG1 e IgG3 con una afinidad mucho mayor que para las otras subclases.

IgA: es la Ig predominantemente producida por Linfocitos B (LB) en placas de Peyer, amígdalas y otros tejidos linfoides submucosos, por lo que está presente en gran medida en las secreciones (saliva, lágrimas, moco intestinal, secreciones bronquiales, leche, líquido prostático, etc.). En la superficie de los LB, la IgA existe como monómero; sin embargo, en sangre o secreciones, la IgA se polimeriza para formar polímeros de hasta 5 unidades enlazadas por puente S-S y vinculadas cada una con una molécula denominada cadena J. Los tipos predominantes de IgA son dímeros y trímeros. Se han observado células con receptores Fc específicos y de gran afinidad para IgA, pero no se han caracterizado adecuadamente aún.

IgM: constituye aproximadamente 10% de las Ig en suero; normalmente es secretada como un pentámero con cadenas de unión J. Este anticuerpo predomina en respuestas inmunitarias primarias tempranas. Es la Ig más común que se expresa en los LB y también es la más eficaz (10 sitios de fijación a antígenos en estado secretorio). Existen receptores Fc específicos para IgM, pero no se han caracterizado.

IgD: es una unidad monomérica de cuatro cadenas y se encuentra generalmente en la superficie de los LB (que también tienen IgM e IgA), aunque pocas veces se secretan cantidades significativas en condiciones normales, hallándose rastros de ella sólo en sangre. La IgD en los LB puede fijar antígenos y transmitir señales intracelulares con similares consecuencias a la IgM. Al activarse el LB, cesa la expresión de IgD de superficie. Hay informes aislados sobre la actividad de la IgD contra insulina, penicilina, proteínas lácteas, toxoide diftérico, componentes nucleares o antígenos tiroideos, pero aún se desconoce la completa función biológica de esta Ig.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

IgE: aunque representa normalmente una pequeña fracción de las Ig (0,004%), tiene importancia extrema desde el punto de vista clínico debido a su participación central en los trastornos alérgicos. Dos tipos especializados de células inflamatorias (mastocito y basófilo) tienen un receptor Fc altamente específico para IgE, por lo que a pesar de su escasa presencia en sangre y líquidos corporales, las superficies de estas células presentan anticuerpos IgE absorbidos de la sangre que actúan como receptores de antígenos. Cuando las moléculas IgE enlazadas de modo pasivo entran en contacto con un antígeno, el mastocito o basófilo degranula liberando mediadores de respuesta inflamatoria. Los valores de IgE aumentados en suero también pueden significar infección por helmintos u otro tipo de parásitos multicelulares.

En la figura VI.3, se presentan algunas propiedades y representaciones esquemáticas de las distintas Igs.



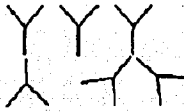


	IgG	IgM	IgA	IgE	IgD
Estructura					
Valencia	2	10	2,4 ó 6	2	2
Concentración	8-16 mg/mL	0.5-2 mg/mL	1-4 mg/mL	1-400 ng/mL	0-0.4 mg/mL
Función	Respuesta secundaria	Respuesta primaria	Protección membranas y mucosas	Protección parásitos	--

Figura VI.3. Representación esquemática y comparativa de las Igs.³⁰

6.2.3. Características fisicoquímicas de la interacción Ag-Ab.

La unión Ag-Ab es una interacción reversible en la que sólo intervienen enlaces no-covalentes entre el epitopo del Ag y los parátomos del Ab.

TESIS CON
 FALLA DE ORIGEN

Las fuerzas de atracción en los enlaces no covalentes están relacionados con el inverso de la distancia entre los grupos químicos implicados. Estas fuerzas son de 4 tipos:

- Puentes de hidrógeno.
- Fuerzas electrostáticas.
- Fuerzas de van der Waals .
- Efectos hidrofóbicos.

La clave de la unión está en la **complementariedad entre Ag y Ab**; si ésta es buena, se produce la exclusión de agua, lo que permite un acercamiento estrecho entre el epítipo y parátipo, dando lugar a un complejo estable

6.2.3.1. Afinidad.

La afinidad de un anticuerpo particular (por ejemplo, un anticuerpo monoclonal) por un epítipo es la suma de todas las fuerzas atractivas y repulsivas entre un sitio de unión de ese anticuerpo y el correspondiente epítipo. Ello se puede definir a través de la correspondiente constante de equilibrio (K), según la ley de acción de masas:

$$K = \frac{[Ab-H]}{[Ab] \cdot [H]}$$

siendo $[Ab]$ la concentración de sitios libres del Ab, $[H]$ la concentración de epítopos no unidos al anticuerpo y $[Ab-H]$ la concentración de sitios ocupados del Ab. La determinación de la constante de afinidad se puede llevar a cabo por métodos espectrofotométricos o mediante experimentos de diálisis.

6.2.3.2. Avidéz

Es la fuerza con la que el Ab multivalente se une a un Ag multivalente. Aunque depende de las afinidades de cada uno de los determinantes individuales de ese antígeno, su valor es mucho mayor que la suma de afinidades.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Por otro lado, hay que considerar que los Ag naturales suelen tener más de un tipo de determinante antigénico. Cuando un antígeno de esta clase entra en un individuo, éste produce un antisuero que presenta varios tipos de anticuerpos, cada uno de ellos dirigido a un tipo diferente de determinante antigénico del Ag original. En este caso se habla de **avidez del antisuero**, que es la fuerza conjunta de los distintos anticuerpos de ese antisuero que reconocen al antígeno multivalente complejo:

$n \text{ Ab} + m \text{ Ag} \rightarrow \{ \text{Abn Agm} \}$ donde n representa la heterogeneidad del anticuerpo y m los distintos tipos de epitopos del antígeno.

Los factores que contribuyen a la avidez del antisuero son complejos, pero uno muy interesante es el derivado de la multivalencia del antígeno. La fuerza de unión de un antígeno complejo multivalente a varios tipos de Ab es mucho mayor que la suma aritmética de las fuerzas de unión a cada anticuerpo

La avidez refleja mejor la situación fisiológica, pero la afinidad caracteriza lo que ocurre con cada anticuerpo particular en su interacción con el epítipo.

Existen indicios de que durante la maduración de la respuesta humoral de producción de anticuerpos se produce no sólo una selección de anticuerpos con mayor afinidad (selección termodinámica), sino con mayor rapidez (selección cinética).

Por otra parte, puede darse el caso de que una molécula de anticuerpo presente sitios de unión polifuncionales que puedan ser complementarios de varios determinantes antigénicos distintos. En este caso, la unión de cada epítipo al anticuerpo es competitiva, aunque existen lugares distintos para cada epítipo dentro del parátipo del anticuerpo.

6.2.4. Reactividad cruzada.^{28, 32-34}

Los anticuerpos pueden ser monoclonales, policlonales o recombinantes y el empleo de cada uno de ellos depende de la finalidad del análisis. Si se requiere determinar sólo a una sustancia es conveniente el empleo de anticuerpos monoclonales, por otro lado si el

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

objetivo es determinar una familia de compuestos de estructura similar lo más conveniente es la utilización de policlonales. La razón de lo anterior es debida a una característica denominada **reactividad cruzada**, la cual puede explicarse como sigue: así como algunos anticuerpos se enlazan muy fuerte y otros más débilmente al mismo antígeno (lo cual depende de los distintos tipos de enlace que se forman), es posible que un anticuerpo tenga la capacidad de unirse no sólo al antígeno que originó su formación, sino también con moléculas que contengan regiones que se asemejen al epitopo.

Los antígenos enlazados por reactividad cruzada poseen algunas de las características, pero no todas, que originaron la fijación estrecha del anticuerpo con su antígeno original: por lo tanto los anticuerpos tienen mayor afinidad por su antígeno original que por uno de reacción cruzada. Esta característica se ejemplifica en la figura VI.6.

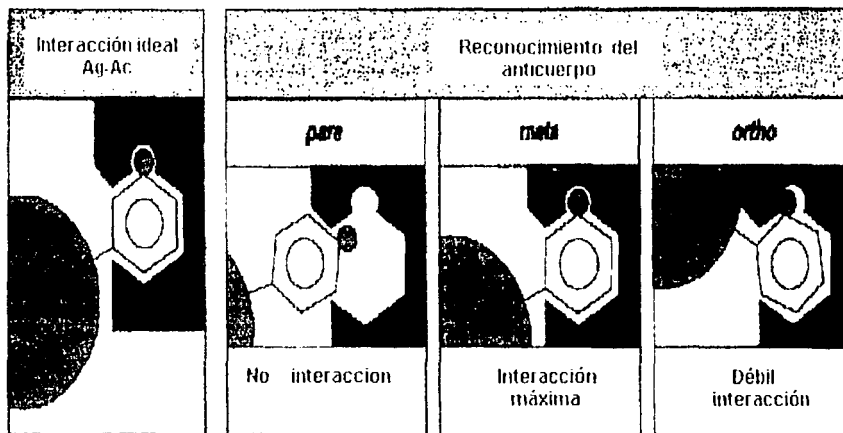


Figura VI.4. Especificidad de un anticuerpo y reactividad cruzada.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

6.2.5. Consideraciones en la producción de anticuerpos.^{9, 27, 35-38}

En la última década se ha despertado un gran interés por el desarrollo y aplicación de IAs en análisis ambientales, particularmente en matrices acuosas o de alimentos que contienen pesticidas. Sin embargo, para la síntesis y purificación de anticuerpos para este tipo de sustancias es necesario en primer lugar tener un buen protocolo de inmunización que lleva consigo lo siguiente:

- Preparación del inmunógeno: Hapteno (pesticida) + molécula acarreadora (proteína BSA o hemocianina).
- Inmunizaciones con adyuvantes.
- Controlar el número de inmunizaciones en el animal huésped para no provocar una nula respuesta o resistencia.

En segundo lugar, para la caracterización y purificación de los anticuerpos una vez obtenida la respuesta inmunológica deben realizarse los siguientes pasos:

- Separación de las inmunoglobulinas (IgG).
- Purificación de IgGs.
- Caracterización de IgGs activas contra el hapteno (medición de actividad y titulación).
- Preservación de IgGs en solución o liofilizadas.

Mediante el procedimiento descrito se obtienen anticuerpos policlonales.

La clonación de células productoras de anticuerpos con células tumorales para formar hibridomas permite obtener anticuerpos monoclonales, cuyas características homogéneas tienen nula o limitada reactividad cruzada. Así mediante esta tecnología es posible producir un número ilimitado de anticuerpos con propiedades uniformes, los cuales generalmente son empleados sin purificar (ascites). Sin embargo, se ha reportado que el uso de estos anticuerpos para la inmunoestracción de moléculas pequeñas (como la mayoría de los pesticidas) no mejora significativamente la sensibilidad o selectividad logradas con anticuerpos policlonales.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

El reciente desarrollo de la tecnología recombinante abre una nueva e interesante vía para la producción de anticuerpos ya que permite modificar sus propiedades a nivel del ADN en los microorganismos productores (*E. coli* o levaduras). Esto hará posible la obtención rápida de anticuerpos con las propiedades deseadas, sin la necesidad de la inmunización de un ser vivo inmunológicamente competente.

6.3. PREPARACIÓN DE IAs PARA ANÁLISIS AMBIENTAL.

El primer paso para la preparación de un IA es la selección de un soporte adecuado para la inmovilización química (por enlaces covalentes) o física (por adsorción o por encapsulamiento) de los anticuerpos previamente obtenidos y, en su caso, purificados. El soporte debe presentar las siguientes características:

- Rígido y macroporoso.
- Química y físicamente estable.
- Poseer grupos funcionales adecuados para el enlace covalente al anticuerpo o ser de fácil derivatización (sólo en el caso de la inmovilización química)
- Ser hidrofílico para minimizar la adsorción no específica.

6.3.1. Métodos Químicos.^{3, 7, 8, 12, 25, 39-41}

El soporte elegido para el anclaje generalmente es una sílice modificada (sílice aldehído). El anclaje de los anticuerpos podrá ser realizado de dos distintas maneras, una es vía los grupos amino residuales del anticuerpo y la otra es vía los grupos hidroxilo oxidados procedentes de los residuos de carbohidratos. Estos procesos se ilustran en las figuras VI.5 y VI.6. las ventajas y desventajas de cada uno se comparan en la tabla VI.1.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Tabla VI.1. Ventajas y desventajas de los métodos para el anclaje de anticuerpos.

Metodología	Ventajas	Desventajas
<p>Vía grupos amino Residuales.</p> <p>Método 1. Formación de enlace imino.</p>	<ul style="list-style-type: none"> Menor manipulación de los anticuerpos. Mejor preservación de la actividad del anticuerpo. 	<ul style="list-style-type: none"> Mayor probabilidad de inadecuada orientación del anticuerpo.
<p>Vía grupos hidroxilo oxidados.</p> <p>Método 2. Formación de enlace hidrazona.</p>	<ul style="list-style-type: none"> Anclaje con orientación selectiva del anticuerpo. Buen porcentaje de inmovilización. Aumento de la interacción antígeno-anticuerpo, que depende de la complejidad del antígeno. 	<ul style="list-style-type: none"> Mayor manipulación que trae consigo pérdida de actividad y requerimiento de una mayor cantidad de anticuerpo inicial.

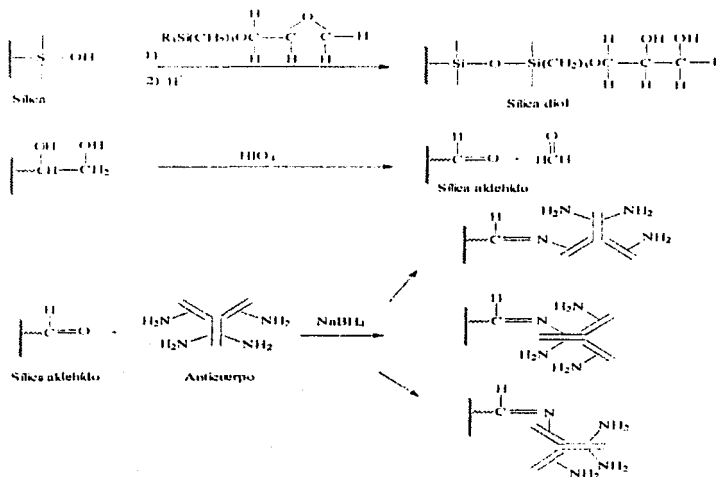


Figura VI.5. Reacción de anclaje de anticuerpos método 1.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

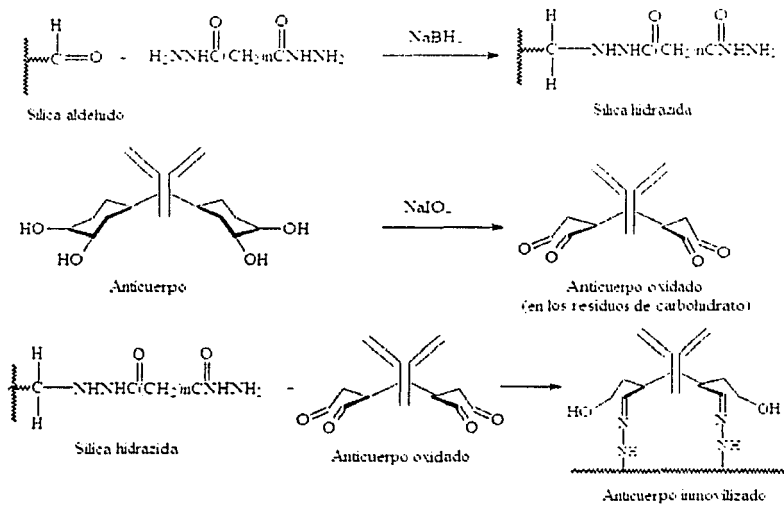


Figura VI.6. Reacción de anclaje del anticuerpo por el método 2.

6.3.2. Métodos físicos (Encapsulamiento en sol-gel),²¹⁻²⁴

Dentro de los métodos físicos para la preparación de biomateriales, el encapsulamiento en sol-gel es el más interesante y ha sido experimentalmente explorado en los últimos años para la inmovilización de diversas biomoléculas tales como enzimas, anticuerpos, ARN entre otros.^{15-24, 42-46}

El proceso de sol-gel empleado en la producción de materiales cerámicos y cristalinos, se basa en la propiedad que tienen ciertos precursores hidrolíticamente lábiles para formar óxidos metálicos sólidos cuando se ponen en contacto con un medio acuoso. Ciertas modificaciones en el proceso sol-gel han permitido en los últimos años la incorporación de material biológico (proteínas, enzimas, anticuerpos, células vivas, etc.) en

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

el interior de los poros de matrices de sílice, preservando sus propiedades estructurales y su actividad biológica. El material biológico inmovilizado puede posteriormente interactuar con alto grado de especificidad con diferentes iones y moléculas presentes en el medio externo, ya que éstas pueden difundir a través de la estructura porosa del gel. Así las condiciones no agresivas (medio acuoso y temperatura ambiente) del proceso de sol-gel y las propiedades del material resultante han permitido aprovechar las ventajas de elevada sensibilidad y especificidad de ciertos procesos bioquímicos. Además, la flexibilidad en el procesado que permite el método de preparación sol-gel (geles monolíticos, láminas delgadas, polvos granulados o fibras) facilita diversas aplicaciones en biocatálisis, bioimplantes y biosensores, así como en diagnóstico médica, o bioremediación.^{39, 40, 47}

Sin embargo, para asegurar un alto rendimiento en la aplicación escogida hay que adaptar las condiciones de preparación a las características de la biomolécula a encapsular buscando una optimización en la estabilidad y funcionalidad de la misma así como en las prestaciones de la matriz soporte (propiedades ópticas, porosidad, rigidez, etc.). Dentro de las ventajas que el método sol-gel ofrece, una muy importante es el control químico, desde sus estados iniciales, de las propiedades superficiales y morfológicas de los materiales finales obtenidos.

Los soles se describen como sistemas dispersos de dos fases donde el medio dispersante es un líquido y la fase dispersa un coloide. El coloide se define como partículas con diámetro de 10-100 Å, el cual corresponde a moléculas conformadas por 10^3 - 10^9 átomos. Dependiendo de la metodología de síntesis, las partículas en solución pueden tener varias estructuras y formas, otorgándole a las soluciones coloidales propiedades diferentes.⁴⁸

Los soles minerales, incluyendo la sílice, pueden ser preparados básicamente por dos procedimientos:

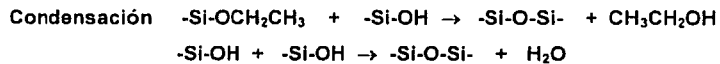
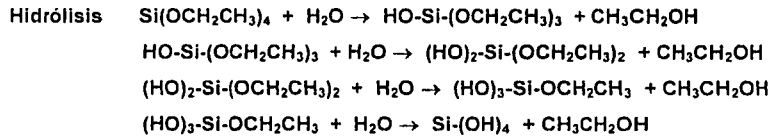
- Dispersión de partículas sólidas, las cuales son obtenidas por precipitación.
- Uso de reacciones químicas, principalmente por aglomeración molecular, tales como la hidrólisis y condensación de un alcóxido metálico.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Los alcóxidos son compuestos que poseen un grupo alquilo unido a un oxígeno, que a su vez está enlazado con un elemento metálico. Estas sustancias son muy reactivas debido a la electronegatividad que presenta el grupo alcoxi, extremadamente susceptible a la hidrólisis aún con la humedad de la atmósfera, y requieren de especial cuidado ya que reaccionan con los protones de un gran grupo de compuestos hidroxil-orgánicos como alcoholes, glicoles, ácidos carboxílicos etc. El sol puede ser desestabilizado evaporando el disolvente o incrementando la concentración del coloide, dando como resultado un material denominado gel. La gelación se refiere a la solidificación de la solución que cambia del estado líquido (sol) a un estado sólido (gel), el proceso por ello se conoce como sol-gel.

Los mecanismos mediante los cuales tienen lugar la hidrólisis y condensación son los siguientes (considerando el caso particular de los alcóxidos de silicio):

- La hidrólisis se efectúa cuando el disolvente generalmente agua o etanol es mezclado con el alcóxido en medio ácido o básico.
- La condensación ocurre entre los grupos silanol y los grupos alcoxi o entre silanoles dando lugar a siloxanos. En el caso del precursor TEOS (tetraetoxisilano), las reacciones son:



Las reacciones de hidrólisis y condensación ocurren casi de manera simultánea y por lo general no se llega a la formación del ácido ortosilícico. Los parámetros de mayor importancia para estos procesos son:

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

- Temperatura de reacción
- Naturaleza y concentración del catalizador (ácido o básico).
- Naturaleza y concentración del disolvente (etanol, agua)
- Naturaleza de los precursores alcóxidos (por ejemplo tetralcoxisilanos y alquilalcóxidos, en el caso de la sílice).

La velocidad de hidrólisis se ve incrementada con la concentración de protones, mientras que la reacción de condensación es más favorable en medios básicos, dando por resultado que el pH tiene influencia marcada en el tiempo de gelación. La variación de este tiempo de gelación cambia las características de viscosidad, textura y porosidad del gel. El mecanismo de reacción en medio ácido y básico se ilustra en la figura VI.7.

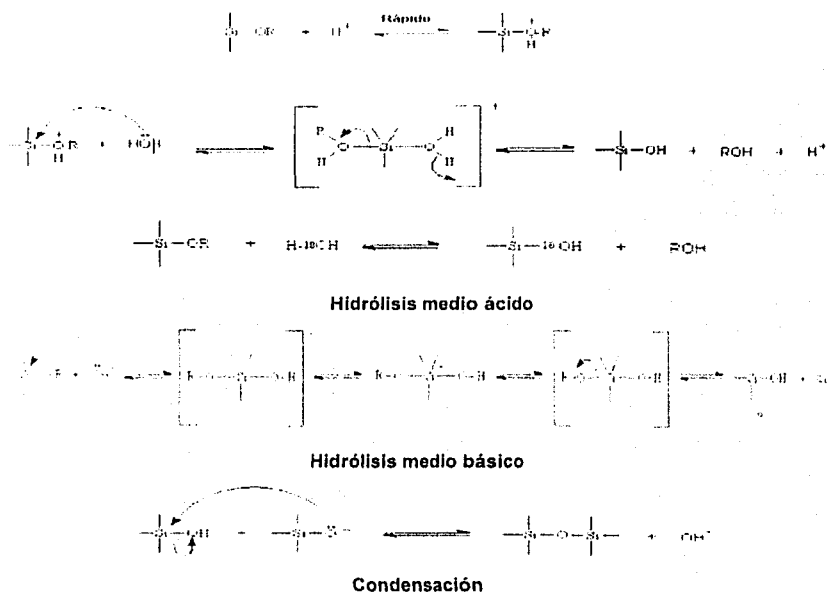


Figura VI.7. Mecanismo de reacción de la hidrólisis (ácida y básica) y de la condensación en la formación del gel.⁴⁸

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

El tiempo de gelificación puede definirse como el tiempo en el cual la superficie del gel no se deforma por la aplicación de una fuerza, es decir la viscosidad del sol aumenta hasta la obtención del gel que es una red rígida y porosa. Este parámetro no es una propiedad intrínseca del sol y depende de un gran número de factores experimentales, desde aquellos principales como las relaciones molares de los diferentes reactivos, el pH, la presencia de sales en la reacción, etc., hasta factores secundarios como el tamaño y forma del recipiente de reacción.

Los anticuerpos se inmovilizan físicamente dentro de los poros de este gel, la etapa en la cual estas biomoléculas son agregadas a la solución del alcóxido es variable. La forma como los anticuerpos quedan atrapados en la red de la matriz se ilustra en la figura VI.8.

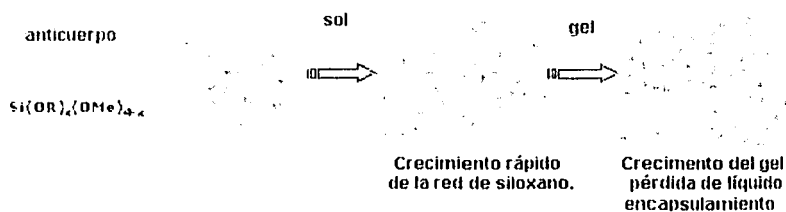


Figura VI.8. Inmovilización física de anticuerpos en una matriz de sílica.⁴⁹

6.3.3. Ventajas en el uso de IAs.^{2-8, 37, 50, 51}

Los IAs son de las últimas innovaciones tecnológicas dentro del análisis químico, inmunológico, microbiológico, bromatológico, ambiental, entre otros. Con respecto a otros materiales utilizados en EFS, estos biomateriales presentan las siguientes ventajas:

- Adsorción selectiva y específica
- Desorción rápida y reversible con empleo de eluyentes baratos (soluciones buffer, cambio de pH, empleo de una pequeña cantidad de disolvente orgánico).
- Menor demanda sobre las capacidades y características del equipo analítico.
- Menor manipulación de la muestra.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

6.4. PESTICIDAS.⁵²

Los pesticidas o plaguicidas son sustancias químicas destinadas a matar, repeler, atraer, regular o interrumpir el crecimiento de plagas en su sentido más amplio. Consideramos plaga aquellos organismos nocivos que transmiten enfermedades, compiten por alimentos y/o dañan bienes económicos. El uso de pesticidas se masificó a partir de la segunda guerra mundial y está estrechamente vinculado con los cambios introducidos en los modelos de producción y cultivo que duplicaron la productividad de la agricultura respecto al resto de la economía.

El artículo 2º del Código Internacional de conducta para la Distribución y Utilización de Plaguicidas (FAO 2000), define a los plaguicidas como cualquier sustancia o mezcla de sustancias destinadas a prevenir, destruir o controlar cualquier plaga, incluyendo los vectores de las enfermedades humanas o de los animales, las especies no deseadas de plantas o animales que causen perjuicio o que interfieran de cualquier otra forma en la producción, elaboración, almacenamiento, transporte o comercialización de alimentos, productos agrícolas, madera, productos de madera o alimentos para animales, o que pueden administrarse a los animales para combatir insectos, arácnidos u otras plagas en o sobre sus cuerpos. El término incluye las sustancias destinadas a utilizarse como reguladores del crecimiento de las plantas, desfoliantes, desecantes, agentes para reducir la densidad de fruta o agentes para evitar la caída prematura de la fruta y de las sustancias aplicadas a los cultivos, antes o después de la cosecha, para proteger el producto contra el deterioro durante el almacenamiento y transporte.⁵³

Los plaguicidas pueden clasificarse de diversas formas: sobre el tipo de organismos que controlan, en su modo de acción, en su composición química, por la forma de presentación de sus formulaciones comerciales ó sobre el uso al que se destinan. Se clasifican sobre el tipo de organismos que controlan en: **Insecticidas** (insectos), **Fungicidas** (hongos), **Herbicidas** (malezas o plantas nocivas), **Acaricidas** (ácaros), **Rodenticidas** (roedores) **Moluscocidas** (caracoles), **Nematicidas** (nemátodos) y **Antibióticos de uso agrícola**; por otro lado, según su modo de acción se pueden clasificar en **sistémicos** y **no sistémicos**. Los **sistémicos** se absorben en las partes vegetativas de la planta y se

TESIS ORIGINAL
FALLA DE ORIGEN

incorporan a la savia, transportándose con ella y metabolizándose en parte de la misma, su acción química la ejercen sobre insectos chupadores, hongos y ácaros al alimentarse de la planta; en tanto que los **no sistémicos** no se absorben por las partes vegetativas, su acción la ejercen sobre las plagas sea por contacto o por ingestión.⁵¹ Por otro lado la clasificación química de tales sustancias los engloba en familias de acuerdo a grupos funcionales ó con base a determinados elementos químicos presentes, de esta manera podemos encontrar a la familia de las triazinas (atrazina, simazina, propazina, prometón, prometina, etc.), la familia de los ácidos fenoxiacéticos (2,4-diclorofenoxiacético 2,4-diclorofenoxibutírico, 2,4,5-tricloroacético, entre otros), la familia de los organofosforados (malatión, metilparatión entre muchos otros), la familia de los organoclorados (por ejemplo DDT), la familia de las fenilureas (clortoluron, fluometurón, diurón, neburón, etc.), la familia de los carbamatos (por ejemplo metiocarb).⁵⁵

Aunque el número de plaguicidas es muy elevado, la utilización más abundante suele estar asociada a un pequeño número de productos. En un estudio reciente (2002) efectuado en las provincias agrícolas occidentales del Canadá, donde se utilizan habitualmente unos 50 plaguicidas, el 95 por ciento del total de la aplicación de éstos correspondió a nueve herbicidas concretos, entre los cuales se encuentra el ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), atrazina, simazina, clortolurón, entre otros. Los efectos en el medio ambiente, la salud pública y calidad del agua debidos a una utilización inadecuada y excesiva de plaguicidas están ampliamente documentados. Los efectos de los plaguicidas en la calidad del agua están asociados a los siguientes factores:

- Principio activo en la formulación de los plaguicidas.
- Contaminantes que existen como impurezas en el principio activo.
- Aditivos que se mezclan en la formulación (humectantes, diluyentes o solventes, aprestos, adhesivos, soluciones reguladoras, conservadores y emulsionantes).
- Producto degradado que se forma durante la descomposición química, microbiana o fotoquímica del principio activo o sus excipientes.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

6.4.1. Factores que influyen en la toxicidad de los plaguicidas en los sistemas acuáticos.⁵⁶⁻⁵⁷

Los efectos ecológicos de los plaguicidas en el agua están determinados por los siguientes criterios:

Toxicidad: Toxicidad para mamíferos y no mamíferos, expresada en forma de DL₅₀ ("Dosis letal": concentración del plaguicida que provoca la muerte de la mitad de los organismos de prueba durante un periodo especificado de prueba). Cuanto más baja es la DL₅₀, mayor es la toxicidad; **los valores de hasta 20 mg/Kg de peso son extremadamente tóxicos**

Las directrices sobre los alimentos y el agua potable se determinan utilizando una evaluación basada en el riesgo. Por lo general, riesgo = exposición (cantidad y/o duración) x toxicidad.

La respuesta tóxica (efecto) puede ser **aguda** (muerte) o **crónica** (efecto que quizá no provoque la muerte durante el periodo de prueba pero cause en el organismo sometido a prueba efectos observables, como cánceres y tumores, deficiencias reproductivas, inhibición del crecimiento, efectos teratogénicos, etc.).

Persistencia: Medida en términos de vida-media (tiempo necesario para que la concentración ambiental disminuya un 50 por ciento). La persistencia está determinada por procesos bióticos y abióticos de degradación. Los procesos bióticos son la biodegradación y el metabolismo; los procesos abióticos son fundamentalmente la hidrólisis, fotólisis y oxidación. Los plaguicidas modernos suelen tener tiempos de vida media muy breves, que reflejan el periodo durante el cual la plaga debe ser controlada.

Productos degradados: El proceso de degradación puede llevar a la formación de "productos degradados", cuya toxicidad puede ser mayor, igual o menor que la del compuesto original. Por ejemplo, el DDT se degrada en DDD y DDE que son más persistentes, por otro lado, el malatión puede formar un metabolito más tóxico el oxomalatión.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Destino (ambiental): El destino ambiental de un plaguicida depende de la afinidad natural del producto químico por de uno de los cuatro compartimentos ambientales: materia sólida (materia mineral y carbono orgánico en partículas), líquido (solubilidad en aguas superficiales y aguas del suelo), fase gaseosa (volatilización) y biota. Este comportamiento recibe con frecuencia el nombre de "compartimentación" y depende respectivamente de los siguientes parámetros: **coeficiente de absorción** al suelo (K_{so}) que depende del porcentaje de materia orgánica (sin embargo es más adecuado el uso del **coeficiente de carbono orgánico** (K_{oc}) el cual corrige el valor de K_{so} a un contenido constante de carbono orgánico), **solubilidad**, **constante de Henry** (H) y **coeficiente de reparto** n-octanol/agua (P_{ow}).

En México, el monitoreo de la gran diversidad de sustancias clasificadas como contaminantes ha sido hasta el momento insuficiente, particularmente en lo que se refiere a los contaminantes orgánicos en las aguas naturales (ríos, lagos, mares y acuíferos) como es el caso de los pesticidas. El problema tiene su origen en la dificultad de recolectar, preservar y transportar las muestras desde regiones remotas hasta los centros urbanos donde se encuentran los laboratorios de análisis y en la dificultad propia (y costo) de los análisis, que involucran la determinación de sustancias a muy baja concentración (del orden de las ppb), en matrices bastante complejas. En nuestro país, la calidad del agua está principalmente a cargo de la Comisión Nacional del Agua (CNA) y de la Secretaría del Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT). Los controles realizados se han limitado a análisis rutinarios tales como conductividad, pH, cloruros, dureza, alcalinidad, sulfatos, sólidos disueltos, demanda química de oxígeno (DQO), demanda bioquímica de oxígeno (DBO), determinaciones microbiológicas y en algunos casos compuestos inorgánicos tóxicos (Cu, Cr, Cd, Zn, Hg, Pb, Ni, As) y contaminantes orgánicos entre los que se encuentran las dioxinas, furanos, bencidinas y policlorobifenilos. De esta forma, los pesticidas no son determinados de manera rutinaria y aunque se encuentran regularmente en concentraciones traza representan un riesgo potencial debido a su toxicidad. De lo anterior, se deriva que es absoluta y primordialmente necesario desarrollar técnicas analíticas rápidas, selectivas, baratas, reproducibles y repetibles para este tipo de compuestos.

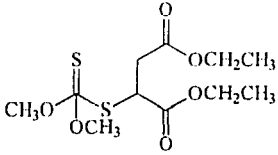
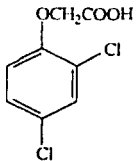
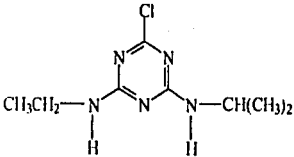
TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

6.5. PROPIEDADES DE LOS PESTICIDAS EN ESTUDIO (HAPTENOS BLANCO).

6.5.1. Propiedades químicas.^{53, 67-69}

Las propiedades químicas de los plaguicidas en estudio se resumen en la tabla VI.2.

Tabla VI.2. Propiedades químicas de los plaguicidas analizados en el estudio.

PLAGUICIDA	PROPIEDADES
 <p>Malatión S-[1,2-bis-(etoxi-carbonil)-etil] -O,O-dimetil-ditiofosfato</p>	<ul style="list-style-type: none"> • P.M. 330.6 g/mol • δ_{25} 1.23 g/ml • P. E. 156-157 °C • Solubilidad en agua 125 mg/l • Pesticida de contacto (insecticida y acaricida). • Presión de vapor intermedia. • Máximo absorción 215 nm. • DL₅₀ 1 260 mg/kg, oral en ratas • t_{1/2} 24 hrs secretado en orina • t_{1/2} 11 días en agua pH=7.4 20°C
 <p>2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético)</p>	<ul style="list-style-type: none"> • P.M. 221 g/mol • pKa 2.64 • Se presenta comercialmente como sales sódicas agregándole EDTA (estabilizante). • Punto de fusión 140.5 °C • Baja tensión de vapor • Solubilidad en agua 3.5 g/l (como sal) • Máximo de absorción UV 235 y 280 nm • Herbicida inhibidor de auxinas.
 <p>Atrazina 2-cloro-4-etilamino-6-isopropilamino-1,3,5-triazina</p>	<ul style="list-style-type: none"> • P.M. 215.7 g/mol • Punto de fusión 173-175 °C • Solubilidad en agua 70 mg/l • Solubilidad en metanol 18g/l • Inestable a pH muy ácido o muy básico. • DL₅₀ 1 760 mg/kg, oral en ratón. • Herbicida selectivo, controlador de malezas en el maíz, espárragos, cultivo de caña de azúcar, viñedos • Inhibidor fotosintético

TRIPULACION
FALLA DE ORIGEN

ANÁLOGOS ESTRUCTURALES DE LOS HAPTENOS BLANCO.

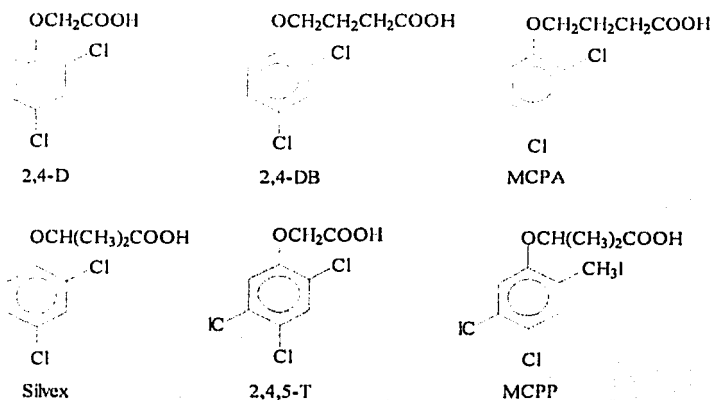


Figura VI.9. Estructuras de los herbicidas de la familia clorofenoxi.

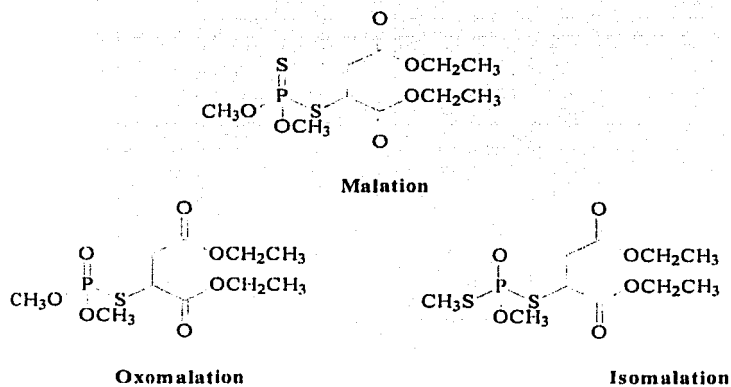


Figura VI.10. Estructuras de los Insecticidas análogos al malatión.

TESIS CON
 FALLA DE ORIGEN

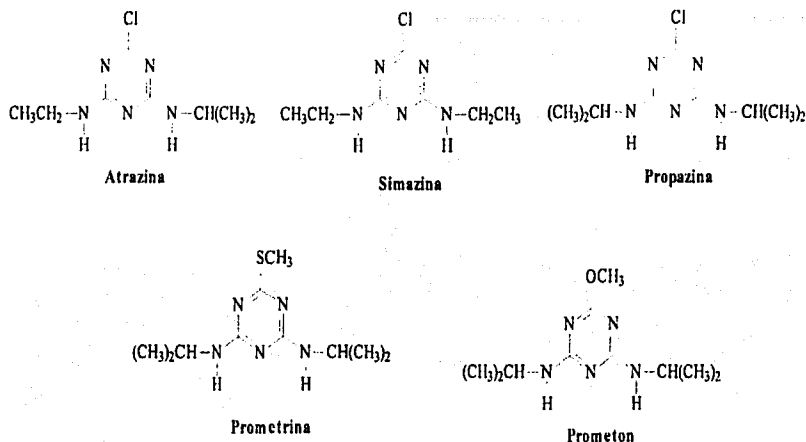


Figura VI.11. Estructura de los herbicidas de la familia de las triazinas.

6.5.2. Reacciones químicas de degradación de pesticidas.

Los pesticidas pueden sufrir tres tipos principales de degradación: microbiológica, química y fotoquímica. La degradación por microorganismos la realizan hongos y bacterias que se encuentran en el suelo o son parte de la biota acuática. La degradación química ocurre por influencia de la temperatura o por defensa contra las plagas mediante descomposición enzimática. La fotodegradación ocurre cuando los pesticidas no son adsorbidos por la plaga o plantas y quedan expuestos a la luz del sol en el suelo o en las fuentes de agua.

6.5.2.1. Herbicidas clorofenoxi (2,4-D).⁶⁰

Los herbicidas derivados del grupo clorofenoxi son en general muy estables en el medio ambiente, por lo tanto presentan difícil degradación. Las reacciones importantes son las típicas del grupo éter presente en la molécula (hidrólisis y oxidación generalmente) y las relacionadas con la presencia de un halógeno, el cloro, que en determinadas condiciones puede presentarse la descloronación por bacterias en la matriz acuosa. Por otra parte, la

TEC CON
FALLA DE ORIGEN

presencia en la molécula de un grupo ácido permite realizar una reacción de metilación con diazometano; tal derivado es utilizado con fines prácticos para efectuar el análisis por CG (cromatografía de gases) con detección DCE (detector de captura de electrones).²⁶ Si tal derivado no es preparado, el análisis se lleva a cabo por CLAR de fase reversa con detector UV, debido a que los ácidos fenoxiacéticos son muy polares e inestables térmicamente.²⁷ La degradación enzimática del 2,4-D la realizan enterobacterias del género de las *Pseudomonas*, lo cual se ilustra en la figura VI.12.⁶⁰

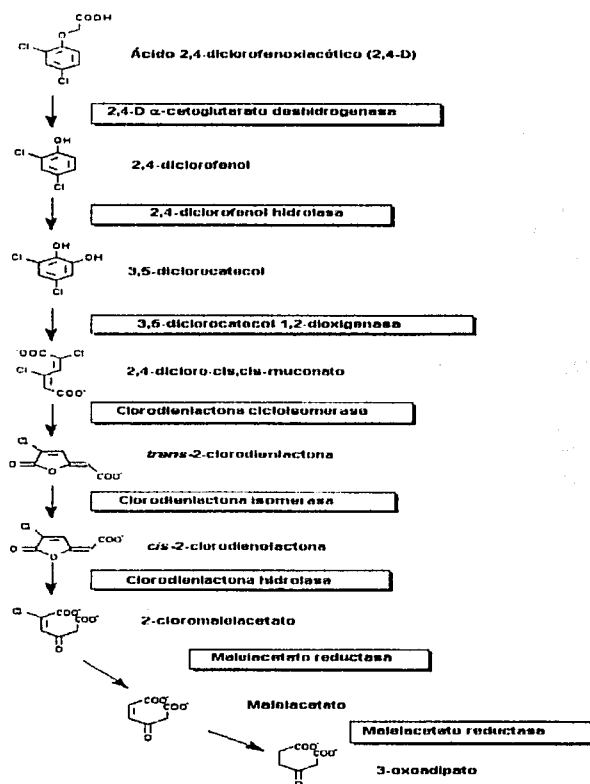
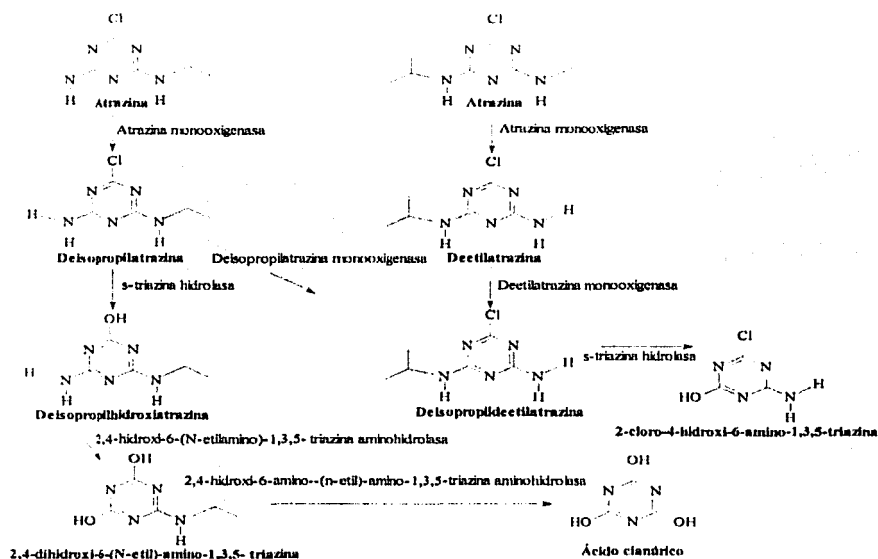


Figura VI.12. Degradación enzimática del 2,4-D.⁶⁰

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

6.5.2.2. Herbicidas triazinas (atrazina).

Las triazinas se caracterizan por su relativamente alta resistencia a la transformación físico-química. Además, su baja solubilidad en agua y la baja presión de vapor indican una movilidad reducida. La atrazina puede ser químicamente hidrolizada formando la hidroxiatrazina que es inactiva y que puede, a su vez, ser degradada por los microorganismos. El tiempo de vida media depende en gran medida del pH del suelo. En un suelo neutral, ligeramente alcalino o en un ambiente ligeramente ácido, la atrazina es estable (tiempo de vida media con un pH 7-9: 3 meses). La hidrólisis se produce principalmente en condiciones alcalinas o ácidas (tiempo de vida media con pH 3 o pH 11 = 10 días). Los herbicidas de la familia de las triazinas son degradados por bacterias del género *Pseudomonas*, *Agrobacterium*, *Alcaligenes*, *Rhodococcus*, y por hongos del género *Streptomyces*. La degradación enzimática de la atrazina se presenta en la figura VI.13.⁶⁰

Figura VI.13. Degradación enzimática de atrazina.⁶⁰

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

6.5.2.3. Pesticidas organofosforados (malatión).

En el cuerpo de los animales el malatión se degrada dentro de las primeras 24 horas y es expulsado por vía urinaria (OMS, 1983). El tiempo medio para la descomposición química en el agua (pH = 7,4 a 20°C) es de unos 11 días y depende del pH (hidrólisis lenta con pH<7 y más acelerada con pH>7). En el organismo de los insectos, el malatión se oxida formando malaoxón u oxomalatión. De la hidrólisis resultan, además, derivados del ácido succínico y de otros ácidos carboxílicos, así como ácido fosfórico y O,O-dimetiltiofosfórico. El malatión se degrada rápidamente in vitro por actividad de bacterias del género *Flavobacterium* formando ácido malatión monocarboxílico, ácido malatión dicarboxílico y diversos fosfotionatos como resultado de la descomposición por la carboxilesterasa. Además, la actividad de la fosfatasa produce desmetil malatión, fosfomonotioatos y fosfoditioatos, ácidos fosfóricos y los etilésteres correspondientes. Un mecanismo de descomposición del malatión es expuesto en la figura VI.14.⁵⁸

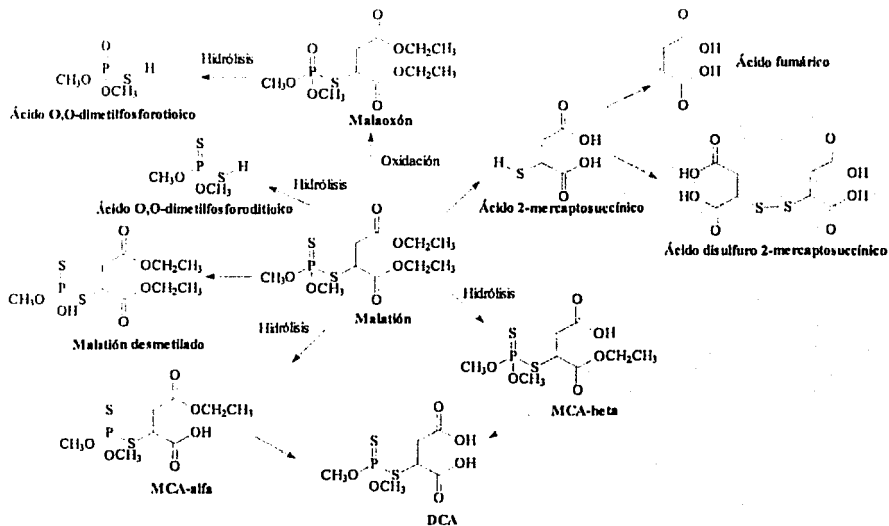


Figura VI.14. Degradación in vivo del malatión.⁵⁸

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

6.5.3. Mecanismos de acción y toxicología de pesticidas.⁵³⁻⁵⁹

6.5.3.1. 2,4-D.

Los herbicidas como el 2,4-D son formulados con agentes tensoactivos, lo cual representa ciertas ventajas entre las cuales está la reducción de la dosis para disminuir efectos de contaminación y costos. El uso irracional de este tipo de herbicidas provoca efectos irreversibles tanto a la planta parásita como al huésped, lo que ocasiona pérdidas enormes. El mecanismo tóxico es debido a la inhibición en la producción de auxinas (hormonas del crecimiento) y la inhibición de la duplicación del DNA en las plantas, lo que influye de modo indirecto sobre la síntesis de enzimas. En general matan a las especies de hoja ancha y no dañan a las de hoja angosta (gramíneas, ciperáceas, liliáceas entre otras). La selectividad es fundamentalmente de tipo bioquímico y depende además del estado de desarrollo de la planta y de la concentración o dosis del herbicida. Las formas éster son más tóxicas y el aumento de temperatura las vuelve más peligrosas. El DL₅₀ en seres humanos es de 80 mg/Kg.

6.5.3.2. Malatión

Los plaguicidas organofosforados son inhibidores de la enzima acetilcolinesterasa. Esta enzima cataliza la hidrólisis del neurotransmisor acetilcolina, que se genera en las células nerviosas, hasta colina. En la ausencia de acetilcolinesterasa, el neurotransmisor se acumula e impide la transmisión continua de impulsos nerviosos a través del espacio sináptico en las uniones nerviosas. Esto ocasiona la pérdida de la coordinación muscular, convulsiones y finalmente la muerte. La acetilcolinesterasa es una sustancia muy importante en insectos, aves y mamíferos: así que el mecanismo de toxicidad es el mismo en todos los géneros mencionados. El DL₅₀ en seres humanos es de 60 mg/Kg

6.5.3.3. Atrazina.

La sustancia se caracteriza por su relativamente alta resistencia a la transformación fisicoquímica. Además, su baja solubilidad en agua y la baja presión de vapor indican una movilidad reducida. Casi no se produce resorción a través de la piel debido a la baja

TEXTO CON
FALLA DE ORIGEN

solubilidad de esta sustancia. No irrita la piel ni los ojos. Es fácilmente resorbida después de la ingesta y, en el transcurso de las primeras 24 horas, más del 50% es eliminado a través de la orina. Durante su paso por el cuerpo, la atrazina es completamente metabolizada, principalmente a través de la desalquilación oxidativa del grupo amino y por reacción del átomo de cloro con reactivos tiólicos endógenos. Estudios de laboratorio han demostrado que provoca alteraciones en las funciones del corazón, hígado y riñón. Interfiere con el sistema endocrino provocando problemas en la reproducción. También está asociada a problemas de fertilidad masculina, en ratas interfiere con el metabolismo de la testosterona (hormona sexual) y con el apareamiento. Provoca cáncer de mamas en ratas hembras y tumores en los testículos en ratas machos. Otros estudios revelan un incremento en la incidencia de cáncer de útero en animales y desarrollo de leucemias, linfomas y mesoteliomas. En humanos se le asocia con incremento de tumores en ovarios, cáncer de mamas y linfoma no-Hodking. Investigaciones realizadas en Nebraska e Iowa indican que las comunidades que usan agua contaminada con atrazina tienen una mayor incidencia de nacimientos de bebés con piernas reducidas y otras malformaciones congénitas. Considerando los riesgos que implica la exposición a largo plazo a residuos de triazinas y sus metabolitos en aguas y alimentos, la EPA de Estados Unidos en 1994 empezó un proceso de revisión especial y fueron clasificados como altamente tóxicos. La atrazina y sus metabolitos (deisopropilatrazina, deetilatrazina y dialquilatrazina) son considerados altamente contaminantes del agua en varios países de Europa. Su uso ha sido prohibido para cumplir con las normas rigurosas de la Unión Europea sobre la calidad del agua potable. El DL_{50} en seres humanos es de 140 mg/Kg.

6.6. MÉTODOS DE ANÁLISIS DE LOS PESTICIDAS EN ESTUDIO.

Los métodos establecidos para la determinación de los anteriores contaminantes se encuentran divididos de la siguiente manera:

- ELL para su aislamiento, evaporación del disolvente para concentrarlos y posterior derivación para ser analizados por cromatografía de gases (CG).
- EFS empleando adsorbentes poliméricos para ser analizados por cromatografía de líquidos (HPLC) en sus modalidades en línea y fuera de línea.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

VI. Fundamentación. Generalidades y Antecedentes 46

- EFS empleando dos adsorbentes, uno de tipo fase enlazada y otro de intercambio iónico para ser analizados por HPLC en su modalidad en línea.
- EFS empleando IAs preparados por inmovilización química de anticuerpos.
- Sensores químicos para monitoreo ecológico.

En la tabla VI.3 se resumen algunos de los métodos empleados para el análisis de los pesticidas en estudio con sus variantes y combinaciones posibles.

Tabla VI.3. Algunos métodos utilizados para el análisis en agua de los pesticidas en estudio.

COMPUESTOS	TIPO DE AGUA	TIPO DE EXTRACCIÓN, CROMATOGRAFÍA Y DETECCIÓN	% RECOBRO	LD' ng/ml	REFERENCIA
2,4-D y 2,4,5-T	Río	ELL CG Detector captura de electrones	>97	8-16	61
2,4-D y 2,4,5-T	Grado HPLC	EFS (en línea) HPLC Detector UV $\lambda=254$ nm	70-90	1.0	62
2,4-D, 2,4,5-T y 2,4-DB	Potable y superficial	EFS (en línea) HPLC Detector UV $\lambda=220$ y 280 nm	70-114	0.1-0.5	63
2,4-D 2,4-DB 2,4-DP	Río	ELL HPLC Detector UV $\lambda=220$ y 230 nm	67-87	0.08	64
2,4-DB, 2,4,5-T 2,4-DP	Potable Superficial	EFS (en línea) HPLC Detector UV $\lambda=230$ nm	>85	0.05-0.1	65
2,4-DP y 2,4DB	Potable	EFS (en línea) HPLC Detector Arreglo de diodos $\lambda= 200$ nm	>80	0.1	66
2,4-D, 2,4-DB, 2,4-DP y 2,4,5-T	Superficial Potable residual	EFS adsorbentes diversos. C-18, poliméricos, resinas intercambiadoras de iones, carbón grafitizado CG o HPLC	85-100%	0.01 0.05	67
Atrazina propazina y simazina	Potable	EFS cartuchos C-18 derivatización (dansilación) TLC fluorodensitometría	88-95%	0.1	68
Atrazina simazina y propazina	Superficial monitoreo	FIA anticuerpos monoclonales	-----	0.1-0.3	69

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

VI. Fundamentación, Generalidades y Antecedentes 47

Continuación					
Atrazina simazina y propazina	Mar	EFS IA (Ab policionales) y fase reversa C-18 (fuera de línea) CG-Detector nitrógeno-fósforo y CG-MS.	>80% fase reversa. 7-52% IA	0.05 0.02	70
Atrazina	Superficial y suelos	MicroEFS fibras CG-Detector captura de electrones	80% agua 60% suelo	0.04 0.01	71
Atrazina, simazina y propazina	Mar	EFS-IA (Ab policionales) fuera de línea HPLC-MS	89-100%	0.001-0.005	25
simazina	Residual	Micro-EFS-desorción con fluido supercrítico (fuera de línea) HPLC- Detector arreglo de diodos $\lambda=220$ nm	---	71	72
Atrazina y simazina	Superficial	ELL HPLC derivatización en precolumna Detector fluorescencia	84-95%	1.2	73
Atrazina, simazina y propazina	Superficial	EFS PLRP-S (en línea) HPLC detector arreglo de diodos $\lambda= 220$ y 240 nm	95-105%	0.05	74
Atrazina y metabolitos	Superficial y residual	EFS C-18 y copolimero etilvinilbenceno-divinilbenceno HPLC Detector de arreglo de diodos $\lambda= 220$ nm	$\approx 100\%$	0.01-0.09	75
Malatión	Río	EFS C-18 (fuera de línea) CG Detector de captura de electrones y detector de nitrógeno-fósforo	75%	0.07	76
Malatión	Residual	Micro-EFS fibras divinilbenceno-polidimetilsiloxano CG-MS	85-95%	4	77
Malatión	Superficial Residual Mar	EFS copolimero etilvinilbenceno-divinilbenceno (fuera de línea) CG-Detector nitrógeno-fósforo	60-90%	0.08	78
Malatión	Superficial y residual	Micro-EFS polidimetilsiloxano y poliacrilato CG-Detector de nitrógeno-fósforo	90%	0.04 0.05	79
Malatión	Residual	Micro-EFS polidimetilsiloxano CG-Detector de ionización de flama	---	0.5	80

* LD Limite de detección

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

6.7. CARACTERIZACION DE MATERIALES OBTENIDOS POR SOL-GEL.⁸¹⁻⁸⁵

Para caracterizar materiales se utilizan diferentes medidas que pueden ser clasificadas de la siguiente manera:

1. Mediciones mecánicas: ensayos de tensión e impacto (Tensiometría), porosimetría de mercurio.
2. Mediciones magnéticas: resonancia, conducción magnética (Magnetometría)
3. Mediciones eléctricas: permitividad, impedancia y conductancia.
4. Mediciones ópticas: microscopía óptica y electrónica (textura, superficies, tamaño de partícula)
5. Mediciones térmicas: calorimetría (DTA, TG, DSC) y Termoporometría.
6. Mediciones espectroscópicas: IR, RMN, UV, EM

Para la caracterización de materiales obtenidos por sol-gel, las mediciones ópticas (microscopía óptica y microscopía de barrido diferencial) y las mediciones térmicas (termoporometría, porometría por adsorción isotérmica de nitrógeno) son de las más utilizadas para obtener datos tales como: tamaño de partícula, textura, porosidad, tamaño del poro, volumen del poro y área superficial.

6.7.1. Microscopía óptica y electrónica.⁸²

Un microscopio es un instrumento compuesto de varias lentes que se utiliza para obtener una imagen aumentada de objetos de reducidas dimensiones o detalles muy pequeños de los mismos. El microscopio fue perfeccionándose con gran lentitud, siendo uno de los defectos en los sistemas más primitivos, la descomposición de la luz blanca en los colores que la constituyen. *Lister*, un óptico inglés, diseñó un microscopio acromático capaz de eliminar los anillos de color que limitaban la claridad de la imagen. El microscopio acromático constituyó un gran avance, iniciando una serie de perfeccionamientos que dieron como resultado el moderno *microscopio óptico*.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Básicamente un microscopio óptico consta de un sistema de dos lentes, el objetivo que proporciona una imagen invertida con una cierta ampliación y el segundo lente llamado proyector produce una imagen final derecha. La imagen se puede visualizar en una pantalla o en una placa fotográfica. La parte más importante es la fuente luminosa que puede ser la luz ordinaria o un sistema de iluminación con lentes condensadoras. Con la microscopía óptica es posible determinar tamaño de partícula de materiales obtenidos por sol-gel, empleando para ello una cámara de Neubauer (portaobjetos con una depresión en el centro, en el fondo del cual se ha marcado con la ayuda de un diamante una cuadrícula de 3 x 3 mm, con una separación entre dos líneas consecutivas de 0.25 mm), de esta manera los detalles más pequeños que se pueden distinguir con este tipo de estudio son de 200 nm.

En muchos aspectos la microscopía electrónica es parecida a la óptica, la diferencia es la fuente que incide en la muestra, los electrones, los cuales son más fuertemente dispersados por los gases que la luz; el efecto es tan grande que es necesario trabajar a presiones menores a 10^{-3} Pa. Otra diferencia es que los electrones al poseer carga permiten usar campos magnéticos como lentes y realizar un barrido análogo a un tubo de rayos catódicos, de aquí nace la microscopía de barrido diferencial (SEM).

6.7.2. Microscopía electrónica de barrido (SEM).^{83, 84}

La microscopía electrónica de barrido, en sus diversas modalidades, surge en forma experimental entre los años 1930 y 1940, en Alemania. Un microscopio electrónico de barrido (MEB) moderno consta esencialmente de los siguientes componentes:

- La columna de electrones la cual lleva alojados en su interior los siguientes elementos (figura VI.15):
 1. Un cañón de electrones con un filamento que actúa como emisor o fuente de iluminación, por analogía con un sistema óptico. Aceleración de 2 a 40 kV.
 2. Un sistema de lentes electromagnéticas encargado de focalizar y reducir a un diámetro muy pequeño el haz de electrones producido por el filamento.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

3. Un sistema de barrido que hace recorrer el haz de electrones ya focalizado por la superficie de la muestra.
 4. Uno o varios sistemas de detección que permiten captar el resultado de la interacción del haz de electrones con la muestra y transformarlo en una señal eléctrica.
 5. Una salida conectada a una o varias bombas que producen el vacío necesario para que el conjunto funcione adecuadamente.
- Un portamuestra, con distintos grados de movimiento.
 - Un sistema de visualización de las imágenes (tubo de rayos catódicos).
 - Un sistema de vacío, un sistema de refrigeración y un sistema de suministro eléctrico
 - Un sistema de registro fotográfico, magnético o de video. Resolución de 50 a 20 Å.
 - Un sistema de procesamiento de la imagen con ayuda computacional (optativo).

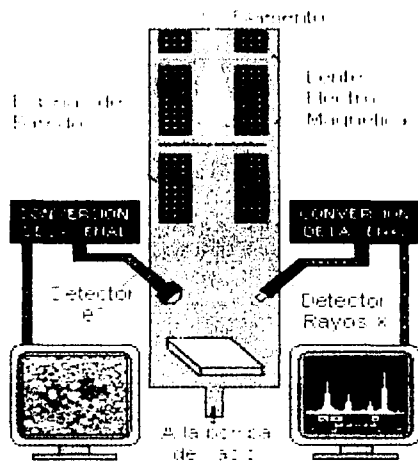


Figura VI.15. Esquema de un microscopio electrónico de barrido.⁸³

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

La técnica esencialmente consiste en hacer incidir en la muestra un haz de electrones. Este bombardeo de electrones provoca la aparición de diferentes señales que, captadas con detectores adecuados, proporcionan información acerca de la naturaleza de la muestra. La señal mas utilizada es la que proviene de los electrones secundarios (energía de 10-50 eV). De las otras radiaciones, la de rayos X se utiliza para el análisis cualitativo (medida de longitud de onda) y cuantitativo (medida de cantidad de rayos X emitidos). Las diferentes señales que se pueden emplear en SEM se ilustran en la figura VI.16.

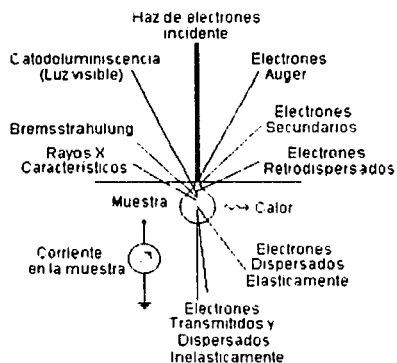


Figura VI.16. Señales utilizadas en SEM.⁸³

6.7.2.1. Preparación de muestra.

Como norma general se puede decir que las muestras no deben contener líquidos y además su superficie debe ser conductora de la corriente eléctrica. Cada tipo de muestra y cada tipo de análisis que se realice requiere un tratamiento específico; así puede ser necesario el desengrasado, pulido de la muestra, ataque químico, etc.

Prácticamente todas las muestras no conductoras necesitan recubrirse con una película de un material conductor para poder ser examinadas en un microscopio electrónico de barrido. Este recubrimiento es necesario para eliminar o reducir la carga eléctrica que se

TESIS
FALLA DE ORIGEN

crea rápidamente en la superficie de una muestra no conductora cuando se barre con un haz de electrones de alta energía.

Cuando el propósito del análisis de una muestra no incluye la obtención de un espectro de RX, un elemento que se utiliza frecuentemente para recubrir la superficie es el oro. La película de oro superficial absorbe la mayoría de los RX procedentes de la propia muestra, que intentan emerger a través de la superficie. Por tanto, en el caso de precisarse un análisis elemental en una muestra no conductora es necesario recubrir la superficie de un elemento lo más transparente posible a los RX como el carbono.

Con un SEM se obtienen imágenes de la superficie de la muestra o de la estructura cercana a la superficie de muestras más gruesas.

6.7.3. Porometría.^{48, 81, 83, 86-90}

La ruta sol-gel permite la obtención de una red sólida, ya sea inorgánica o híbrida orgánica-inorgánica (ORMOSILS), a partir de reactivos en estado líquido que constituyen el sol de partida. Esta red, obtenida a temperatura ambiente (gel húmedo), se caracteriza por poseer una alta porosidad y superficie específica. La alta porosidad constituyó, en un principio, uno de los inconvenientes a superar, cuando en los albores de la tecnología sol-gel el objetivo principal estaba encaminado a la obtención de vidrios densos. Por el contrario, actualmente, la porosidad es un valor añadido de los materiales obtenidos por esta vía, ya que en ella se puede albergar una segunda fase constituyendo un material compuesto. Gracias a esta propiedad se han encapsulado con éxito diversas enzimas y de manera más reciente se trabaja sobre la encapsulación de anticuerpos.²²⁻²⁴ Para la determinación de las propiedades del gel, tales como el radio del poro, volumen del poro y área superficial, se han utilizado varios métodos los cuales se comparan en la tabla VI.4.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Tabla VI.4. Comparación de métodos para la caracterización de porosidad en geles.⁸⁶

Método	Parámetros medibles	Parámetros calculados	Validez del método (diámetro)
Adsorción-Desorción isotérmica de Nitrógeno a 77 °K (xerogeles)	Área específica (BET) (poros y superficie externa).	Radio de poro, distribución del radio volumen y área de mesoporos-	3-150 nm
Porosimetría por intrusión de mercurio a una presión mayor de 440 MPa. (xerogeles)	Volumen y diámetro de poros	Distribución del diámetro y superficie de macro y mesoporos.	4nm-300µm.
Termoporosimetría, medición por calorimetría diferencial de barrido (DSC) del equilibrio sólido-líquido del agua confinada en los poros. (hidrogeles y xerogeles)	Descenso de la temperatura de fusión o solidificación del agua dentro de los poros. Volumen y radio de mesoporos en su mayoría	Distribución del diámetro y superficie del poro.	3-150 nm.

Los poros pueden clasificarse en tres grupos de acuerdo a su radio y a las recomendaciones de la IUPAC: macroporos por arriba de 25 nm, mesoporos entre 1 y 25 nm y microporos abajo de 1 nm. La forma de los poros es importante para la construcción de modelos matemáticos aplicables a los datos experimentales; se han tratado de clasificar en dos grandes categorías de acuerdo a su estructura: abiertos y cerrados. En ambos casos los poros pueden ser de diferentes tipos como: cilíndricos, cónicos, entrecruzados y en botella. La forma de los poros comúnmente asumida para el tratamiento de los datos obtenidos por termoporometría en el caso de sílices sol-gel es la cilíndrica.

6.7.4. Termoporometría por calorimetría diferencial de barrido (DSC).^{86, 87}

La termoporometría está basada en la medida del abatimiento de los puntos de fusión y congelación de líquidos confinados dentro de los poros de un material, ya que esta

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

disminución es función del tamaño del poro. Brun desarrolló un método para determinar la distribución del tamaño de poro (PSD) a partir de los termogramas de solidificación o fusión aplicando relaciones teóricas fisicoquímicas. Las ecuaciones empleadas en muchos de los trabajos realizados para conocer el radio del poro son:

$$R(nm) = \frac{33.3}{\Delta T} + 0.68$$

para el caso de termogramas obtenidos en fusión.

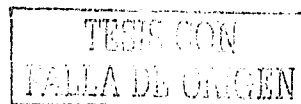
$$R(nm) = \frac{56.36}{\Delta T} + 0.1$$

para el caso de termogramas obtenidos en congelación.

donde ΔT es el abatimiento del punto de fusión o congelación del agua respectivamente. Estas ecuaciones fueron deducidas considerando: 1) un modelo de poro cilíndrico y 2) que el espesor de la capa de agua no congelable dentro del poro es de 1.0 nm. Los termogramas son obtenidos por calorimetría diferencial de barrido (DSC) a bajas velocidades de barrido entre 0.2-2 °C/min, para alcanzar el equilibrio térmico. La gran ventaja de esta técnica radica en que el análisis es realizado en medio húmedo lo que permite su aplicación a hidrogeles y xerogeles rehidratados. Además, en estas condiciones las propiedades medidas reflejan más fielmente las características del biomaterial en su ambiente de trabajo.

6.7.5. Calorimetría diferencial de barrido (DSC).⁸²⁻⁸⁵

LA DSC es una técnica similar al análisis térmico diferencial (DTA), la diferencia radica en que en DTA se mide la diferencia de temperatura entre una referencia y la muestra, en cambio en DSC se mide la energía que es necesario suministrar a la muestra para mantenerla idéntica en temperatura a la referencia. El barrido de temperatura se realiza de manera continua calentando o enfriando la muestra a una velocidad constante dentro de un intervalo de temperatura preestablecido. Se obtiene de esta forma la diferencia de capacidad calorífica como una función continua de la temperatura, lo que permite hacer un análisis termodinámico completo. La principal desventaja de un barrido continuo de la



temperatura es la dificultad para que la muestra se encuentre en todo momento en equilibrio térmico; este hecho impone restricciones a la velocidad de barrido la cual debe ser menor o igual a 2 °C/min. Un diagrama típico de un calorímetro diferencial de barrido se presenta en la figura VI.17.

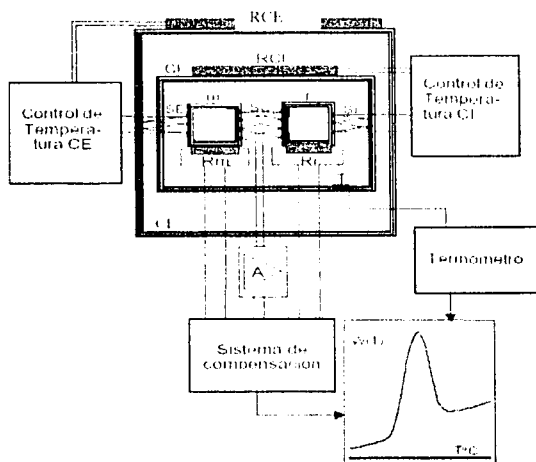


Figura VI.17. Diagrama típico de un calorímetro diferencial de barrido, donde: m = reservorio de muestra, r = reservorio de referencia, CE = coraza externa; CI = coraza interna, R_m = resistencia en la muestra, R_r = resistencia en la referencia, R_{CE} = resistencia de la coraza externa R_{CI} = resistencia de la coraza interna, A = amplificador.⁸⁴

El termograma obtenido del análisis de una muestra es una gráfica de flujo de calor (dq/dt en mJ/s) contra temperatura. Cuando la temperatura alcanza el valor correspondiente al punto de congelación del líquido que impregna a la muestra (durante el barrido descendente) se produce un aumento en el flujo de calor (efecto exotérmico) generando un pico. Al realizar el barrido de temperatura en sentido contrario (barrido ascendente) se genera un segundo pico (invertido, respecto al primero) cuando se alcanza el punto de

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

fusión del líquido congelado debido a una disminución en el flujo de calor (efecto endotérmico). En ambos casos, para cada punto del pico, el valor de la abcisa depende del radio promedio del poro y el valor de la ordenada es función del volumen total del líquido que se encuentra confinado en poros con dicho radio. Por lo tanto, el pico global representa una distribución de tamaños de poro.

Evidentemente, en un mismo material se pueden tener varias distribuciones discretas de tamaño de poro, los cuales generarán varios picos exotérmicos y endotérmicos en el termograma. Adicionalmente, el líquido superficial (no confinado) en el material también generará una señal a la temperatura característica del punto de congelamiento o fusión de dicho líquido.

El calibrado del aparato se realiza con una serie de materiales certificados, verificando el área del pico de fusión de la sustancia utilizada. El más empleado es el Indio con punto de fusión de 156.6 °C. El procedimiento involucra el registro de la curva DSC con una cantidad conocida de Indio, entre 5-10 mg y la medida del área del pico. Los factores que más afectan a las curvas de DSC son los siguientes:

- **Cantidad de muestra**, debido a que los picos son proporcionales a la masa de muestra utilizada. Por eso, se recomienda el empleo de pocos mg de material de referencia y muestra.
- **Compactación de la muestra**, lo cual será significativo si existen interacciones entre la muestra y la atmósfera de entorno. Por ejemplo, si la muestra está muy compactada, se dificultará el enfriamiento homogéneo.
- **Diluyentes**, estos no deben modificar la muestra.
- **Velocidad de calentamiento o enfriamiento**, el empleo de velocidades mayores a 2°C suele aumentar la temperatura del pico, por consecuencia aumenta el área.
- **Naturaleza del portamuestra**, se utilizan solo portamuestras de aluminio.
- **Atmósfera en torno a la muestra**, generalmente se prefiere el trabajo con flujo de gas en vez de atmósfera estática, por si ocurre en su caso el arrastre de sustancias de descomposición.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

VII. DESARROLLO EXPERIMENTAL.

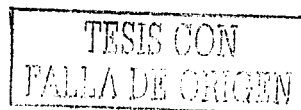
En la primera parte se describen los experimentos realizados para la obtención de condiciones óptimas de inmovilización física de biomoléculas. Adicionalmente se presenta la puesta a punto de las condiciones cromatográficas de separación, detección y cuantificación de los pesticidas en estudio y el establecimiento de un método de evaluación de la actividad de los anticuerpos utilizados.

En la segunda parte se presenta el montaje de las condiciones de inmuoextracción para la evaluación de los IAs obtenidos, así como el desarrollo de métodos analíticos para la aplicación de estos biomateriales en aguas superficiales.

En la tercera parte se indica la caracterización de los IAs mediante técnicas de microscopia y de calorimetría de barrido diferencial.

7.1. EQUIPO

- Bomba cuaternaria para cromatografía de líquidos, Polymer Laboratories modelo LC-1150.
- Desgasificador de fase móvil Jones Chromatography Modelo 7600.
- Detector UV de longitud de onda variable Thermo Separations modelo 3200.
- Integrador y graficador Hewlett-Packard modelo 3396 II.
- Sistema de empacado de columnas y precolumnas a alta presión Haskel modelo 29426.
- Sistema purificador y desionizador de agua NANOPURE, Barnstead Thermolyne modelo 04747.
- Baño de ultrasonido para desgasificación de fases móviles Sonikor modelo SC-100.
- Potenciómetro Corning modelo 220, equipado con electrodo combinado de vidrio calomel Cole-Parmer modelo 60648.
- Balanza analítica, Ohaus.
- Microscopio Electrónico de Barrido JEOL JSM 5900 LB



- Microscopio óptico Olympus CE-0849 con cámara de Neubauer.
- Termoanalizador Mettler Toledo con módulo acoplado de calorimetría diferencial de barrido Modelo DSC 821 calibrado con Indio y con enfriamiento de las muestras por nitrógeno.

7.2. ACCESORIOS.

- Frascos de borosilicato color ámbar con tapón de plástico,
- Inyector Altex 210A o Rheodyne 7125 con loop de 22 y 100 μL .
- Columna de acero inoxidable de 150 x 4.6 mm (d.i.) empacada con fase reversa Hypersil ODS (Cheshire UK), de 5 μm de tamaño de partícula (empacada en el laboratorio).
- Micropipeta de volumen variable de 200 a 1000 μL Scorex modelo 811/821.
- Micropipeta de volumen variable de 50 a 200 μL Scorex modelo 811/821.
- Micropipeta de volumen variable de 5 a 50 μL Scorex modelo 811/821.
- Sistema de filtración de vidrio Millipore modelo OM027.
- Membranas de filtración de 47 mm de diámetro, con poro de 0.45 μm , Phenomenex AFO-0504
- Papel filtro, Whatman No. 41.
- Pipetas volumétricas de 25 y 100 mL
- Tubos Centricon YM-30 Amicon Bioseparations, Millipore.

7.3. DISOLVENTES Y REACTIVOS.

- Acetonitrilo Grado HPLC, Prolabo
- Metanol Grado HPLC, Omnisolv.
- Acido perclórico reactivo analítico, 70-72% Aldrich Chemical Co.
- Acido fórmico 90% J.T. Baker.
- Acido clorhídrico 37% J.T. Baker

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

- Tetraetoxisilano 99% (TEOS) Fluka.
- Hidróxido de amonio 60% grado analítico, Sigma Aldrich.
- Metilparatión (O,O-dimetil-O-p-nitrofenil fosforoato), pureza 99.5%, Chem Service.
- Metiocarb (3,5-dimetil-4-(metiltio)fenilmetilcarbarnato) pureza 99%, Chem Service
- 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético) pureza 99%, Polyscience.
- 2,4-,5-T (ácido triclorofenoxiacético) 99% Polyscience.
- 2,4-DP (ácido diclorofenoxipropiónico) 98% Polyscience.
- 2,4-DPh (diclorofenol) 99% Polyscience.
- 2,4-D éster metílico 99% Polyscience.
- 2,4-DB éster metílico 99% Polyscience.
- 2,4,5-T éster metílico 99% Polyscience.
- Isoproturón 99% Chem Service
- Fluometurón 99% Chem Service.
- Diurón 99% Chem Service.
- Neburón 99% Chem Service.
- Monourón 99% Chem Service.
- Linurón 99% Chem Service.
- Malatión (S-[1, 2-bis-(etoxi-carbonil)-etil]-O,O-dimetil-ditiofosfato) 98% Chem Service.
- Isomalatión 98% Chem Service.
- Oxomalatión 98% Chem Service.
- Simazina (2-cloro-4,6-bis(etilamino)-1,3,5-triazina) 99% Polyscience Corp.
- Atrazina (2-cloro-4-etilamino-6-isopropilamino-1,3,5-triazina) 99% Polyscience Corp
- Propazina (2-cloro-4,6-bis(isopropilamino)-1,3,5-triazina) 99% Polyscience Corp.
- Prometón 99% Polyscience Corp
- Prometrina 99% Polyscience Corp
- Hidróxido de sodio en lentejas grado reactivo, J.T. Baker.
- Carbonato de calcio grado analítico 99.9%, J.T. Baker.
- Sal disódica del EDTA dihidratada grado reactivo 99.9%. Sigma Aldrich.
- Nitrato de plata 0.01N solución estandarizada, J.T. Baker.
- Murexida (indicador metalocrómico) grado reactivo, J.T. Baker



- Cloruro de sodio grado reactivo 99%, J.T. Baker
- Negro de eriocromo T (indicador metalocrómico) grado reactivo, J.T. Baker.
- Cloruro de amonio grado reactivo 99.9%, Sigma Aldrich.
- Sulfito de sodio anhidro grado reactivo 99%, J.T. Baker.
- Fenolftaleína grado reactivo, Sigma Aldrich.
- Anaranjado de metilo grado reactivo, Sigma Aldrich.
- Cromato de plata 99% grado reactivo, Sigma Aldrich.
- Cloruro de bario grado reactivo 99%, Sigma Aldrich.
- Permanganato de potasio grado reactivo 99%, Sigma Aldrich.
- Carbonato de sodio 99.9% grado analítico, Sigma Aldrich.

7.4. BIOMOLECULAS.

- Anticuerpos policlonales anti-2,4-D 95% Abkem (Ottawa Canadá).
- Anticuerpos policlonales anti-clortolurón 95% Abkem (Ottawa Canadá).
- Anticuerpos policlonales anti-matatión 95% Abkem. (Ottawa Canadá).
- Anticuerpos policlonales anti-atrazina 95% Abkem (Ottawa Canadá).
- Solución estándar de Albúmina Sérica de Bovino al 1% Sigma Aldrich.

7.5. PREPARACION DE DISOLUCIONES.

7.5.1 Disoluciones patrón.

- Disolución patrón de 2,4-D 500 mg/L en acetonitrilo.
- Disolución patrón de 2,4-5-T 500 mg/L en acetonitrilo.
- Disolución patrón de 2,4-DP 500 mg/L en acetonitrilo.
- Disolución patrón de 2,4-DPh 500 mg/L en acetonitrilo.
- Disolución patrón de 2,4-DB 500 mg/L en acetonitrilo.
- Disolución patrón de 2,4-D éster 500 mg/L en metanol.
- Disolución patrón de 2,4-5-T éster 500 mg/L en acetonitrilo.
- Disolución patrón de 2,4-DB éster 500 mg/L en acetonitrilo.



- Disolución patrón de clortoluron 500 mg/L en acetonitrilo.
- Disolución patrón de isoproturon 500 mg/L en acetonitrilo
- Disolución patrón de fluometurón 500 mg/L en acetonitrilo.
- Disolución patrón de diuron 500 mg/L en acetonitrilo
- Disolución patrón de neburón 500 mg/L en acetonitrilo
- Disolución patrón de malatión 500 mg/L en metanol.
- Disolución patrón de oxo-malatión 500 mg/L en metanol.
- Disolución patrón de isomalatión 500 mg/L en metanol.
- Disolución patrón de simazina 500 mg/L en metanol.
- Disolución patrón de atrazina 500 mg/L en metanol.
- Disolución patrón de propazina 500 mg/L en metanol.
- Disolución patrón de prometón 500 mg/L en metanol.
- Disolución patrón de prometrina 500 mg/L en metanol.
- Disolución patrón de metilparatión 500 mg/L en acetonitrilo.
- Disolución patrón de metiocarb 500 mg/L en acetonitrilo.

Todas las soluciones patrón fueron almacenadas a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

7.5.2. Solución salina de fosfatos (PBS, Phosphate buffered solution) 0.02M pH

7.2

Se preparó a partir del ácido o-fosforico 0.02M, agregando NaCl y KCl a concentración final de 0.137 y 0.0027 M respectivamente. Se neutralizó el ácido con solución concentrada de NaOH hasta la obtención de un pH de 7.2. La solución obtenida fue almacenada en refrigeración (4°C). En algunos experimentos se utilizaron soluciones salinas de fosfatos de diferente concentración. Estas fueron preparadas de manera similar a lo antes descrito, utilizando la cantidad apropiada de ácido fosfórico y guardando la misma relación molar entre éste y las sales NaCl y KCl.

TESIS CON
FALLA DE CUBRIM

7.5.3 Soluciones de trabajo.

Las soluciones de trabajo fueron preparadas a partir de alícuotas de las soluciones patrón diluidas en metanol, acetonitrilo, agua o PBS en función de los experimentos planteados. Estas soluciones fueron almacenadas en refrigeración.

7.5.4. Fases móviles.

Se utilizaron distintas mezclas de ACN:H₂O, ACN:H₂O medio ácido, MEOH:H₂O y MEOH:H₂O medio ácido. Las fases no fueron sonicadas por ultrasonido debido al empleo de un desgasificador en línea.

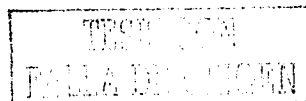
7.5.5. Reactivo de Bradford (Coomassie).⁹¹

Para 1 L del reactivo: se disuelven 100 mg de azul brillante de Coomassie G-250 en 50 mL de etanol 95 %, se agregan 100 mL de ácido fosfórico 85 % (p/v) y se lleva a un volumen de 1 L con agua desionizada. El color del reactivo es café.

PRIMERA PARTE

7.6. DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LOS ANTICUERPOS.

La actividad de un anticuerpo es una medida de la capacidad de formación del complejo antígeno-anticuerpo. Experimentalmente se determinó colocando una solución del anticuerpo y su correspondiente antígeno (el pesticida), ambos en cantidades perfectamente conocidas dentro de un tubo CENTRICON YM-30, el cual tiene una membrana de celulosa que retiene solutos de pesos moleculares mayores a 30 kDa. El tubo se sometió a centrifugación para separar la solución con el antígeno no complejado del anticuerpo libre y del complejo. El tubo con el retenido se lavó con una solución adecuada para recuperar residuos del pesticida no complejado que hubieran quedado adsorbidos en el material del tubo o retenidos por interacciones no específicas con la molécula del anticuerpo. Después de volver a centrifugar, todos los filtrados obtenidos se juntaron y se midió su volumen final.



El antígeno no complejo se determinó por análisis cromatográfico del filtrado y por diferencia se calculó la cantidad de antígeno complejo.

Teóricamente una IgG (P.M. \approx 150 000 g/mol) presenta una relación 1:2 molar con su antígeno. Por ello, para una cantidad dada de anticuerpo se hicieron determinaciones con dos diferentes cantidades de antígeno.

En la tabla VII.1, se presentan las condiciones experimentales utilizadas en la medición de la actividad de los anticuerpos (adquiridos comercialmente) con los que se trabajó en este proyecto. Para determinar la composición de la solución fue necesario el empleo de muestras blanco, el modificador orgánico fue para evitar la adsorción del pesticida en el tubo Centricon.

Tabla VII.1 Medición de la actividad de los anticuerpos.

<p>Preparación de muestra.</p> <p>50-100 μg de anticuerpo más 60 (70) ó 120 (140) ng de antígeno en 1 mL de PBS al 1% de ACN, ligera agitación a temperatura ambiente por 15 minutos</p>
<p>Centrifugación y lavados.</p> <p>Primera centrifugación a 2000 g por 16 minutos</p> <p>Primer lavado con 350 μL de PBS al 1% de ACN y centrifugación a 2000 g por 7 minutos.</p> <p>Segundo lavado con 350 μL de PBS al 1% de ACN y centrifugación a 2000 g por 7 minutos.</p>
<p>Cuantificación.</p> <p>Se midió el volumen del filtrado y se procedió a inyectar directamente al cromatógrafo de líquidos.</p>

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

7.7. INMOVILIZACIÓN FÍSICA DE ANTICUERPOS POR EL MÉTODO DE SOL-GEL.

7.7.1. Experimentos previos realizados para la obtención y dopaje del sol-gel.

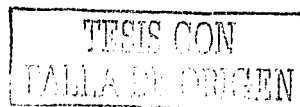
En primer lugar se ensayaron varios métodos de obtención del gel, así como su forma de secado. Posteriormente se inmovilizaron pequeñas moléculas como indicadores ácido-base y biomoléculas como BSA y amilasa procedente de la saliva, con el objeto de familiarizarse con el proceso y optimizar las condiciones de gelificación para posteriormente inmovilizar al anticuerpo. La presencia de proteína en el gel, se verificó haciéndolo reaccionar con unas gotas de azul de Coomasie.

Para optimizar la preparación del sol-gel se ensayaron diferentes proporciones de alcóxido, medio ácido y agua [TEOS (tetraetoxisilano) + HCl diluido + H₂O].

Los reactivos fueron colocados en un baño de hielo por 30 minutos bajo sonicación y después se dejó la mezcla en reposo hasta que se produjo la gelificación. Posteriormente se dejó secar el gel de 7 a 9 días hasta peso constante, se molió en un mortero y se procedió a empacarlo en una jeringa de plástico de 1 mL, empleando filtros de acero poroso en ambos extremos para retener el empaque.

Una vez familiarizado con el método de sol-gel se procedió a inmovilizar pequeñas moléculas como fueron los indicadores rojo de metilo, rojo de bromofenol y alizarina, para determinar si éstos quedaban encapsulados y disponibles para el equilibrio ácido-base.

El indicador se agregó en solución alcohólica al término de los 30 minutos del baño de hielo. Se procedió al empaqueo y a la evaluación del cambio de color por efecto del pH, utilizando soluciones ácidas y básicas. Se observó en particular si los cambios eran reversibles y si había pérdida del indicador al pasar las soluciones a través del cartucho.



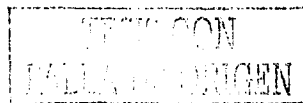
Al término de lo anterior se procedió a inmovilizar moléculas de mayor tamaño. En primer lugar se inmovilizó seroalbúmina de bovino (BSA) y posteriormente amilasa procedente de la saliva.

La biomolécula BSA se agregó en una solución de PBS 0.02M, pH 7.2, después de los 30 minutos del baño de hielo, la gelificación se produjo en aproximadamente 1 a 2 días y luego se procedió al secado por 7 días. Posteriormente, una vez empacado el gel, se realizaron lavados del cartucho con PBS y finalmente se verificó la presencia de proteína en el gel y en los lavados con el reactivo de Coomasie.

En cuanto a la inmovilización de amilasa, aproximadamente 5 mL de saliva fueron dializados en bolsa de celofán contra 500 mL de agua grado reactivo en baño de 37°C por espacio de 2 hrs. La saliva dializada se mantuvo en baño maría a 37°C, posteriormente se procedió a encapsular esta enzima de la misma manera que la BSA y el gel obtenido se secó por espacio de 7 días. La medición de actividad se realizó poniendo en contacto el hidrogel finamente fragmentado y una cantidad equivalente de amilasa con 6 ml de una solución diluida de almidón (500 µg) en PBS. El tiempo requerido para alcanzar el punto acrómico en ambos experimentos se determinó y de esta manera se comparó la actividad de la amilasa encapsulada y de la enzima libre (en solución).

7.7.2. Experimentos realizados para el encapsulamiento de anti-2,4-D.

Primero se procedió a encapsular anticuerpos policlonales para 2,4-D (anti-2,4-D) con la misma metodología utilizada para el encapsulamiento de amilasa. Después, la inmovilización se llevó a cabo variando la acidez del medio para la obtención del gel y el tiempo de secado con el objeto de obtener mayor cantidad de biomaterial y mejor respuesta del anticuerpo. Finalmente, se modificó el grado de hidrólisis y condensación del sol previo a la adición del anticuerpo, dejándolo varias horas a temperatura ambiente después de los 30 minutos en baño de hielo. Posteriormente se agregó PBS, se agitó por algunos minutos y se añadió el anti-2,4-D en PBS. Unos minutos después se formó un gel insoluble, el cual se trituró finamente con una espátula, se transfirió a una unidad de filtración por vacío y se lavó



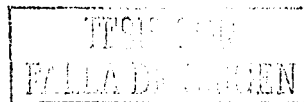
con diferentes mezclas de disolvente orgánico-agua, agua pura y finalmente PBS 0.02M. El gel húmedo se pesó y se empacó en una jeringa de plástico de 3 mL. Los cartuchos fueron almacenados en refrigeración con PBS 0.02M, pH 7.2. También se ensayó un secado del material, para lo cual el gel triturado y lavado se transfirió a un recipiente abierto y se dejó en refrigeración a 4°C hasta la pérdida del 50% de su peso inicial. El gel secado fue posteriormente molido en mortero, empacado en cartucho y almacenado como se indicó anteriormente.

7.7.3. Experimentos realizados para la encapsulación de anti-clortolurón, anti-malatió y anti-atrazina.

La inmovilización de estos anticuerpos se realizó de acuerdo con los resultados obtenidos en el encapsulamiento de anti-2,4-D. Se observó que la cantidad de material formado era mayor si se agitaba el recipiente de reacción durante todo el proceso de hidrólisis y condensación. Además, se constató la importancia de utilizar material de vidrio libre de rugosidades y defectos para llevar a cabo la reacción de gelificación. Con estas modificaciones y precauciones la cantidad de material aumentó considerablemente; por esta razón los nuevos geles fueron empacados en jeringas de plástico de 5 mL. La última modificación fue en el lavado del biomaterial obtenido, que finalmente se efectuó con una mezcla de agua-disolvente orgánico, seguida por agua grado reactivo y PBS.

7.8. CONDICIONES CROMATOGRÁFICAS DE SEPARACIÓN, DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE LOS PESTICIDAS EN ESTUDIO.

Para el seguimiento de los ensayos antes descritos fue necesario contar con un método de análisis que permitiera determinar los pesticidas en los eluatos de los cartuchos de inmunextracción. Se optó por utilizar la cromatografía de líquidos con detección UV. Se ensayaron como fases móviles diferentes mezclas ACN:H₂O o MeOH:H₂O y dependiendo de la familia de pesticidas, se modificó también el pH. Las condiciones experimentales del análisis cromatográfico fueron optimizadas, empleando para la separación una columna de



acero inoxidable de 150 x 4.6 mm (d.i.) empacada con Hypersil ODS de 5 μm de tamaño de partícula. La inyección de los eluatos se realizó con una válvula manual equipada con un loop de 20 o 100 μL dependiendo de los experimentos.

7.8.1. Condiciones del análisis cromatográfico para 2,4-D y 2,4-D éster

Se adaptó un loop de 100 μL para la cuantificación cromatográfica con detector UV debido a que se requería una alta sensibilidad. En la tabla VII.2, se mencionan las condiciones experimentales del análisis cromatográfico.

Tabla VII.2 Condiciones experimentales del análisis cromatográfico para 2,4-D y 2,4-D éster.

2,4-D
1. Fase móvil ACN-agua 35:65 (v/v), pH 1.5, flujo de 1 mL/min. $t_r = 13.2$ min
2. Longitud de onda ($\lambda = 230$ nm).
3. Concentraciones de estándares 15, 30, 60, 120, 240 ppb en ACN-agua 50:50 (v/v), volumen inyectado 100 μL .
4. Sensibilidad 0.01 AUFS

2,4-D éster
1. Fase móvil ACN-agua 48:52 (v/v), flujo 1 mL/min. $t_r = 10.5$ min
2. Longitud de onda ($\lambda = 230$ nm).
3. Concentraciones de estándares 10, 15, 20, 30, 60, 120 ppb en ACN-agua 50:50 (v/v), volumen inyectado 100 μL .
4. Sensibilidad 0.01 AUFS

7.8.2. Condiciones del análisis cromatográfico para malatión.

Las condiciones experimentales establecidas para la determinación cromatográfica de malatión se presentan en la tabla VII.3.

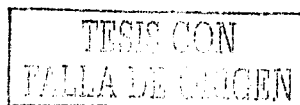


Tabla VII.3 Condiciones experimentales del análisis cromatográfico del pesticida malatión.

<p>1. Fase móvil ACN:H₂O 47:53 (v/v) flujo de 1 mL/min $t_r = 12.1$ min</p> <p>2. Longitud de onda ($\lambda = 215$ nm).</p> <p>3. Concentraciones de estándares de 15, 25 50, 100 200 y 400 ppb en ACN:H₂O 60:40 (v/v), volumen inyectado 100 μL.</p> <p>4. Sensibilidad de 0.01 AUFS</p>

7.8.3. Condiciones del análisis cromatográfico para los herbicidas de la familia de las triazinas.

Las condiciones experimentales para la determinación de triazinas se presentan en la tabla VII.4.

Tabla VII.4. Análisis cromatográfico de los herbicidas de la familia de las triazinas.

Simazina atrazina y propazina
<p>1. Fase móvil MeOH:H₂O 47:53 (v/v) flujo de 1 mL/min $t_r = 7.1, 13.9$ y 24.9 min respectivamente.</p> <p>2. Longitud de onda ($\lambda = 220$ nm).</p> <p>3. Concentraciones de estándares de 8, 16 25, 35, 45, 90, 150, 300 y 400 ppb, volumen inyectado 20 μL o 100 μL</p> <p>4. Sensibilidad de 0.01 AUFS.</p>
Prometón y prometrina
<p>1. Fase móvil MeOH:H₂O 55:45 (v/v) flujo de 1 mL/min $t_r = 13.5, 16.1$ min respectivamente.</p> <p>2. Longitud de onda ($\lambda = 220$ nm).</p> <p>3. Concentraciones de estándares de 8, 16 25, 35 20, 25, 50 ppb en ACN:H₂O 65:35 (v/v) volumen inyectado 100 μL.</p> <p>4. Sensibilidad 0.01 AUFS.</p>

TESIS CON
FALLA DE CUCEN

SEGUNDA PARTE

7.9. EVALUACIÓN DE LOS IAs OBTENIDOS.

Los IAs fueron evaluados con muestras de agua grado reactivo dopadas con los pesticidas en estudio a niveles traza.

En primer lugar se realizó un estudio de retención no específica con un gel sin dopar (gel blanco). Las variables manejadas fueron:

- La composición de la fase de carga (0-4% de ACN).
- Volumen de la fase de carga (2-50 mL).
- La composición del eluyente con soluciones acuosas de MEOH o ACN a 50-70% (v/v).
- La velocidad de flujo (0.2- 1.0 mL/min).

En segundo lugar, utilizando las condiciones adecuadas para minimizar la retención no específica, se procedió a optimizar la retención del soluto en los geles dopados con anticuerpo. Para este estudio los ensayos fueron los siguientes:

- Efecto de la velocidad de flujo en la carga (0.2-10 mL/min)
- Efecto de la velocidad de flujo en el lavado (0.2-1mL/min)
- Efecto de la velocidad de flujo en la elución (0.2-1mL/min)
- Efecto del volumen de carga (25-250 mL)
- Efecto de la fuerza iónica (0.005-0.15M)
- Efecto de pH en el eluyente. (3-7)
- Efecto de la composición del eluyente con soluciones acuosas de MEOH o ACN 50-75 % (v/v).
- Efecto del tiempo de reposo del cartucho entre ciclos de operación sucesivos (10-150 minutos).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Para la evaluación preliminar de los cartuchos dopados con anti-2,4-D se utilizaron las condiciones presentadas en la tabla VII.5.

Tabla VII.5. Condiciones preliminares para el acondicionamiento, carga, lavado y elución de los cartuchos de inmunoextracción dopados con anti-2,4-D.

Acondicionamiento
1. El cartucho sacado del refrigerador se acondicionó a temperatura ambiente por 15 minutos y se lavó con 5 mL de PBS a un flujo de 0.5 mL /min.
Carga
2. La solución de carga en PBS 0.01M pH 7.2 se hizo pasar a un flujo de 0.25 mL /min, descartando las 5 primeras gotas.
Lavado
3. Lavado con 1 mL de agua grado reactivo a un flujo de 0.25 mL/min.
Elución
4. Elución del cartucho con MeOH al 70% en agua o ACN al 50% en agua a un flujo de 0.25 ml/min. Inmediatamente se lavó con 10 mL de PBS y se dejó reposar por 10 min para una nueva carga.

Por otro lado, para la evaluación preliminar de los cartuchos dopados con anti-malati6n se utilizaron las condiciones presentadas en la tabla VII.6.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Tabla VII.6. Estudio para encontrar el mejor método de acondicionamiento, carga, lavado y elución de los cartuchos de inmunoestracción con anti-malati6n.

Acondicionamiento
1. El cartucho sacado del refrigerador se acondicion6 a temperatura ambiente por 1 hora y se lav6 con 15 mL de PBS 0.02M a diferentes flujos. Se ensay6 un lavado posterior con 2 ml de agua grado reactivo a flujo de 0.5 mL/min.
Carga
2. Se probaron diferentes proporciones de ACN en PBS 0.02M pH 7.2 y diferentes vol6menes y velocidades de flujo. Posteriormente se vari6 la cantidad de analito cargado.
Lavado
3. El lavado se realiz6 con 2 mL de agua conteniendo diferentes proporciones de ACN a un flujo de 0.5 mL/min
Eluci6n
4. Se ensayaron diferentes mezclas de ACN:H ₂ O y diferentes flujos para la eluci6n del cartucho. El volumen de eluci6n se fij6 en 2 mL.

Respecto a la evaluaci6n preliminar de los geles dopados con anti-atrazina tambi6n fueron modificadas distintas variables en los pasos de acondicionamiento, carga, lavado y eluci6n al igual que en el caso del IA dopado con anti-malati6n.

En tercer lugar, obtenidas las mejores condiciones de inmunoestracci6n, se determinaron las siguientes propiedades en los IAs.

- Capacidad de carga
- Estabilidad respecto al tiempo.
- Estabilidad respecto al n6mero de ensayos.
- Reactividad cruzada

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

- Especificidad.

En cuarto lugar, con los resultados obtenidos, se procedió a montar dos métodos analíticos para cuantificar malatión y triazinas (atrazina, propazina y simazina) en muestras acuosas, utilizando los cartuchos respectivos de inmunoextracción para la preparación de muestra.

La evaluación estadística de los métodos montados involucró:

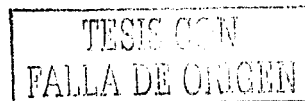
- Linealidad del método.
- Exactitud y precisión (repetibilidad) del método.
- Límite de detección
- Límite de cuantificación

Por último los métodos analíticos desarrollados para malatión y atrazina fueron ensayados con muestras de agua de presa, dopadas con los pesticidas correspondientes. Se caracterizó la matriz acuosa determinando parámetros básicos de la calidad del agua:

- pH
- Alcalinidad.
- Cloruros
- Dureza
- Sólidos filtrables

La aplicación de estos métodos analíticos para malatión y triazinas se llevo a cabo empleando como fuente hídrica agua de presa de la Sierra Norte del estado de Puebla (presas Tenango y Necaxa).

El ensayo de especificidad del IA para malatión se realizó empleando un volumen de 50 mL de agua de presa Tenango dopada con una mezcla de los pesticidas metiocarb, metilparatión y malatión a una concentración de 0.8 ng/mL. Las condiciones del análisis cromatográfico son las mismas que se encuentran en la tabla VII.3



Por otra parte, la determinación de las triazinas atrazina simazina o propazina en agua de presa con el IA dopado con anti-atrazina se llevo a cabo dopando individualmente cada muestra a una concentración de 0.7 ng/mL. Las condiciones del análisis cromatográfico de los eluatos fueron presentadas en la tabla VII.4. La especificidad de este IA se evaluó utilizando un volumen de 50 ml de agua de la presa Necaxa dopada con una mezcla de 4 pesticidas: atrazina a una concentración de 1.2 ng/mL en tanto el metiocarb, metilparatión y malatión se doparon a una concentración de 2 ng/mL. Las condiciones del análisis cromatográfico de los eluatos se presentan en la tabla VII.7.

Tabla VII.7. Análisis cromatográfico isocrático para el estudio de especificidad en un IA dopado con 700 µg de anti-atrazina empleando agua de presa.

1. Fase móvil ACN:H₂O 35:65 flujo de 1 mL/min
Atrazina $t_r = 7.0$ min
Metiocarb $t_r = 11.7$ min
Metilparatión $t_r = 13.1$ min
Malatión $t_r = 17.25$ min
2. Longitud de onda ($\lambda = 220$ nm)
3. Concentración de la mezcla estándar 25 ppb para atrazina y 100 ppb para los demás pesticidas, volumen inyectado 100 µL.
4. Sensibilidad de 0.01 AUFS

Adicionalmente se realizó la determinación simultánea de las 3 triazinas (simazina, atrazina y propazina) en agua de la presa Necaxa, la muestra fue dopada a una concentración de 0.5 ng/mL de cada triazina. El análisis cromatográfico del eluato fue realizado de acuerdo con lo presentado en la tabla VII.4

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

TERCERA PARTE

7.10. CARACTERIZACION FISICA DE LOS IAs

Los IAs fueron caracterizados por microscopía óptica y electrónica para la determinación del tamaño y porosidad superficial de las partículas.

7.10.1. Microscopía electrónica de barrido (SEM).

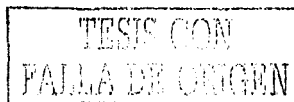
Con el objeto de caracterizar físicamente los cambios que sufre el gel cuando en su seno se inmovilizan biomoléculas, se realizó una microscopía de barrido diferencial de un xerogel blanco, un hidrogel y un xerogel dopados con 500 μg de anti-2,4-D. El hidrogel fue recuperado de un cartucho que había sido usado en varios experimentos de EFS. Los xerogeles blanco y dopado fueron preparados justo antes del estudio. Todos los geles fueron secados exhaustivamente mediante vacío a temperatura ambiente y posteriormente se fijaron con un baño de oro. Se obtuvieron microfotografías de la estructura superficial a diferentes ampliaciones.

7.10.2. Determinación de tamaño de partícula.

Para la medición de tamaño de partícula se empleó un microscopio óptico Olympus; los geles secados se colocaron en una cámara de Neubauer, la medición se realizó en varios campos para obtener un intervalo de tamaño de estas partículas.

7.10.3. Calorimetría diferencial de barrido (Termoporometría).

Se evaluó el volumen poroso, el área superficial y la distribución del tamaño de poro en los IAs preparados mediante un estudio termoporimétrico por calorimetría de barrido diferencial. Los geles, tanto dopados (con 500 μg de anticuerpo) como testigo, fueron previamente hidratados con agua grado reactivo. Con los termogramas obtenidos y mediante relaciones matemáticas fue posible obtener un valor aproximado de las propiedades físicas mencionadas.



VIII. RESULTADOS.

8.1. Determinación de la actividad de los anticuerpos.

Los resultados de la determinación de actividad de los anticuerpos empleados en el estudio, se presentan en la tabla VIII.1. Se observa claramente que la actividad de estas inmunoglobulinas no sobrepasa más del 11%; este valor de actividad es muy semejante a los reportados por otros investigadores para anticuerpos policlonales. De los 4 anticuerpos utilizados el anti-clortoluron no presentó interacción alguna con su analito blanco (clortoluron). A pesar de haber dejado en contacto al antígeno con su correspondiente anticuerpo hasta por 24 hrs, prácticamente no hubo respuesta del anticuerpo hacia su complemento.

Tabla VIII.1. Comparación de actividad de los anticuerpos utilizados.

Anticuerpo	anti-2,4-D	anti-clortoluron	anti-malati6n	anti-atrazina
Capacidad relativa (ng/mg)*	300	-	389	240
Porcentaje de IgG activo**	10.1%	0% 2% (24 hrs)	8.6%	8.7%

* ng de hapteno o pesticida enlazado por mg de anticuerpo.

** Con respecto a la cantidad de hapteno que te6ricamente debera complejarse con la IgG utilizada en los ensayos considerando que toda 6sta corresponde a anticuerpos activos con dos sitios de uni6n por mol6cula y un P.M. de 150 000 g/mol.

Cabe se~alar un hecho importante, en la medici6n de la actividad del anti-2,4-D su antígeno blanco el 2,4-D no fue retenido, pero el derivado 6ster (2,4-D 6ster metilico) s6 fue retenido. La raz6n se debe a que, para la obtenci6n del anticuerpo es necesario conjugar el hapteno a una macromol6cula. Es decir, para poder ser inmun6geno fue necesario enlazar covalentemente una prote6na en alguno de los grupos funcionales de la mol6cula de 2,4-D. Este compuesto (figura VIII.1) tiene un grupo carboxilo en el cual es posible realizar f6cilmente una reacci6n de derivatizaci6n. Los anticuerpos formados son entonces capaces

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

de reconocer ya sea a la proteína acarreadora o a la parte de la molécula del 2,4-D que se encuentre disponible.

Por otra parte, el 2,4-D cuando está en solución a pH neutro se encuentra en forma de anión. En estas condiciones el anticuerpo podría ser también aniónico (dependiendo del pH de su punto isoelectrico), por lo que no puede interactuar con el antígeno por repulsión electrostática. En cambio el derivado éster es una molécula sin propiedades ácido-base (siempre que no se hidrolice) y el anticuerpo lo reconoce mejor. Cabe hacer notar que en el animal inmunizado los anticuerpos se forman contra el conjugado analito-proteína, es decir contra una molécula de 2,4-D esterificada.

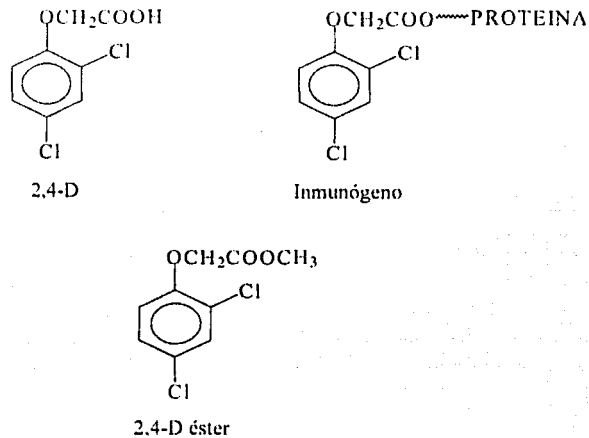


Figura VIII.1. Estructuras químicas de los derivados e inmunógeno del 2,4-D.

8. 2. ENCAPSULAMIENTO VÍA SOL-GEL.

8.2.1. Ensayos para la obtención del sol-gel

De acuerdo con algunos trabajos publicados, las cantidades utilizadas de alcóxido, ácido y agua fueron las siguientes:

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

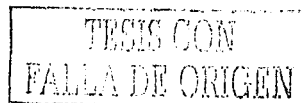
- 1). 2.5 mL de TEOS + 0.1mL de HCl 0.04M y 0.4 mL de H₂O (n=5) (280 mg de gel seco obtenidos).
- 2) 5.0 mL de TEOS + 0.2mL de HCl 0.04M +0.8 mL de H₂O (n=5) (610 mg de gel seco obtenidos). Donde n es el número de repeticiones.

Estos primeros geles fueron de aspecto cristalino transparente y muy duros. El secado se prolongó hasta por 9 días a temperatura ambiente, la molienda de los mismos se realizó en un mortero y se procedió a empacarlos en una jeringa de plástico de 1 ml con filtros de acero poroso. Fue necesario determinar si existía buen flujo a través del cartucho, por lo que se realizaron varios lavados con agua, observando que el flujo era adecuado en los primeros 10 a 15 lavados. Posteriormente, la presión aumentó y el flujo fue prácticamente imposible debido probablemente a partículas muy finas que taparon los poros del filtro de salida del cartucho. Sin embargo se procedió a la encapsulación de indicadores ácido-base empleando para ello las condiciones de la reacción 1 (figura VI.7).

El indicador se agregó en solución una vez terminados los 30 minutos del baño de hielo. Se procedió al empacado y a la evaluación del cambio de color por efecto del pH, utilizando soluciones débilmente ácidas y básicas. Se observaron los cambios reversibles del color y en ningún momento la solución del efluente presentó color, por lo que se deduce que los indicadores quedaron debidamente encapsulados.

8.2.2. Encapsulamiento de biomoléculas.

Al término de lo anterior se procedió a inmovilizar moléculas de mayor tamaño; en primer lugar se inmovilizaron 100 y 300 µg de BSA y posteriormente amilasa procedente de la saliva. Después de separar el gel, en el vaso de reacción se agregó reactivo de Coomassie para determinar posible presencia de proteína remanente. El resultado fue negativo al no desarrollarse el color azul rey del complejo, indicando que toda la proteína fue encapsulada. Posteriormente una vez empacado el gel, se realizaron varios lavados del cartucho con PBS. Al efluente se le agregó también reactivo de Coomassie resultando negativa la prueba, lo cual demuestra que la proteína encapsulada no tiende a fugarse de la matriz del gel. Para comprobar la presencia de proteína en la matriz también se percoló



reactivo de Coomassie a través del cartucho, resultando positiva la respuesta. Con estos resultados era necesario ahora comprobar si una biomolécula encapsulada podría conservar su actividad biológica. Es decir, en el caso de una enzima, conservar su capacidad de reacción con su sustrato, o en el caso de un anticuerpo conservar su capacidad para formar el complejo antígeno-anticuerpo.

Para el encapsulamiento de la amilasa, la saliva dializada se mantuvo en baño maría a 37°C, los ensayos realizados con n repeticiones para la preparación del gel fueron:

- 1). 2.5 mL de TEOS + 0.1mL de HCl 0.04M y 0.4 mL de H₂O +0.5 mL de saliva dializada. 330 mg de gel seco obtenidos (n=2).
- 2). 2.5 mL de TEOS + 0.1mL de HCl 0.04M y 0.4 mL de H₂O +1 mL de saliva dializada. 330 mg de gel seco obtenidos (n=2).

Se determinó la actividad biológica de la amilasa libre y encapsulada en función del tiempo acrómico (tiempo en que se hidroliza una cantidad determinada de almidón y el complejo yodo-almidón no se forma). El 100% de transformación de 500 µg de almidón se llevó a cabo en 180 minutos con el gel dopado en comparación con los 5 minutos requeridos por la amilasa libre, lo que indica que la amilasa encapsulada presenta una cinética muy lenta de reacción. Esto podría ser debido a una muy lenta difusión del almidón hacia la enzima o a la inactivación de la enzima durante el proceso de encapsulación. Para dilucidar lo anterior se procedió a encapsular un anticuerpo ya que el soluto o antígeno es una molécula de tamaño pequeño y en principio los problemas de difusión serían mínimos. Así, si el método de encapsulamiento es adecuado, el anticuerpo presentaría retención del antígeno.

8.2.3. Encapsulación de Anti-2,4-D.

En la tabla VIII.2, se resumen las diferentes condiciones empleadas para preparar los primeros geles dopados con anti-2,4-D.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Tabla VIII.2. Ensayos realizados en el encapsulamiento del anti-2,4-D (n=2).

TEOS (ml)	HCl 0.04M (ml)	Agua (ml)	Anticuerpo Encapsulado (µg)	Tiempo de secado (días)	Tipo de secado	Material seco obtenido (mg)
2.5	0.1	0.4	100	4	vacío	360
2.5	0.1	0.4	200	4	vacío	380
2.5	0.2	0.4	100	5	Temp. ambiente	470
5.0	0.2	0.8	100 + 25 µl de PBS 0.1M	2	Refrigeración Temp. ambiente	330
5.0	0.4	0.8	100 + 25 µl de PBS 0.1M	2	Refrigeración Temp. ambiente	480

La evaluación de estos IAs se hizo mediante un procedimiento análogo a una extracción en fase sólida. El protocolo de inmunoextracción utilizado se presenta en la figura VIII.2.

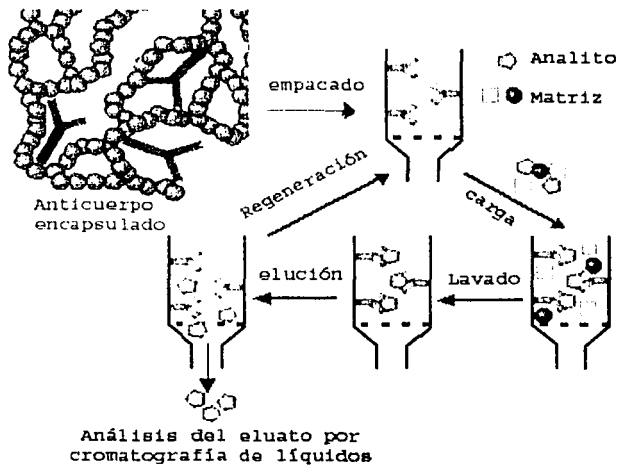


Figura VIII.2. Procedimiento de un protocolo de inmunoextracción.

ESTA TESIS CON
DE LA FALDA DE ORIGEN

Para determinar si los cartuchos presentaban retención del 2,4-D y 2,4-D éster se comparó el eluato contra la solución de carga inicial y contra el efluente de la carga. De acuerdo con los resultados obtenidos ninguno de los IAs presentó retención alguna hacia el 2,4-D o 2,4-D éster.

Una vez terminada la evaluación se agregaron 5 gotas de reactivo de Coomassie a los cartuchos para determinar la presencia de proteína. Dicha prueba resultó positiva, por lo tanto se concluyó que el anticuerpo perdía su actividad bajo las anteriores condiciones de gelificación ensayadas. Cabe mencionar que a los 30 minutos de reacción cuando se agrega el anti-2,4-D se percibe un fuerte olor por la presencia de TEOS sin reaccionar, el cual podría ser el causante de que se degrade el anticuerpo. Por otro lado, la cantidad de gel obtenido reflejaba que la reacción de hidrólisis era muy lenta y el alcóxido que no reaccionaba se perdía por evaporación. A pesar de dejar el gel 2 días en refrigeración, la cantidad de material no cambiaba. El aumento en la concentración del ácido en los ensayos anteriores no fue suficiente para observar algún cambio. Por estas razones las siguientes modificaciones se encaminaron hacia:

- Aumentar aún más la concentración de ácido para incrementar la velocidad de hidrólisis.
- Neutralizar perfectamente la solución (sol) justo antes de agregar el anticuerpo.
- Agregar el anticuerpo cuando el polímero esté cerca del punto de transición sol-gel, es decir cuando el alcóxido ha reaccionado totalmente (no se perciba su olor) y la densidad del sol aumente. Con esto se trataba de lograr un tiempo de gelación más adecuado.
- Empacar el biomaterial sin ningún secado o bien tras un previo secado lento y controlado en refrigeración



Mediante las modificaciones realizadas pudieron obtenerse 1.8 g de IA secado parcialmente al 50% (xerogel). Sin embargo, el aspecto más importante fue la conservación de actividad de los anticuerpos encapsulados, ya que bajo estas condiciones la retención del 2,4-D éster fue significativa.

Cabe señalar que el método de secado del gel resultó también muy importante ya que, tras un secado controlado en refrigeración, la retención aumentó respecto al gel no secado.

Aunado a lo anterior, otro aspecto observado fue que, si el hidrogel triturado se empaca directamente sin secar, la presión de los cartuchos aumenta con su uso. Es decir, tras varios ensayos el volumen de material se comprime significativamente ($\approx 50\%$ respecto al volumen inicial) y resulta difícil percolar la muestra. En contraste el gel secado (xerogel), molido, rehidratado y empacado permitió realizar un mayor número de ensayos sin que se comprimiera el material y sin que la presión aumentara. Los resultados comparativos se muestran en la tabla VIII.3.

Tabla VIII.3. Efecto del secado del gel en la retención del 2,4-D éster (500 μg de anti-2,4-D encapsulado).

Sin secar masa retenida (ng)	Secado en refrigeración Masa retenida (ng)	% de aumento de retención
48	62	29

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

El efecto de todas las modificaciones realizadas, incluyendo un ensayo de secado por liofilización, se presenta en la tabla VIII.4. El soluto de prueba fue el éster metílico del 2,4-D.

Tabla VIII.4. Efecto de las modificaciones experimentales en la obtención del IA para 2,4-D.

Ensayos previos	Modificaciones
Preparación del gel	
2.5 mL de TEOS + 0.1 mL de HCl 0.04M y 0.4 mL de H ₂ O. Anticuerpo agregado inmediatamente	Aumento de la concentración de ácido
0.360 g de gel seco obtenidos (no hay retención)	Anticuerpo agregado en el sol denso después de la adición de 2 ml de PBS 0.2M
	3.6 g obtenidos de gel húmedo (Retención)
Secado y posterior empaçado	
Secado y molido (no hay retención)	Sin secar y ligera trituración (Retención)
Sin secar (no hay retención)	Secado en refrigeración y molido (Aumento de retención)
	Liofilización (pérdida de actividad y retención)

8.3. EVALUACIÓN DE LOS IAs CON anti-2,4-D.

Con estos resultados de retención, el siguiente paso fue la evaluación completa del IA y la optimización del protocolo de inmunoextracción. Los resultados de las variables que afectan la retención se presentan en las figuras VIII.3-7. El estudio de estas variables se realizó tomando en cuenta los resultados obtenidos para la retención del mismo soluto en un gel blanco (sin anticuerpo).

Los experimentos preliminares para analizar la retención no específica se realizaron con un xerogel blanco el cual fue molido y empaçado. El cartucho se cargó con soluciones de 2,4-D éster (o de otros compuestos de la misma familia) en mezclas ACN-PBS desde

0:100 hasta 10:90 (v/v). El volumen de carga fue de 10 mL y la cantidad de analito de 100 ng. Posteriormente el cartucho se lavó con 2 ml de agua pura y se eluyó con 2 mL de ACN:H₂O 50:50 (v/v). El eluato fue inyectado y analizado por cromatografía de líquidos. En la tabla VIII.5 se muestra la cantidad de analito retenido cuando el cartucho se cargó con soluciones totalmente acuosas y también se indica el contenido de ACN que se requirió en la solución de carga para evitar la retención no específica de otros ácidos fenoxicarboxílicos en la matriz de sílice. En todos los experimentos subsecuentes, los analitos se cargaron en los cartuchos de inmunoeextracción con la cantidad de ACN adecuada para que la retención observada correspondiera únicamente a la interacción específica con el anticuerpo. Sin embargo, en el caso del soluto más hidrofóbico (2,4-DB éster) no se logró evitar que una pequeña cantidad se retuviera en el gel blanco aún con 10% de ACN en la solución de carga. Por lo tanto, para este compuesto, la retención total en el IA fue corregida por la retención no específica determinada en el gel blanco (10 ng) para obtener la cantidad retenida específicamente.

Tabla VIII.5. Contenido de ACN necesario para evitar la retención no específica en cartuchos empacados con geles sin dopar (gel blanco).

Analito	Cantidad retenida (ng) en muestras totalmente acuosas	ACN requerido (%) para evitar retención no específica
2,4-D	No detectado	0
2,4-DB	25	7
2,4,5-T	10	1
2,4-DP	7	1
2,4-DPh	No detectado	0
2,4-D éster	8	1
2,4-DB éster	60	> 10
2,4,5-T éster	50	10

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Para poner a punto el protocolo de inmunoeextracción, primero se estudiaron las condiciones de elución. Un cartucho con gel dopado se cargó con una cantidad fija de 2,4-D éster (120 ng en 10 mL de ACN-PBS 1:99 v/v) y se eluyó con diferentes mezclas de ACN:H₂O y MeOH:H₂O. Las figuras VIII.3 y 4 muestran que las condiciones óptimas de elución son con 2 mL de ACN:H₂O 50:50 v/v.

Por otra parte se decidió incluir un lavado con 2 mL de agua pura entre la carga y la elución para evitar que el eluyente rico en ACN provocara la precipitación de sales (por el PBS usado en la carga) dentro del cartucho. En todos los experimentos posteriores, las condiciones de lavado y elución se mantuvieron constantes: lavado con 2 mL de agua y elución con 2 mL de ACN:H₂O 50:50 (v/v).

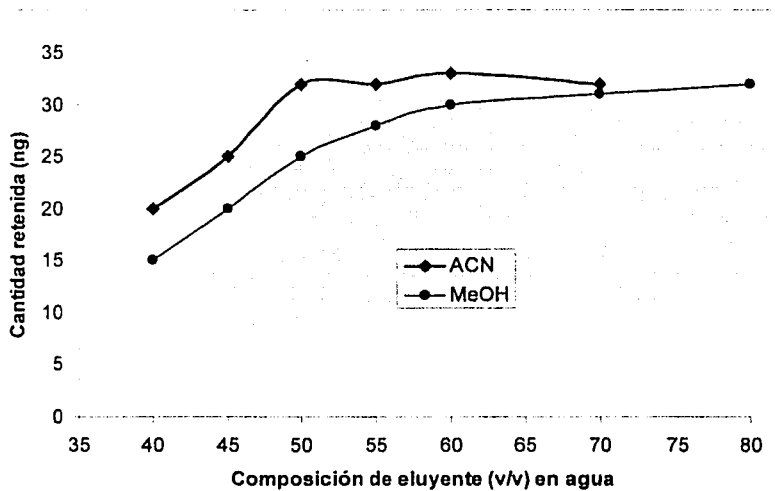


Figura VIII.3. Efecto de la composición del eluyente en la recuperación del 2,4-D éster. Volumen de elución 2 mL, 120 ng de 2,4-D éster en 10 mL de ACN-PBS 1:99 (v/v). Cartucho dopado con 300 µg de anticuerpo.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

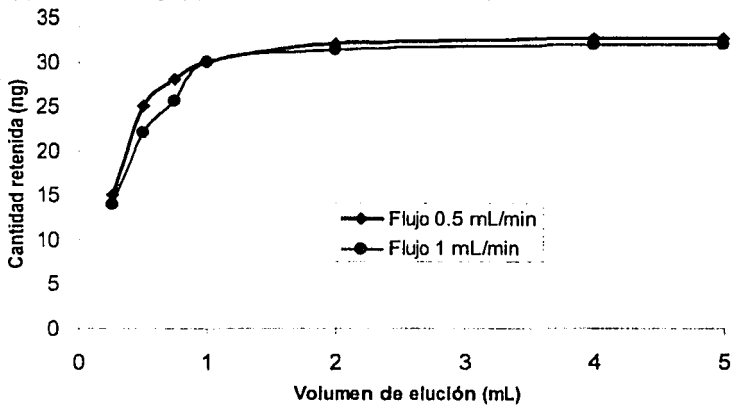


Figura VIII.4 Efecto del volumen de elución en la recuperación del 2,4-D éster (n=2). Carga de 120 ng en 10 mL de ACN-PBS 1:99 (v/v). Elución con ACN:H₂O 50:50 (v/v)

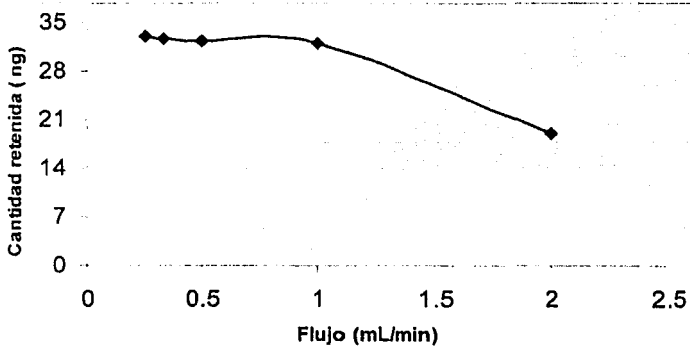


Figura VIII.5. Efecto de la velocidad de flujo durante la carga sobre la cantidad retenida de 2,4-D éster (n=4). Cartucho con hidrogel dopado con 300 μ g de anticuerpo. Muestra de 10 mL a 12 ppb del soluto en PBS 0.02 M (pH= 7.2) con 1% de ACN. Tiempo de reposo del cartucho >1 h.

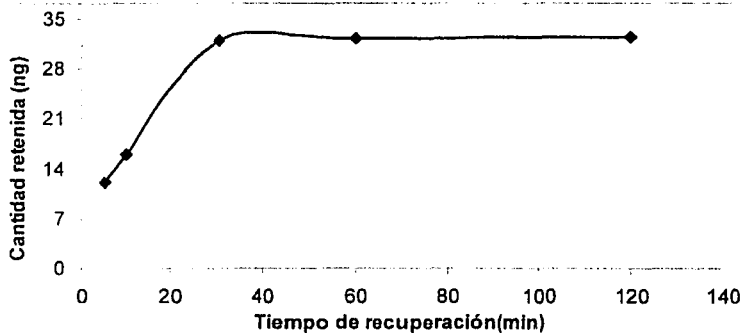


Figura VIII.6. Efecto del tiempo de recuperación del IA entre ciclos de operación sucesivos sobre la cantidad retenida de 2,4-D éster ($n=4$). Cartucho con hidrogel dopado con $300 \mu\text{g}$ de anticuerpo. Muestra de 10 mL a 12 ppb en $\text{PBS } 0.02 \text{ M}$ ($\text{pH}=7.2$) con 1% de ACN , cargada a un flujo de 1 mL/min .

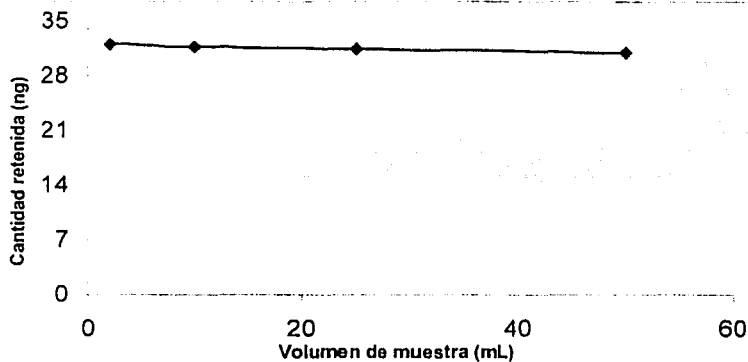


Figura VIII.7. Efecto del volumen de muestra en la retención del 2,4-D éster ($n=4$). Cartucho con hidrogel dopado con $300 \mu\text{g}$ de anticuerpo. Masa fija con 120 ng de soluto en $\text{PBS } 0.02 \text{ M}$ ($\text{pH}=7.2$) con 1% de ACN , cargada a 1 mL/min . Tiempo de recuperación del cartucho $>30 \text{ min}$.

Los resultados obtenidos con el IA muestran que la velocidad de flujo es muy importante en la formación del complejo antígeno-anticuerpo. La velocidad de flujo máxima en la solución de carga debe ser de 1ml/min (figura VIII.5); si se aumenta por encima de esta magnitud la retención cae drásticamente. Lo anterior significa que probablemente la cinética de formación de los complejos no es muy rápida. Cabe señalar que el tiempo de recuperación del cartucho de inmuoextracción entre ciclos de operación sucesivos debe ser al menos de 30 minutos para tener al anticuerpo en su máxima actividad. Por otra parte el complejo antígeno-anticuerpo, una vez formado, parece ser bastante estable puesto que el soluto retenido no es eluido cuando se incrementa el volumen de carga al menos hasta 50 mL (figura VIII.7)

La capacidad de los cartuchos dopados con anti-2,4-D se presenta en la figura VIII.8 y en la tabla VIII.6. Como se observa en la figura, la máxima capacidad de retención del antígeno en el hidrogel dopado con 300 µg de anti 2,4-D es cercana a 32 ng. La recuperación del analito en el eluyente es prácticamente del 100%, mientras no se sobrepasa la capacidad, lo que indica que todo el analito cargado es retenido y recuperado en estas condiciones. Es decir, no hay fuga de analito durante la carga o el lavado del cartucho y todo el compuesto es desorbido con el eluyente.

Por otra parte, la tabla VIII.6 muestra que al aumentar la cantidad de anticuerpo encapsulado en el hidrogel, aumenta la capacidad de retención del cartucho aunque no linealmente. En efecto, la capacidad normalizada (expresada en ng de soluto retenido por mg de anticuerpo) es mayor en el hidrogel con menor contenido de anticuerpo. También se observa como ya se había comentado anteriormente, que los xerogeles rehidratados tienen una mayor capacidad de retención relativa (o normalizada) que cualquiera de los hidrogeles. Un aspecto que se debe subrayar es la buena reproducibilidad obtenida en los experimentos sucesivos de EFS en un mismo cartucho. La desviación estándar relativa o coeficiente de variación en la cantidad de soluto recuperado es menor del 3%. Esto indica que el anticuerpo no se degrada por el uso del cartucho, a pesar de estar en contacto con una mezcla rica en ACN (50%) durante la elución. Sin embargo, los cartuchos de hidrogel

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

con 500 y 700 μg de anticuerpo presentan el problema ya mencionado de un progresivo aumento de presión que los hace rápidamente inutilizables.

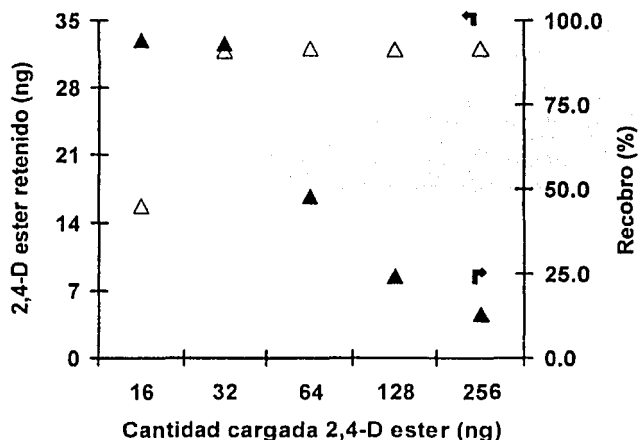


Figura VIII.8. % de Recuperación del analito (▲) y capacidad (△) de los cartuchos de inmunoextracción, hidrogel dopado con 300 μg de anticuerpo. Muestra de 10 ml de 2,4-D éster a diferentes concentraciones en PBS 0.02M (pH=7.2) con 1% de ACN, carga a 1ml/min. Tiempo de recuperación entre experimentos > 30 min.

Durante este trabajo el anti 2,4-D inicialmente adquirido se terminó y fue necesario realizar una nueva compra. Por lo tanto se utilizaron dos diferentes lotes de IgG. Afortunadamente ambos lotes dieron resultados muy similares como se observa en la tabla VIII 6 para los hidrogeles dopados con 500 μg de anticuerpo. Este hecho es importante ya que una de las mayores preocupaciones cuando se trabaja con anticuerpos es la falta de reproducibilidad de lote a lote. Aparentemente este problema comienza a ser controlado, lo que permitiría a futuro un mayor desarrollo y expansión de los métodos analíticos basados en la inmunoextracción.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

También es importante hacer notar que el procedimiento desarrollado en este trabajo para el encapsulamiento de anticuerpos por sol-gel permite obtener IAs con características de retención muy semejantes en geles preparados independientemente y en diferentes fechas. Esto se muestra en la tabla VIII.6 con los dos hidrogeles y las dos xerogeles dopados con 500 µg de anticuerpo.

Tabla VIII.6 Relación entre la masa retenida de 2,4-D éster y la cantidad de anticuerpo inmobilizado.

Anticuerpo encapsulado (µg)	Número de lote	Tipo de gel	n	Cantidad de soluto extraído (ng)	CV (%)	Capacidad Relativa (ng/mg)**
300	1	Hidrogel	9	31.4	1.4	105
500	1	Hidrogel	9	46.7	2.8	93
500	2	Hidrogel	5	47.0	2.9	94
700	1	Hidrogel	9	58.8	1.8	84
500	2	Xerogel	5	62.9	1.1	126
500	2	Xerogel	5	65.2	1.4	130

* Inmunoextracción realizada con 120 ng de 2,4-D éster en 10 ml de una solución que contiene PBS 0.02M (pH 7.2) al 1% de ACN.

** Expresada en ng de soluto extraído por mg de anticuerpo encapsulado.

Una de las variables que afectan la retención de un antígeno para formar el complejo con su correspondiente anticuerpo es la fuerza iónica (figura VIII.9). Los anticuerpos en su medio natural es decir dentro de un ser vivo se encuentran disueltos en fluidos a fuerzas iónicas altas. Los resultados obtenidos mostraron que cuando se trabaja con PBS a concentración < 0.01M la retención del 2,4-D éster disminuye considerablemente; sin embargo a fuerzas iónicas entre 0.1–1.45 M (PBS 0.01-0.15 M) esta retención permanece constante.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Debido a lo anterior, el medio amortiguado empleado en la carga de la muestra y en el almacenamiento del cartucho fue fijado con PBS 0.02M, el cual entra dentro de este intervalo y nos asegura una respuesta adecuada y la conservación de la actividad biológica del anticuerpo.

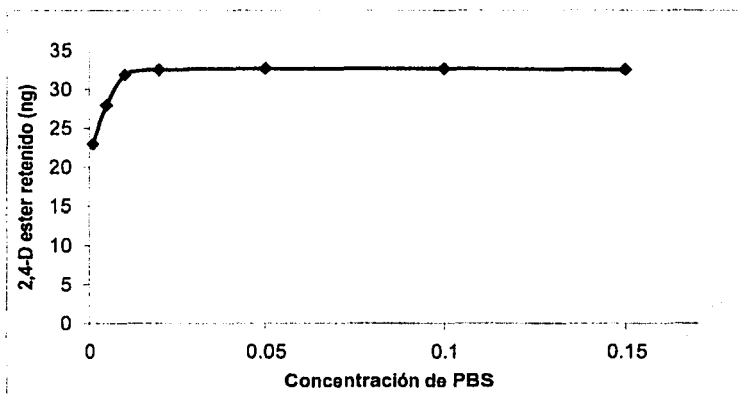


Figura VIII.9. Efecto de la concentración del buffer en la retención del 2,4-D éster. Hidrogel dopado con 300 μg de anticuerpo. Carga de 120 ng de 2,4-D éster en 10 ml de PBS ($\text{pH}=7.2$) a diferentes concentraciones con 1% de ACN. Flujo de 1ml/min. Tiempo de recuperación del cartucho entre experimentos sucesivos > 30 min.

La estabilidad de estos cartuchos fue evaluada con un IA (xerogel) dopado con 500 μg de anticuerpo. La retención observada fue prácticamente constante durante 7 semanas; incluso después de 15 semanas la retención inicial solo disminuyó aproximadamente 32% respecto a su valor inicial. Los resultados se presentan en la figura VIII.10.

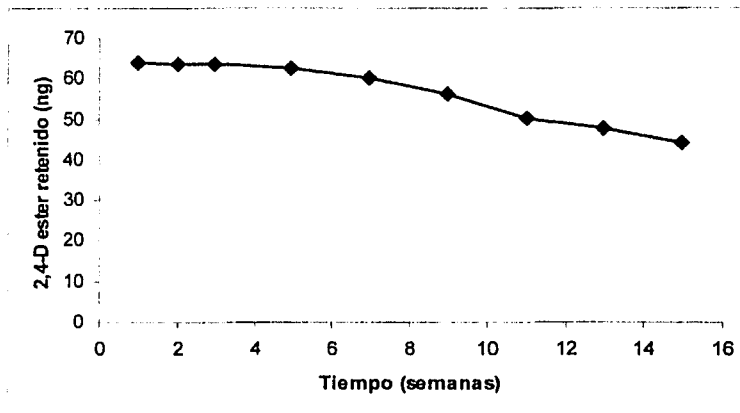
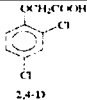
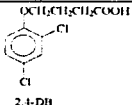
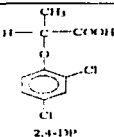
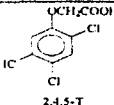
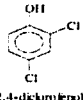
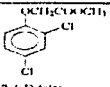
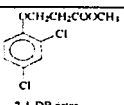
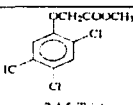


Figura VIII.10. Estabilidad de un IA (xerogel) dopado con 500 µg de anti-2,4-D. El cartucho se mantuvo en refrigeración, con el IA embebido en PBS, entre determinaciones sucesivas. Carga de 120 ng de 2,4-D éster en 10 mL de PBS 0.02M (pH= 7.2) con 1% de ACN a flujo de 1mL/min.

Al realizarse un estudio de reactividad cruzada con otros herbicidas clorofenoxi, sólo los derivados esterificados fueron retenidos (2,4-DB éster metílico y 2,4,5-T éster metílico). La retención de éstos fue menor a la observada para el 2,4-D éster, lo cual sugiere que el anticuerpo efectivamente es más selectivo para el inmunógeno (hapteno + molécula acarreadora) que originó su formación. Cabe señalar que la reactividad cruzada en los anticuerpos puede ser una ventaja, en el sentido de que pueden determinarse analitos estructuralmente análogos al antígeno principal. Los resultados de estos ensayos se presentan en la tabla VIII.7. Cada compuesto fue estudiado en forma independiente utilizando un cartucho de inmunoextracción empacado con xerogel dopado con 500 µg de anticuerpo. La fase de carga contenía 100 ng del soluto respectivo en 10 ml de PBS 0.02M (pH=7.2) con el contenido de ACN adecuado (indicado en la tabla) para evitar la retención no específica. La velocidad de flujo en la carga fue de 1ml/min.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Tabla VIII.7. Reactividad cruzada del IA dopado con 500 µg de anti-2,4-D.

Estructura	Cantidad retenida específicamente (ng)
 <p>2,4-D</p>	No retenido (fase de carga al 0% de ACN)
 <p>2,4-DB</p>	No retenido (fase de carga al 7% de ACN)
 <p>2,4-DP*</p>	No retenido (fase de carga al 1% de ACN)
 <p>2,4,5-T</p>	No retenido (fase de carga al 1% de ACN)
 <p>2,4-diclorofenol</p>	No retenido (fase de carga al 0% de ACN)
 <p>2,4-D éster</p>	63 (fase de carga al 1% de ACN)
 <p>2,4-DB éster</p>	35* (fase de carga al 10% de ACN)
 <p>2,4,5-T éster</p>	20 (fase de carga al 10% de ACN)

* Cantidad total retenida: 45 ng

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Finalmente, considerando el conjunto de ensayos realizados y los resultados obtenidos se establecieron las condiciones optimizadas del protocolo de inmunoeextracción para 2,4-D éster de la siguiente manera:

- a) La composición de la fase de carga es con PBS 0.02 M pH 7.2 al 1% de ACN.
- b) La velocidad de flujo óptima de carga es de 1 ml/ min para reducir el tiempo de análisis sin afectar la retención del analito.
- c) Dependiendo de los fines de la EFS (limpieza de muestra ó preconcentración) es posible cargar hasta 50 mL de muestra sin fuga del analito, siempre y cuando la cantidad total de éste no sobrepase la capacidad del cartucho.
- d) Después de la carga, el cartucho se lava con 2 mL de agua a 0.5 mL/min para desalojar el PBS del volumen intersticial y eliminar otros compuestos interferentes no retenidos específicamente.
- e) El volumen óptimo de elución es de 2 mL con ACN al 50% en agua. Estas condiciones permiten la recuperación total del analito retenido en un pequeño volumen de eluyente para alcanzar un alto grado de preconcentración.
- f) El tiempo de recuperación mínimo que requiere el IA entre cada muestra procesada es de al menos 30 minutos.

Es necesario señalar que con estos IAs no se montó un método analítico para aguas naturales debido a que los derivados esterificados tienen tiempos de vida media muy cortos en este medio. Los productos de esta hidrólisis son los ácidos clorofenoxi que el anticuerpo no puede reconocer.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

8.4. EVALUACIÓN DE LOS IAs DOPADOS CON ANTI-CLORTOLURÓN.

Los resultados obtenidos en la determinación de actividad de estos anticuerpos fueron negativos para el antígeno principal (clortolurón), sin embargo se realizó el encapsulamiento de éstos para evaluar una posible reactividad cruzada con analitos estructuralmente análogos de la familia de las fenilureas. Ninguno de los compuestos ensayados (diurón, neburón, fluormeturón, linurón, monurón, isoproturón) fue retenido, lo cual confirma que la fracción IgG utilizada no presentaba actividad biológica.

8.5. EVALUACIÓN DE LOS GELES DOPADOS CON ANTI-MALATIÓN.

8.5.1. Análisis cromatográfico (linealidad de la respuesta del detector).

Se evaluó la respuesta del detector UV frente a diferentes concentraciones del pesticida malatión. El comportamiento se muestra en la figura VIII.11.

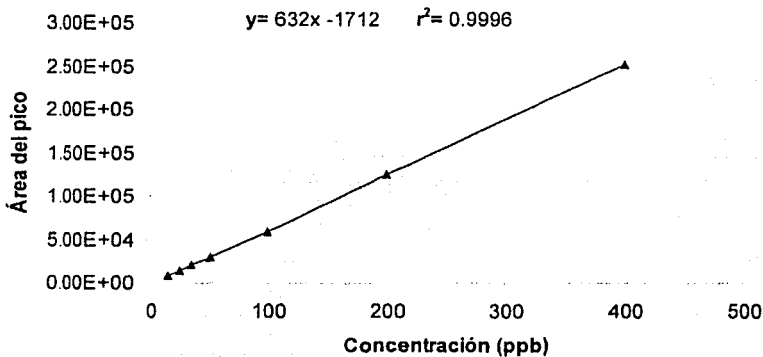


Figura VIII.11. Respuesta del detector UV (215 nm) frente a distintas concentraciones del pesticida malatión.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

La correlación obtenida de 0.9996, al realizar la evaluación por mínimos cuadrados de los datos, indica un comportamiento lineal de la respuesta del detector como función de la concentración de este pesticida en el intervalo de 15-400 ppb. Este estudio se llevó a cabo utilizando un rizo de 100 μ L en el inyector lo cual representa una masa inyectada de 1.5-40 ng. La posterior cuantificación del malatión en los estudios efectuados para evaluar la cantidad de antígeno enlazado al anticuerpo se llevó a cabo por estandarización externa inyectando un solo estándar.

8.5.2. Efecto de algunas modificaciones realizadas en el proceso de encapsulamiento

Se realizaron modificaciones menores en el método de preparación del gel para aumentar el rendimiento de la reacción. Estas condiciones consistieron simplemente en someter el recipiente con el sol a una agitación manual leve, en repetidas ocasiones, durante el tiempo de hidrólisis (tiempo transcurrido entre la sonicación y la desestabilización con PBS). Además se constató que el recipiente utilizado en la reacción podía tener una influencia decisiva en las propiedades del gel finalmente obtenido. Cuando dicho recipiente presentaba defectos o rugosidades en sus partes internas o residuos de algún uso anterior, los geles formados resultaban lechosos y quebradizos en vez de transparentes y flexibles y se perdía totalmente la actividad del anticuerpo encapsulado. Por lo tanto, una condición adicional para lograr obtener un material sol-gel adecuado y activo es utilizar material de vidrio de buena calidad, con paredes internas bien lisas y perfectamente limpio.

La pequeña modificación introducida en el proceso influyó notablemente en la cantidad de biomaterial obtenido. Debido a ello, los nuevos geles tuvieron que ser empacados en jeringas de plástico de mayor volumen. El resultado observado se presenta en la tabla VIII.8.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Tabla VIII.8. Aumento del rendimiento de la reacción por efecto de la agitación del sol durante el proceso.

Sin agitación del sol g de gel húmedo obtenido	Con agitación del sol g de gel húmedo obtenido
$\bar{X} = 3.6$ g (n=3)	$\bar{X} = 4.7$ g (n=3)

8.5.3. Evaluación de los IAs dopados con anti-malati6n

Despu6s de establecer las condiciones cromatogr6ficas para la cuantificaci6n del malati6n, se procedi6 a realizar un estudio para establecer las condiciones 6ptimas de operaci6n del IA dopado con anti-malati6n. En la tabla VII.6, se presentan las condiciones evaluadas en cada paso de la inmunoeextracci6n

El primer proceso a optimizar fue la eluci6n, para asegurar que todo el analito retenido en el IA fuera recuperado en este paso. El cartucho se carg6 con una soluci6n de malati6n en PBS (volumen, cantidad de analito y velocidad de flujo fijos), se lav6 con 2 mL de agua y se eluy6 con mezclas ACN:H₂O, aumentando progresivamente la proporci6n de disolvente org6nico. Se observ6 que a partir de un contenido de 60% de ACN en el eluyente, la cantidad de malati6n recuperado en el eluato permaneci6 constante, por lo que qued6 establecida esta composici6n para la eluci6n. Posteriormente se vari6 la velocidad de flujo del eluyente (con la composici6n antes mencionada) entre 1 y 7 mL/min. No se detect6 ning6n efecto de este par6metro en la recuperaci6n del compuesto pero, debido a que en los geles (hidrogeles o xerogeles) se dificulta la eluci6n de la soluci6n con disolvente org6nico y sobre todo si la percolaci6n es a altos flujos, se decidi6 fijar la velocidad de eluci6n a 1 ml/min para los ensayos subsecuentes.

Respecto al acondicionamiento del cartucho de inmunoeextracci6n, se observ6 que no existe diferencia al realizarlo a un flujo entre 0.5 y 2 mL/min. El lavado posterior con 2 mL de agua grado reactivo a un flujo de 0.5 mL/min tuvo por efecto el de mejorar

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

apreciablemente la cuantificación, ya que permitió obtener un mejor cromatograma (cromatograma más limpio y menos perturbaciones en la línea base).

El estudio de la composición y volumen de las soluciones de carga y lavado tuvo por objeto encontrar condiciones que permitieran eliminar la retención no específica del malatión en la matriz de sílice sin afectar su enlazamiento al anticuerpo. Se trabajó paralelamente con un cartucho empacado con gel blanco y un cartucho empacado con IA. Estos ensayos mostraron que era necesario cargar por lo menos 25 mL de muestra con 2% de ACN en el PBS y lavar con 2 mL de una mezcla ACN:H₂O al 4% de este solvente, para obtener los resultados deseados.

Las condiciones mencionadas fueron debidas a que, por una parte, el malatión mostró una tendencia relativamente fuerte a adsorberse en la matriz de sílice y, por otra parte, la formación de complejo antígeno-anticuerpo presentó cierta dificultad. Aparentemente el enlazamiento del malatión con su anticuerpo requiere de un contenido muy bajo de ACN ($\leq 2\%$) en el PBS de la solución de carga, aunque una vez que se logra formar el complejo éste resulta bastante estable. Sin embargo, con ese contenido de ACN en la fase de carga no es posible evitar la retención no específica del malatión en la matriz del gel, especialmente cuando se cargan pequeños volúmenes de muestra. Al aumentar el volumen de carga, la propia muestra provoca la desorción del compuesto retenido por interacciones débiles, eluyéndolo en el caso del cartucho con gel blanco, o bien, liberándolo de la matriz, para que pueda interactuar con los sitios activos libres de las moléculas de anticuerpo en el caso del cartucho con IA. El posterior lavado con ACN al 4% en agua a un flujo pequeño (0.5 mL/min) permite eliminar los últimos residuos de analito adsorbido en la sílice, sin afectar al complejo malatión-anti-malatión ya formado.

En cuanto a la velocidad de flujo durante la carga (figura VIII.12), se observó que el cartucho empacado con gel anti-malatión puede trabajarse hasta a 4mL/min, sin que las propiedades de retención se vean afectadas. Sin embargo, al igual que los geles dopados con anti-2,4-D, es necesario dar un tiempo de reposo al anticuerpo, entre ciclos sucesivos

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

de operación, manteniendo los geles en PBS durante un mínimo de 30 min, de modo que la biomolécula se encuentre en condiciones adecuadas para recibir al soluto.

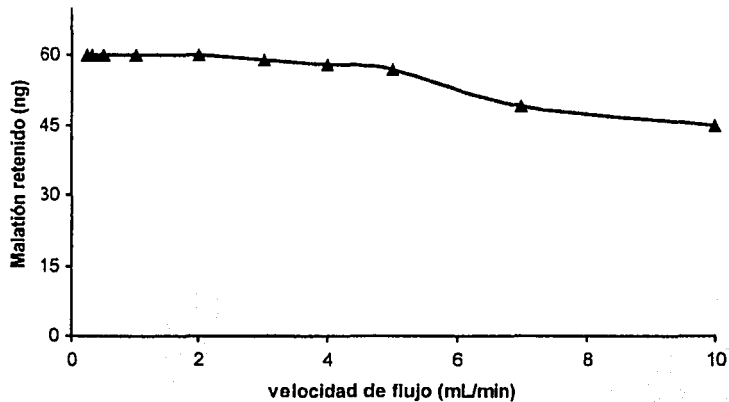


Figura VIII.12. Efecto de la velocidad de flujo durante la carga en la retención de malatión ($n=4$). Cartucho con xerogel dopado con 500 μg de anticuerpo. Carga de 100 ng de malatión en 25 ml de PBS 0.02M ($\text{pH}=7.2$) al 2% de ACN.

El efecto del volumen de muestra cargado se ilustra en la figura VIII.13. La capacidad de retención específica de este IA no se afecta cuando se incrementa considerablemente el volumen de muestra percolado. El aumento en la cantidad de analito retenido a bajos volúmenes de carga es debido únicamente a la retención no específica.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

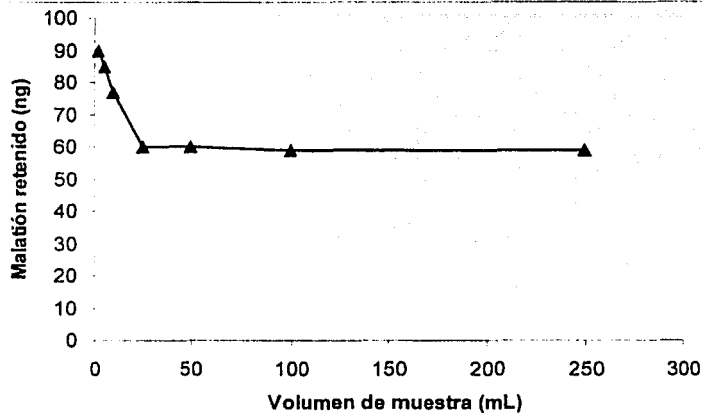


Figura VIII.13. Efecto del volumen de muestra en la retención de malatión (n=3). Cartucho con xerogel dopado con 500 μ g de anticuerpo. Carga de 100 ng de malatión en diferentes volúmenes de PBS 0.02M (pH=7.2) con 2% de ACN a flujo de 4 mL/min.

La capacidad de los cartuchos fue evaluada cargando cantidades progresivamente mayores de analito en un volumen fijo de 25 mL. Los resultados mostrados en la figura VIII.14 indican que el IA con anti-malatión (xerogel dopado con 500 μ g) retiene hasta 60 ng de malatión. La recuperación es de prácticamente 100% para cantidades cargadas del analito no mayores a la capacidad del cartucho.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

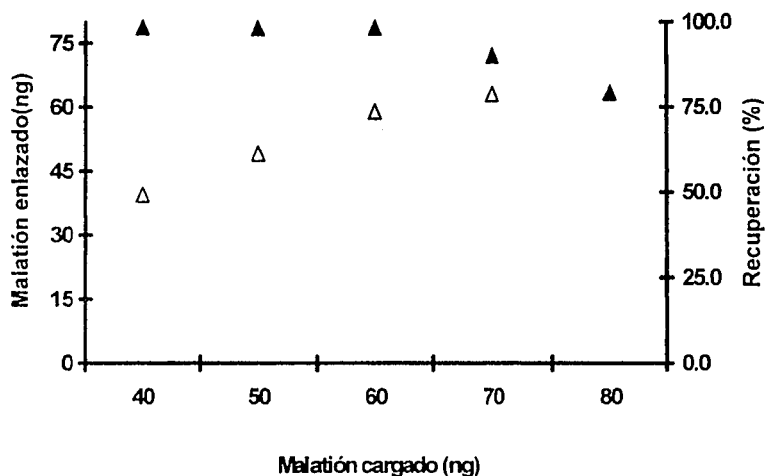


Figura VIII.14. % de Recuperación del analito (▲) y capacidad (Δ) de los cartuchos de inmunoadsorción (xerogel dopado con 500 μ g de anticuerpo).

La tabla VIII.9, muestra la capacidad determinada en IA con diferentes cantidades de anticuerpo. Lógicamente a mayor cantidad de anticuerpo mayor capacidad; sin embargo el incremento no es proporcional. En estos ensayos se trabajó con geles no secados (hidrogeles) y con geles secados hasta pérdida del 50 % de su peso, respecto al peso del gel húmedo inicial (xerogeles). Los xerogeles dieron mejores resultados en cuanto a capacidad y propiedades mecánicas del soporte, por esta razón se prefirió continuar el trabajo con ellos.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Tabla VIII.9. Capacidad de IAs para malatión con diferentes cantidades de anticuerpo encapsulado.

Empacado	IA con Anti malatión		
	Anticuerpo encapsulado (μg)		
	300	500	1000
	Capacidad absoluta (ng)		
Hidrogel	25	48	-
Xerogel	32	60	97
	Capacidad relativa (ng/mg)		
Hidrogel	83	96	-
Xerogel	107	120	97

La estabilidad de los cartuchos dopados con anti-malatión fue excelente (figura VIII.15), los resultados mostraron que por al menos 10 semanas (almacenados en refrigeración entre ensayos sucesivos) los cartuchos conservan sus propiedades de retención iniciales. Por otra parte, también se comprobó que estos cartuchos son estables respecto al uso repetido (entre 60-80 ciclos de adsorción-desorción), sin que se altere su capacidad de retención.

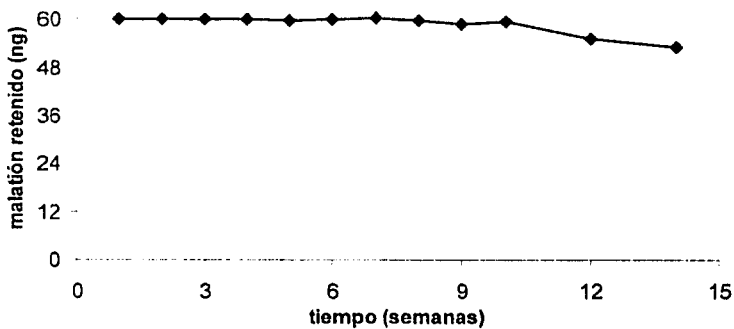


Figura VIII.15. Estabilidad del IA (xerogel) dopado con 500 μg de anticuerpo. El cartucho se guardó en refrigeración, con el gel embebido en PBS, entre ensayos sucesivos.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

VIII. Resultados 102

Se trató de determinar la reactividad cruzada de este IA con un metabolito y un isómero del malatión, el oxomalatión y el isomalatión respectivamente. Sin embargo, estos compuestos dieron una muy pobre respuesta en el sistema cromatográfico, aunque se ensayaron varias longitudes de onda para tratar de mejorar la sensibilidad de detección. A pesar de lo anterior, se realizaron cargas hasta con 200 ng de cada analito en 25 mL de PBS al 2% de ACN. Al analizar los eluatos obtenidos no se observó ninguna señal correspondiente a estos compuestos en los cromatogramas. Esto indica que el oxomalatión y el isomalatión no son reconocidos por el anticuerpo, o bien, que la cantidad enlazada es pequeña y no alcanza a detectarse bajo las condiciones experimentales usadas. Las estructuras del malatión y sus análogos se presentan en la figura VIII.16.

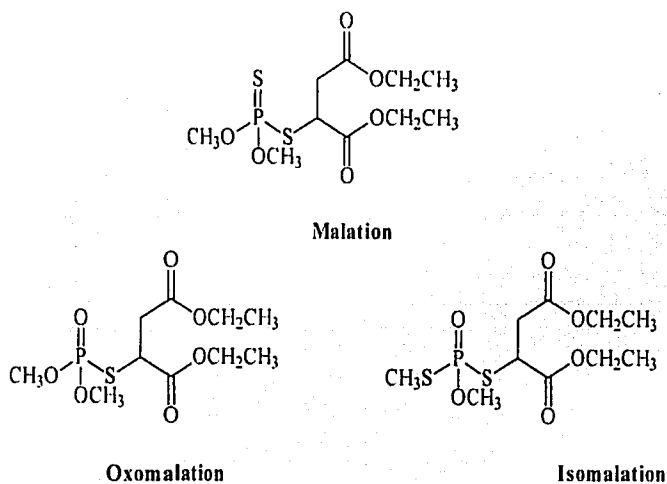


Figura VIII.16. Analitos empleados en la evaluación del IA dopado con anti-malatión.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Finalmente el protocolo de inmuoextracción optimizado quedó establecido de la siguiente manera:

1. El cartucho de inmuoextracción sacado del refrigerador se equilibra a la temperatura ambiente por una hora. Luego se lava con 15 mL de PBS 0.02M (pH=7.2) a un flujo de 2 mL/min.
2. A la muestra a analizar se le adicionan las alícuotas apropiadas de PBS y ACN de modo que la concentración final de estos reactivos sea aproximadamente 0.02M para el primero y 2% (v/v) del segundo.
3. La muestra se carga en el cartucho a flujo ≤ 4 mL/min. El volumen de muestra cargado debe estar entre 25 y 250 mL dependiendo de la concentración estimada del malatión. La cantidad total de este soluto en el volumen cargado no debe sobrepasar la capacidad del cartucho.
4. El cartucho se lava con 2 mL de una mezcla ACN:H₂O 4:96 (v/v) a flujo de 0.5 mL/min.
5. El analito retenido se eluye con 2 mL de una mezcla de ACN:H₂O 60:40 (v/v) a un flujo de 1 mL/min.
6. Para regenerar el cartucho, éste se lava con 4 mL más de la mezcla anterior seguidos por 10 mL de agua y 15 mL de PBS 0.02 M. El extremo inferior del cartucho (o jeringa) se sumerge en PBS y el IA cubierto por este buffer, se deja reposar por al menos 30 min antes de ser usado nuevamente.

8.6. ESTABLECIMIENTO Y EVALUACION ESTADISTICA DE UN MÉTODO ANALÍTICO PARA LA DETERMINACIÓN DE TRAZAS DE MALATIÓN EN MUESTRAS ACUOSAS.

8.6.1. Establecimiento del método.

Para establecer el método analítico se tomaron en cuenta los siguientes factores:

-El límite inferior del intervalo lineal definido para el análisis de malatión por cromatografía de líquidos corresponde a una cantidad inyectada de 1.5 ng de este soluto.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

- Al terminar el proceso de inmunoestracción el analito es recuperado en 2 ml del eluyente. De este último se inyectaron 100 μ L al cromatógrafo de líquidos para realizar la cuantificación.

- Se pretende determinar concentraciones de malatión en aguas naturales a niveles cercanos a la parte por billón (ppb) por ser de este orden las concentraciones máximas permitidas por organismos oficiales para pesticidas en este tipo de aguas. Por lo tanto se decidió trabajar con un volumen de muestra de 50 mL.

Las etapas del método analítico fueron las siguientes:

ETAPA 1. Fijación de pH y fuerza iónica en la muestra con PBS 1M (para no tener efecto de dilución) de modo que se obtenga una concentración aproximada de PBS 0.02M. Se deja reposando la muestra 24 hrs en refrigeración ya que, dependiendo del tipo de agua, puede presentarse la precipitación de algunas sales de fosfato.

ETAPA 2. Para eliminar el posible precipitado y otras sustancias suspendidas se realiza la filtración de la muestra al vacío utilizando una membrana de Nylon 66 con poro de 0.40 μ m. Al filtrado se le agrega ACN hasta una concentración del 2% v/v

ETAPA 3. Inmunoestracción (de acuerdo al protocolo optimizado).

ETAPA 4. Análisis cromatográfico de los eluatos obtenidos.

Las muestras sintéticas dopadas con solución estándar de malatión fueron colocadas en frascos color ámbar y tratadas según lo descrito en las etapas 1-4.

8.6.2. Evaluación del método analítico para la determinación de malatión

8.6.2.1. Linealidad del método.

La gráfica obtenida de la linealidad del método se presenta en la figura VIII.17.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

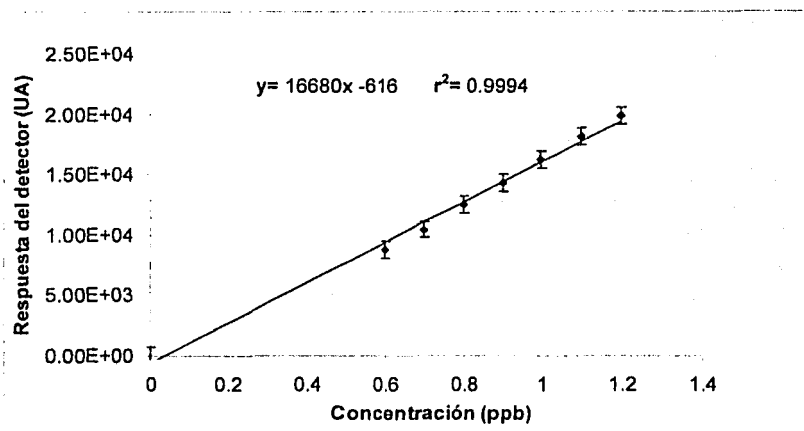


Figura VIII.17. Linealidad del método analítico para la determinación de malatión. Muestras de 50 mL de agua dopada a distintas concentraciones, fueron extraídas y preconcentradas en un IA con 500 μg de anticuerpo y analizadas por cromatografía de líquidos con detección UV a 215 nm.

Las pruebas de hipótesis realizadas sobre el coeficiente de correlación (r), la pendiente (b) y la ordenada al origen (a) fueron las siguientes:

Para r

Hipótesis nula H_0 : Que no existe correlación lineal entre "x" y "y"

Hipótesis alterna H_a : Que sí existe una correlación lineal entre "x" y "y"

Si $t_{\text{calculada}} > t_{\text{tablas}}$ se rechaza H_0

Para b

Hipótesis nula H_0 : $b=0$ (la línea de regresión es horizontal)

Hipótesis alterna H_a : $b \neq 0$

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

VIII. Resultados 106

Se rechaza H_0 si el valor calculado para el estadístico t_0 :

Es mayor que el valor del estadístico, $t_{\alpha/2}$

Es menor que el valor del estadístico, $-t_{\alpha/2}$

Al nivel de probabilidad estudiado

Para a

Hipótesis nula H_0 : $\alpha = 0$ (la intersección con el eje de las ordenadas es cero)

Hipótesis alterna H_A : $\alpha \neq 0$

Se rechaza H_0 si el valor calculado para el estadístico t_0 :

Es mayor que el valor del estadístico, $t_{\alpha/2}$

Es menor que el valor del estadístico, $-t_{\alpha/2}$

Al nivel de probabilidad estudiado

Los resultados de estas pruebas se presentan en la tabla VIII.10. Las fórmulas empleadas para el cálculo se encuentran en el anexo A de este trabajo.

**Tabla VIII.10. Resultados de la prueba de hipótesis para los coeficientes r, a y b.
(n=7, $\alpha=0.05$)**

Malatión			
Coeficiente	t calculada	t crítica	Decisión
r	32.6	2.57	Rechazar H_0
a	-1.38	2.57	Aceptar H_0
b	32.4	2.57	Rechazar H_0

De acuerdo con la tabla anterior y por medio de la prueba de hipótesis realizada sobre el coeficiente r quedó demostrada la correlación lineal entre x y y. Por otro lado, con la prueba de hipótesis de la ordenada al origen y con su intervalo de confianza ($\alpha=0.05$), que se muestra en la tabla VIII.11 se puede concluir que no existen errores sistemáticos en el método.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Tabla VIII.11. Intervalo de confianza para el coeficiente a.

Pesticida	Intervalo de a
Malatión	-2741 < a < 1509

El intervalo de linealidad del método para volúmenes de carga de 50 ml empleando un IA (xerogel) con 500 µg de anti-malatión se presenta en la tabla VIII.12.

Tabla VIII.12. Intervalo de linealidad del método para la determinación de malatión.

Pesticida	Intervalo (ppb)	Intervalo en masa (ng)
Malatión	0.6- 1.2	30 a 60

8.6.2.2. Precisión, exactitud, límite de detección y límite de cuantificación.

La exactitud y precisión del método fueron establecidas a partir de los resultados obtenidos en agua dopada con malatión a 1.2 µg/L empleando un volumen de carga de 50 mL. En las tablas VIII.13 y VIII.14. se muestran los parámetros calculados mediante el análisis estadístico de los datos.

Tabla VIII.13. Precisión del método analítico para la determinación de trazas de malatión en muestras de agua.

Analito	%R	s (ng/mL)	CV (%)
Malatión	95.0	0.051	4.5

Donde

R=recuperación

s=desviación estándar

CV= coeficiente de variación

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

De acuerdo con los resultados de la tabla VIII.21. la precisión del método, evaluada por el coeficiente de variación, es menor al 5%, lo que representa un resultado bastante bueno dado el bajo nivel de concentración del malatión en estas muestras.

La exactitud se evaluó comparando la concentración a la que fueron dopadas las muestras con el valor promedio de concentración obtenido en su análisis. Para decidir si la diferencia entre la media muestral \bar{X} y el valor verdadero μ es significativa, se utilizó la ecuación 24 del Anexo A. Los resultados de la evaluación se presentan en la tabla VIII.14. Como puede observarse, el valor de $t_{calculado}$ es menor que el valor t_{tablas} (nivel de confianza del 95%) por lo tanto se acepta la hipótesis nula, es decir el método para la determinación de malatión es exacto.

Tabla VIII.14. Parámetros estadísticos para la determinación de la exactitud (n=7).

Pesticida	Concentración cargada (μ) ng/mL	Concentración determinada por el método (\bar{X}) ng/mL	Desviación estándar (s) ng/mL	t tablas $\alpha=0.05$ n-1 g.l.	t calculada
Malatión	1.20	1.14	0.051	2.45	0.7

Para determinar los límites de detección (LDD) y cuantificación (LDC) del método analítico existen dos procedimientos distintos (anexo A). El primero se basa en la ecuación de regresión obtenida en el estudio de linealidad del método (figura VIII.17). El segundo se basa en la desviación estándar obtenida (tabla VIII.14) al analizar un mínimo de 7 réplicas de una muestra dopada con el analito de interés, a concentraciones no mayores a diez veces el valor del límite de detección esperado. La comparación de los valores calculados para LDD y LDC por ambos procedimientos se muestra en la tabla VIII.15.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Tabla VIII.15. Comparación de los LDD y LDC del método para la determinación de malatión en muestras de agua, obtenidas por 2 procedimientos distintos (anexo A, ecuaciones 17-23).

Procedimiento 1	
LDD ($\mu\text{g/L}$)	LDC ($\mu\text{g/L}$)
0.40	0.70
Procedimiento 2	
LDD ($\mu\text{g/L}$)	LDC ($\mu\text{g/L}$)
0.20	0.51

Los valores obtenidos demuestran que el método analítico, tal como fue establecido, es bastante sensible y permite cuantificar el malatión a concentraciones inferiores a la parte por billón. Estos niveles de concentración son compatibles con lo establecido por la USEPA y NPS (Environmental Protection Agency y National Pesticide Survey de E.U.) para la calidad del agua. Las normas europeas son más estrictas ya que establecen una concentración máxima admisible de 100 ppt (partes por trillón) por pesticida individual. Sin embargo, cabe recordar que el IA para malatión puede ser cargado con volúmenes de muestra más grandes (al menos hasta 250 mL) por lo que es factible reducir los límites mostrados en la tabla VIII.23 hasta cinco veces. El LDD y LDC obtenido por el procedimiento 2 es más adecuado para el análisis de muestras ambientales ya que es el más recomendado por la USEPA.

8.6.2.3. Aplicación del método en muestras reales (agua de la presa Tenango).

El IA se aplicó en el análisis de muestras de agua superficial para observar su comportamiento con una matriz compleja. Se empleó como fuente hídrica la presa Tenango situada en la Sierra Norte del estado de Puebla. El análisis fisicoquímico realizado a estas muestras de agua se presenta en la tabla VIII.16.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Tabla VIII.16. Estudio fisicoquímico del agua de la presa Tenango.

Determinación	Valor
pH	7.05-7.10
Determinación	Valor (ppm)
Alcalinidad (como bicarbonatos)	48.5 ± 0.5
Cloruros	10.2 ± 0.4
Dureza Cálcica	79.8 ± 0.8
Dureza Magnésica	15.3 ± 0.7
Dureza Total	95.1 ± 0.7
Sólidos disueltos	215.7 ± 1.3
Sulfatos	29.3 ± 1.2

Para demostrar la especificidad del método analítico montado se emplearon 2 pesticidas distintos estructuralmente, el metiocarb (un carbamato) y el metilparatión (organofosforado). En matraces aforados de 50 ml se colocaron 1 mL de PBS 1M, 1 mL de ACN, una alícuota de una mezcla estándar de metiocarb, metilparatión y malatión (correspondiente a 60 ng de cada analito) y se llevó a volumen con el agua de presa. De manera idéntica se preparó una muestra blanco excepto por la adición de la mezcla estándar de analitos. La muestra blanco y una muestra fortificada fueron analizadas de acuerdo con el método establecido. Para realizar una comparación, otra muestra fortificada fue analizada efectuando el paso de extracción y preconcentración en un adsorbente clásico (cartucho de fase reversa C-18). Los cromatogramas obtenidos al inyectar los eluatos de los tres cartuchos se presentan en la figura VIII.18. Se puede observar que el IA es claramente específico para malatión, mientras que el adsorbente de fase reversa no presenta ninguna selectividad respecto a estos 3 pesticidas. La cantidad recuperada de malatión en el IA fue de 55 ng es decir, su porcentaje de recuperación fue de 92%.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

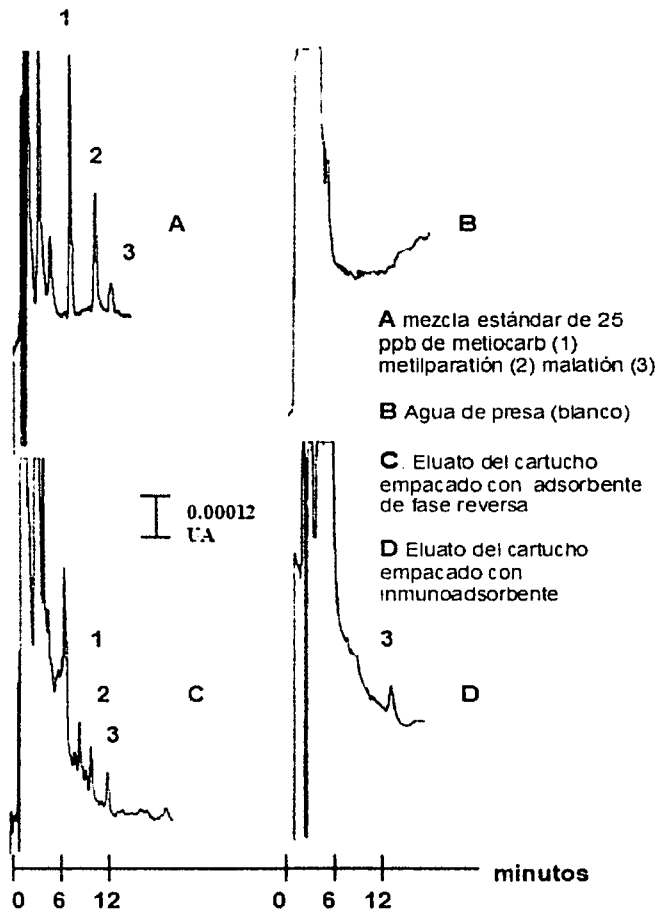


Figura VIII.18. Ensayo de especificidad del IA dopado con anti-malatión. Los cartuchos de EFS (IA y fase C-1E) fueron cargados con 50 mL de una muestra de agua de presa conteniendo los 3 analitos a concentración de 1.2 ppb y eluidos con 2 mL de una mezcla de ACN:H₂O 60:40 (v/v). La muestra blanco se trató en un cartucho de inmunoeextracción.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

8.7. EVALUACIÓN DE LOS GELES DOPADOS CON ANTI-ATRAZINA.

8.7.1. Análisis cromatográfico (linealidad de la respuesta del detector).

Se evaluó la respuesta del detector UV frente a diferentes concentraciones de los herbicidas simazina, atrazina y propazina. El comportamiento se muestra en la figura VIII.19.

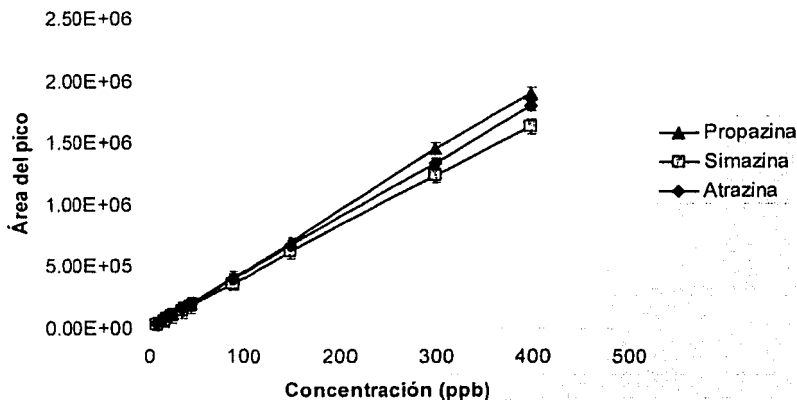


Figura VIII.19. Respuesta del detector UV (220 nm) frente a distintas concentraciones de los herbicidas simazina, atrazina y propazina. Volumen inyectado 100 μ L.

En la tabla VIII.17, se presentan los resultados del análisis estadístico de los datos por mínimos cuadrados (anexo A). Las correlaciones obtenidas > 0.998 indican un comportamiento lineal de la respuesta del detector como función de la concentración de los herbicidas en el intervalo de 8-400 ppb. Este estudio fue realizado con volúmenes de inyección de 100 μ L, lo cual representa una masa inyectada de 0.8-40 ng. La posterior

cuantificación de la atrazina en los estudios efectuados para evaluar la cantidad de antígeno principal enlazado se llevó a cabo por estandarización externa inyectando un solo estándar.

Tabla VIII.17. Regresión lineal de la respuesta del detector.

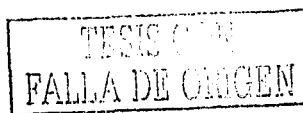
Herbicida	Ecuación de regresión $y=bx+a$	Coefficiente de determinación r^2
Simazina	$y = 4102x - 3364$	0.9981
Atrazina	$y = 4484x - 2219$	0.9992
Propazina	$y = 4789x - 8218$	0.9987

8.7.2. Evaluación de los IAs dopados con anti-atrazina

Después de establecer las condiciones cromatográficas para la cuantificación de las triazinas, se procedió a realizar un estudio para la evaluación del IA dopado con anti-atrazina. Al igual que en el caso del IA dopado con malatión (ver tabla VII.6.) se modificaron diferentes variables en los pasos de acondicionamiento, carga, lavado y elución del cartucho para encontrar las mejores condiciones de extracción.

Primero se optimizó el paso de elución, cargando y lavando el cartucho de Inmunoextracción bajo condiciones fijas y eluyendo con diferentes volúmenes de mezclas de ACN:H₂O en diferentes proporciones. Se requirió un volumen mínimo de elución de 4 mL y un contenido mínimo de AcCN de 65% para recuperar adecuadamente el antígeno (atrazina). Sin embargo, se observó que en el primer mililitro de eluato no se detectaba la presencia de la atrazina, por lo que éste se descartó recolectando solo los 3 mililitros siguientes. De esta manera se evita la dilución del compuesto recuperado y se obtiene una mayor respuesta del análisis cromatográfico. Para tener un buen control en la medida y recolección de las fracciones del eluato, el flujo de elución se fijó a 0.5 mL/min.

Para el paso de acondicionamiento, el cartucho sacado del refrigerador se equilibró a la temperatura ambiente por una hora y se lavó con 20 mL de PBS 0.02M a pH 7.2. Se comprobó que la velocidad de flujo para este lavado (entre 0.5 y 2 mL/min) no tenía ninguna



VIII. Resultados 114

influencia en los resultados posteriores. También se comprobó que, a diferencia del cartucho con anti-malalión, un lavado extra con agua no aportaba ninguna mejora en la calidad del cromatograma obtenido, por lo que este segundo lavado se suprimió.

Con respecto a la carga, se determinó que el volumen mínimo a percolar debe ser de 25 ml, con un contenido de 1% de ACN en PBS 0.02M (pH=7.2). Con estas condiciones, la atrazina no es retenida en el gel blanco y por el contrario no es eluida del IA. Es decir, las condiciones son adecuadas para no afectar la formación del complejo antígeno-anticuerpo y al mismo tiempo evitar la retención no específica de la atrazina.

El paso de lavado, posterior a la carga, fue en este caso más crítico y difícil de optimizar. Se ensayaron lavados (entre 2 y 5 ml) con mezclas de ACN:H₂O (entre 0 y 7% de disolvente orgánico) pero no se obtuvieron resultados satisfactorios. O bien, se perdía analito al aumentar el volumen de lavado o el contenido de ACN, o el cromatograma del análisis posterior (del eluato) resultaba muy sucio (con muchas perturbaciones) al disminuir ambos parámetros. Finalmente, se obtuvo un buen resultado sin fuga de analito, lavando con 5 ml de solución acuosa de NaCl al 0.9% (p/v) a un flujo de 0.5 mL/min.

Al igual que con los anteriores IAs, el gel con anti-atrazina requiere de un tiempo de reposo de al menos 30 min entre ciclos sucesivos de adsorción-desorción.

En cuanto a la velocidad de flujo durante la carga (figura VIII.20), se observó que el IA puede trabajarse a velocidades de flujo de hasta 5 ml/min, sin que las propiedades de retención se vean afectadas o disminuyan.

El efecto del volumen de muestra se ilustra en la figura VIII.21. La capacidad de retención específica de los IAs no se afecta cuando éstos son cargados con volúmenes de muestra relativamente grandes, de hasta 250 mL.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

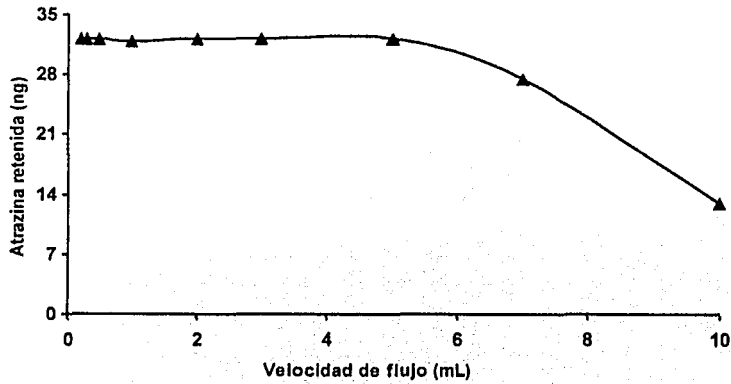


Figura VIII.20. Efecto de la velocidad de flujo durante la carga en la retención de atrazina. Xerogel dopado con 300 μg de anticuerpo. Carga de 100 ng de atrazina en 25 mL de PBS 0.02M (pH=7.2) al 1% de ACN.

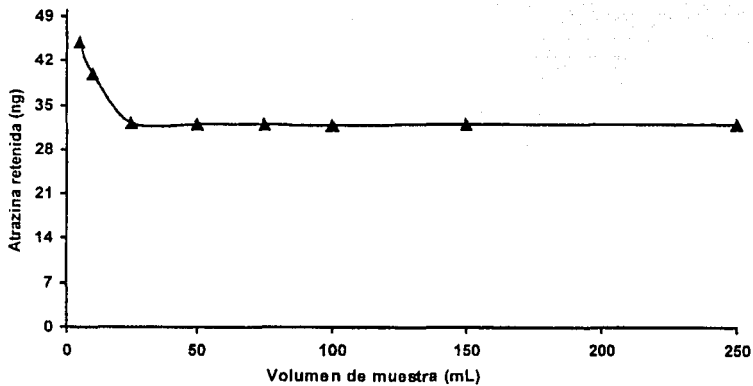


Figura VIII.21. Efecto del volumen de muestra en la retención de atrazina. Xerogel dopado con 300 μg de anticuerpo. Carga de 100 ng de atrazina en diferentes volúmenes de PBS 0.02M (pH=7.2) con 1% de ACN a flujo de 5 mL/min.

TECNOLOGÍA
FALLA DE ORIGEN

La capacidad de los cartuchos fue evaluada empleando cantidades progresivamente mayores de muestra en un volumen fijo de 25 mL. Los resultados se muestran en la figura VIII.22.

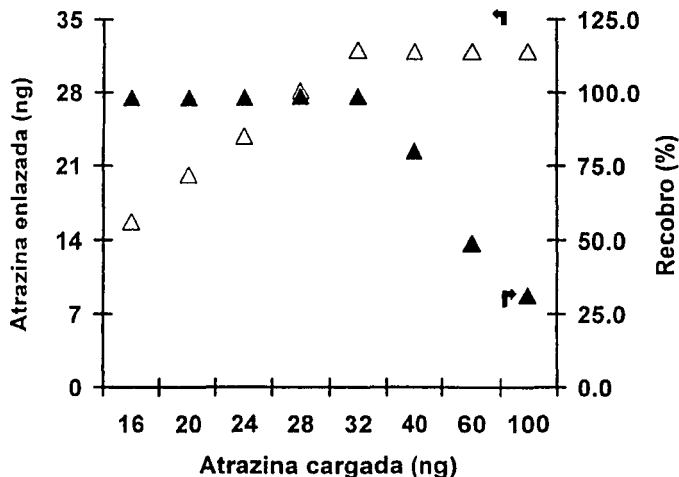


Figura VIII.22. % de Recuperación del analito (▲) y capacidad (△) de los cartuchos de inmunoadsorción. Xerogel dopado con 300 μ g de anticuerpo. Condiciones similares a la figura VIII.21.

Los resultados de evaluación de la capacidad del IA indican que éste al ser dopado con anti-atrazina (300 μ g) retiene cerca de 32 ng de atrazina. La recuperación es de prácticamente 100% para cantidades cargadas del analito no mayores a la capacidad del cartucho. La tabla VIII.18 muestra la capacidad determinada en los IAs con diferentes cantidades de anticuerpo encapsulado. En este estudio sólo se trabajó con xerogeles. La relación anticuerpo encapsulado-atrazina atrapada es más lineal que con los anteriores IAs, por lo que la capacidad relativa es prácticamente idéntica para los 3 xerogeles ensayados.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Tabla VIII.18. Capacidad del IA dopado con anti-atrazina empleando diferentes cantidades de anticuerpo encapsulado.

IA con Anti-atrazina		
Anticuerpo encapsulado (μg)		
300	500	700
Capacidad absoluta (ng)		
32	50	70
Capacidad relativa (ng/mg)		
107	100	100

La estabilidad de los cartuchos dopados con anti-atrazina fue mayor que con los otros IAs (figura VIII.23). Los resultados mostraron que por al menos 10 o 12 semanas los cartuchos conservan sus propiedades de retención iniciales.

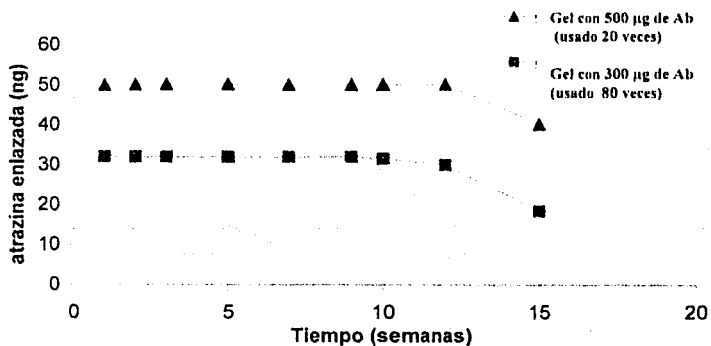


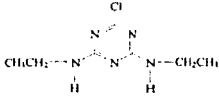
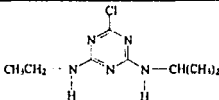
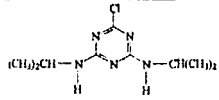
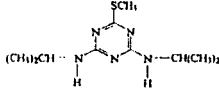
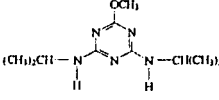
Figura VIII.23. Estabilidad de los cartuchos de inmunoeextracción dopados con diferentes cantidades de anti-atrazina. Los cartuchos se guardaron en refrigeración, con el gel sumergido en PBS, entre ensayos sucesivos.

Al realizarse un estudio de reactividad cruzada con otras triazinas (simazina, propazina, prometón y prometrina), la retención de éstas fue menor a la observada para la atrazina (tabla VIII.19), lo cual sugiere que el anticuerpo efectivamente es más selectivo

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

hacia el hapteno que le dio origen. No obstante, la retención de propazina y simazina es ligeramente menor que de la atrazina, por lo que es posible proponer este IA para el análisis de cualquiera de estas triazinas. Por el contrario, el anticuerpo parece no reconocer al prometón y prometrina ó si estos son reconocidos la cantidad retenida es muy pequeña y no son detectados por el método.

Tabla VIII.19. Reactividad cruzada del IA dopado con 700 µg de anti-atrazina. Cargas independientes de 80 ng de cada triazina en 25 ml de PBS 0.02M (pH=7.2) con 1% de ACN flujo de 5 mL/min.

Estructura	Cantidad retenida (ng)
 <p style="text-align: center;">Simazina</p>	60
 <p style="text-align: center;">Atrazina</p>	70
 <p style="text-align: center;">Propazina</p>	66
 <p style="text-align: center;">Prometrina</p>	-- no detectable
 <p style="text-align: center;">Prometón</p>	-- no detectable

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Finalmente el protocolo de inmunoextracción optimizado para atrazina, simazina o propazina es el siguiente:

1. El cartucho de inmunoextracción sacado del refrigerador se equilibra a temperatura ambiente por una hora y posteriormente se lava con 20 ml de PBS 0.02M (pH=7.2) a flujo de 1mL/min)
2. A la muestra a tratar se le adiciona PBS y ACN de modo que su concentración final sea 0.02M para el primero y 1% (v/v) para el segundo.
3. La muestra se carga en el cartucho a flujo ≤ 5 mL/min. El volumen cargado deberá estar entre 25 y 250 mL dependiendo de la concentración estimada de la atrazina. La cantidad total de analito en el volumen cargado no deberá sobrepasar la capacidad del cartucho para la triazina en cuestión.
4. El cartucho se lava con 5 mL de NaCl acuoso 0.9% (p/v) a flujo de 0.5 mL/min.
5. La triazina retenida se eluye con 4 mL de una mezcla de ACN:H₂O 65:35 (v/v) a flujo de 0.5 ml/min, descartando el primer ml de eluato y colectando los tres siguientes.
6. El cartucho se regenera lavándolo con 2 mL más de eluyente, 10 mL de agua y 20 ml de PBS0.02 M. El IA cubierto por el buffer, se deja reposar por al menos 30 min antes de un nuevo uso.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

8.8. ESTABLECIMIENTO Y EVALUACION ESTADISTICA DE UN MÉTODO ANALÍTICO PARA LA DETERMINACION DE TRAZAS DE SIMAZINA, ATRAZINA Y PROPАЗINA EN MUESTRAS ACUOSAS.

8.8.1. Establecimiento del método.

Considerando los resultados anteriores y las exigencias de los organismos oficiales respecto a las cantidades máximas permisibles de pesticidas en aguas naturales, se decidió trabajar con un volumen de muestra de 50 mL. Las etapas del método analítico fueron las siguientes:

ETAPA 1. Adición de PBS 1M a la muestra para obtener una concentración aproximada de PBS 0.02M. Se deja reposando la muestra 24 hrs.

ETAPA 2. Filtración de la muestra (al vacío) a través de una membrana de Nylon 66 con poro de 0.40 μm , para eliminar el posible precipitado y otras sustancias suspendidas. Adición de ACN al filtrado hasta una concentración de 1% (v/v).

ETAPA 3. Inmunoextracción (de acuerdo al protocolo optimizado).

ETAPA 4. Análisis cromatográfico de los eluatos obtenidos.

Las muestras sintéticas dopadas con solución estándar de simazina, atrazina o propazina a diversas concentraciones fueron colocadas en frascos color ámbar y tratadas según lo descrito en las etapas 1-4.

8.8.2. Evaluación del método analítico para la determinación de simazina, atrazina y propazina.

8.8.2.1. Linealidad del método.

Las gráficas de linealidad del método obtenidas para cada triazina se presentan en la figura VIII.24 y sus correspondientes ecuaciones de regresión en la tabla VIII.20.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

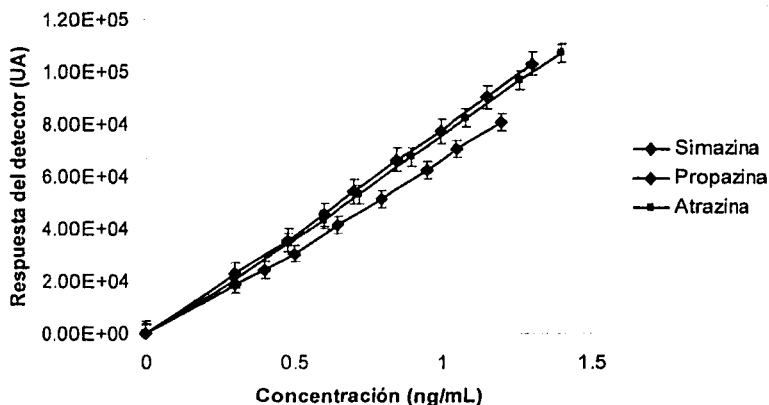


Figura VIII.24. Linealidad del método analítico para la determinación de simazina, atrazina y propazina. Muestras de 50 mL de agua dopada a distintas concentraciones, fueron extraídas y preconcentradas en un IA con 700 μg de anticuerpo y analizados por cromatografía de líquidos con detección a 220 nm

Tabla VIII.20 Ecuaciones de regresión del estudio de linealidad del método.

Herbicida	Ecuación de regresión $y=bx+a$	Coefficiente de determinación r^2
Simazina	$y= 67611x -1852$	0.9980
Atrazina	$y= 77843x -1993$	0.9991
Propazina	$y= 79251x -1305$	0.9993

Las pruebas de hipótesis realizadas sobre el coeficiente de correlación (r), la pendiente (b) y la ordenada al origen (a) fueron las mismas que se presentaron en la páginas 111-112. Los resultados de estas pruebas se presentan en la tabla VIII.21. Las fórmulas empleadas para el cálculo se encuentran en el anexo A de este trabajo.

Tabla VIII.21. Resultados de las pruebas de hipótesis sobre los coeficientes r, a y b. (n=9, $\alpha=0.05$)

Simazina			
Coeficiente	t calculada	t crítica	Decisión
r	59.77	2.36	Rechazar Ho
a	-2.19	2.36	Aceptar Ho
b	59.69	2.36	Rechazar Ho
Atrazina			
r	92.49	2.36	Rechazar Ho
a	-2.07	2.36	Aceptar Ho
b	92.30	2.36	Rechazar Ho
Propazina			
R	100.66	2.36	Rechazar Ho
a	-2.04	2.36	Aceptar Ho
b	100.50	2.36	Rechazar Ho

De acuerdo con la tabla anterior se demuestra estadísticamente que existe una correlación lineal entre la concentración del analito en la muestra y la respuesta del detector, además se demuestra que el método analítico desarrollado no presenta errores sistemáticos. Los intervalos de confianza para la ordenada al origen ($\alpha=0.05$) se muestran en la tabla VIII.22.

Tabla VIII.22. Intervalos de confianza para el coeficiente a.

Herbicida	Intervalo
Simazina	$-4842 < a < 1138$
Atrazina	$-4707 < a < 721$
Propazina	$-3737 < a < 1127$

El intervalo de linealidad del método para volúmenes de carga de 50 mL empleando un IA dopado con 700 μ g de anti-atrazina se presenta en la tabla VIII.23.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Tabla VIII.23. Intervalos de linealidad del método para cada herbicida.

Herbicida	Intervalo (ppb)	Intervalo en masa (ng)
Simazina	0.3 a 1.2	15 a 60
Atrazina	0.3 a 1.4	15 a 70
Propazina	0.3 a 1.3	15 a 65

8.8.2.2. Precisión, exactitud, límites de detección y de cuantificación.

La exactitud y la precisión del método fueron establecidas a partir de los resultados obtenidos en el análisis de 7 réplicas de agua dopadas con simazina, atrazina o propazina a 0.7 $\mu\text{g/L}$ empleando un volumen de carga de 50 mL. En las tablas VIII.24 y VIII.25 se reportan los parámetros calculados mediante el análisis estadístico de los datos (fórmulas correspondientes en el anexo A).

Tabla VIII.24. Precisión del método analítico para la determinación de trazas de triazinas en muestras de agua.

Analito	%R	s (ng/mL)	CV(%)
simazina	98.0	0.029	4.3
Atrazina	99.5	0.027	3.9
propazina	99.0	0.031	4.5

Donde

R= recuperación

s= desviación estándar

CV= coeficiente de variación

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Tabla VIII.25. Parámetros estadísticos para la determinación de la exactitud (n=7).

Herbicida	Concentración cargada (μ) (ng/mL)	Concentración determinada por el método (\bar{X}) ng/mL	Desviación estándar (s) (ng/mL)	t tablas $\alpha=0.05$ n-1 g.l.	t calculada
Simazina	0.70	0.68	0.029	2.45	0.31
Atrazina	0.70	0.69	0.027	2.45	0.16
Propazina	0.70	0.69	0.031	2.45	0.14

De acuerdo con los resultados de la tabla VIII.24, la precisión del método evaluada como CV, es < 5% para las 3 triazinas, lo cual se puede considerar excelente cuando se analizan niveles de concentración del orden de trazas.

Por otra parte, la comparación entre la concentración de las muestras dopadas y la concentración promedio determinada en el análisis de las 7 muestras, con su respectiva desviación estándar se presentan en la tabla VIII.25, se observa que el valor de $t_{calculado}$ es menor que el valor de t_{tablas} (nivel de confianza del 95%), por lo tanto se acepta la hipótesis nula, es decir el método para la determinación de simazina, atrazina o propazina es exacto.

Se determinaron los límites de detección y cuantificación (LDD y LDC) del método utilizando dos procedimientos distintos, al igual que en el caso del malatión. La comparación de los LDD y LDC obtenidos se muestra en la tabla VIII.26

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Tabla VIII.26. Comparación de los LDD y LDC del método analítico para la determinación de algunas triazinas en agua, obtenidos por dos procedimientos distintos (ecuaciones en anexo A).

SIMAZINA Procedimiento 1	
LDD ($\mu\text{g/L}$)	LDC ($\mu\text{g/L}$)
0.29	0.51
SIMAZINA Procedimiento 2	
LDD ($\mu\text{g/L}$)	LDC ($\mu\text{g/L}$)
0.11	0.29
ATRAZINA Procedimiento 1	
LDD ($\mu\text{g/L}$)	LDC ($\mu\text{g/L}$)
0.30	0.52
ATRAZINA Procedimiento 2	
LDD ($\mu\text{g/L}$)	LDC ($\mu\text{g/L}$)
0.10	0.27
PROPAZINA Procedimiento 1	
LDD ($\mu\text{g/L}$)	LDC ($\mu\text{g/L}$)
0.32	0.55
PROPAZINA Procedimiento 2	
LDD ($\mu\text{g/L}$)	LDC ($\mu\text{g/L}$)
0.12	0.31

El intervalo lineal del método para cada pesticida así como los límites de detección son compatibles con las normas establecidas por los Estados Unidos (EPA y NPS). Como ya se comentó anteriormente, es posible reducir los LDD y LDC hasta una quinta parte aumentando a 250 mL el volumen de muestra cargado en el IA. En dicho caso se obtendrían límites de cuantificación del orden de 0.06 ppb (procedimiento 2) lo que haría compatible al método analítico desarrollado con las estrictas normas europeas. El LDD y

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

LDC obtenido por el procedimiento 2 es más adecuado para el análisis de muestras ambientales ya que es el más recomendado por la USEPA (United States Environment Protection Agency)

8.8.3. Aplicación del método analítico en agua de la presa Necaxa.

Para la evaluación del método analítico para triazinas se empleó como fuente hídrica la presa Necaxa situada en la Sierra Norte del estado de Puebla. Los parámetros derivados del análisis fisicoquímico realizado a estas muestras de agua se presentan en la tabla VIII.27.

Tabla VIII.27. Estudio fisicoquímico del agua de la presa Necaxa.

Determinación	Valor
pH	7.10-7.18
Determinación	Valor (ppm)
Alcalinidad (como bicarbonatos)	58.5 ± 0.6
Cloruros	20.2 ± 0.7
Dureza Cálctica	97.8 ± 0.8
Dureza Magnésica	35.3 ± 0.7
Dureza Total	133.1 ± 0.8
Sólidos disueltos	257.7 ± 4.3
Sulfatos	49.4 ± 2.2

Los cromatogramas obtenidos al aplicar el método analítico para cada triazina se presentan en la figura VIII.25. Cada triazina fue dopada individualmente a una concentración de 0.7 ng/mL empleando un volumen de muestra de 50 mL. El eluato fue obtenido con 4 mL de una solución de ACN:H₂O 65:35 (v/v), descartando el primer mL y fue inyectado al cromatógrafo de líquidos equipado con un inyector con rizo de 100 µL y un detector UV a 220 nm. La cuantificación de cada triazina se presenta en la tabla VIII.28.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

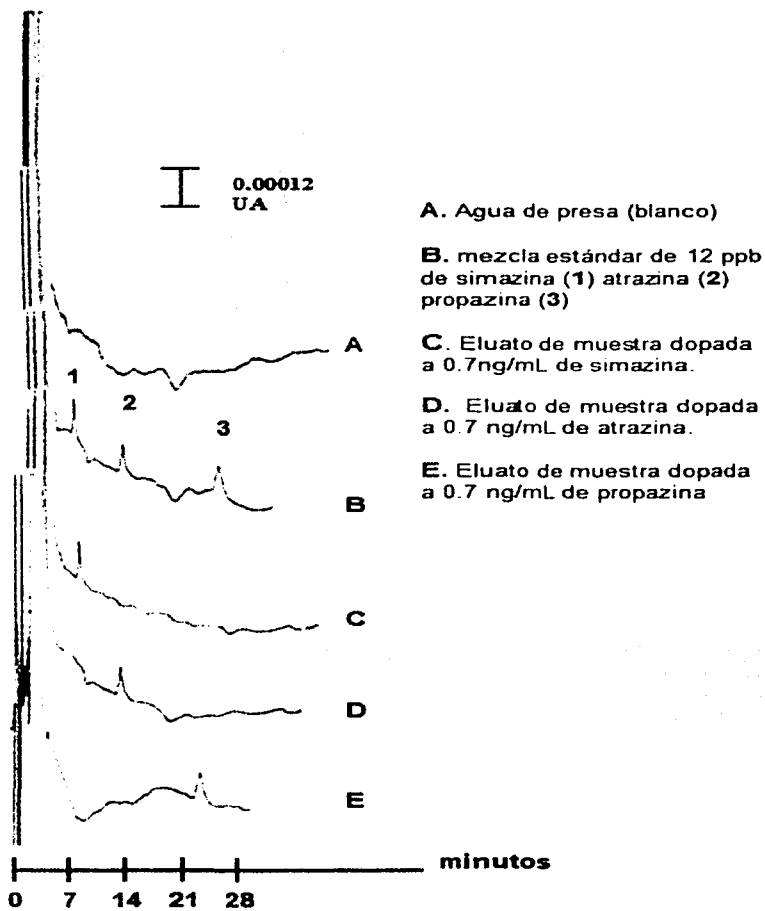


Figura VIII.25. Cromatogramas correspondientes al análisis de muestras de agua de la presa Necaxa dopadas con simazina, atrazina y propazina. Volumen de muestra 50 mL

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Tabla VIII.28. Cantidades determinadas de triazinas en agua de la presa Necaxa analizadas por el método analítico establecido.

Analito	Volumen de muestra (mL)	Cantidad cargada (ng)	Cantidad determinada (ng)
Simazina	50	35	32
Atrazina	50	35	32
Propazina	50	35	31

8.8.4. Especificidad del IA dopado con anti-atrazina.

Se realizó un estudio de especificidad del IA dopando las muestras de agua de presa con 3 pesticidas distintos estructuralmente, metiocarb (un carbamato), metilparatión y malatión (organofosforados) a 2 ng/mL de cada uno, además del analito-antígeno atrazina a 0.8 ng/mL, en un volumen de 50 ml. El cromatograma del agua de presa sin dopar aparece limpio en el intervalo de 3 a 25 minutos. El IA fue específico para la atrazina, los otros pesticidas no fueron retenidos (figura VIII.26.). Las condiciones de la separación cromatográfica de los 4 pesticidas fueron descritas en el capítulo de desarrollo experimental (tabla VII.7) La cuantificación de la atrazina se presenta en la tabla VIII.29.

Tabla VIII.29. Cantidad determinada de atrazina en el estudio de especificidad del IA empleando agua de la presa Necaxa analizada por el método analítico establecido.

Analito	Volumen de muestra (mL)	Cantidad cargada (ng)	Cantidad determinada (ng)
Atrazina	50	40	37

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

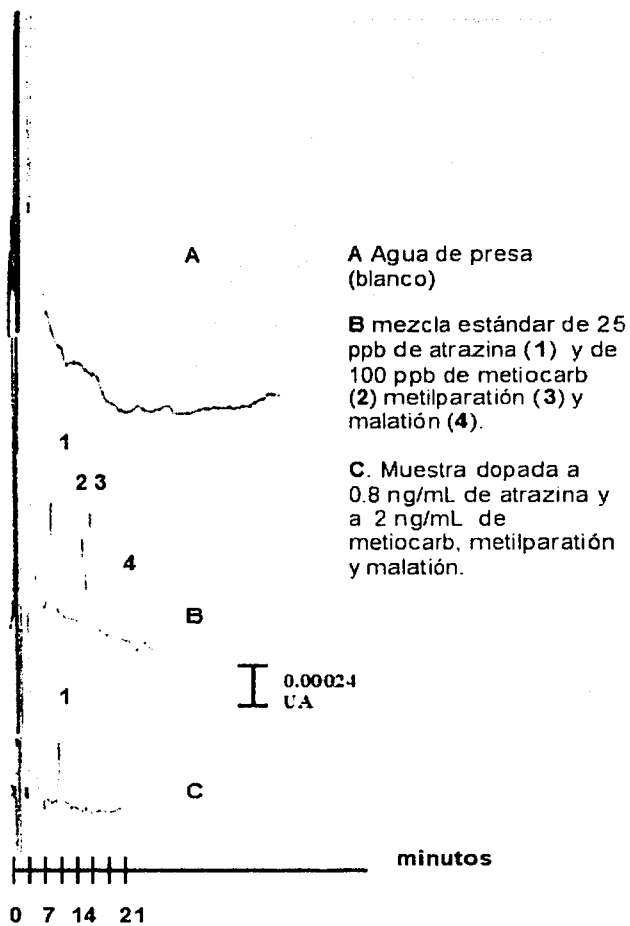


Figura VIII.26. Cromatogramas correspondientes al estudio de especificidad del IA dopado con 700 μg de anti-atrazina. Muestras de 50 mL de agua de la presa Necaxa sin dopar (A) y dopada con 4 pesticidas (C).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

8.8.5. Determinación simultánea de simazina, atrazina y propazina en agua de presa

Empleando un IA dopado con 700 μg de anticuerpo (anti-atrazina) fue posible determinar simultáneamente las triazinas simazina, atrazina y propazina. La determinación se llevó a cabo empleando un volumen de 50 mL de agua de presa dopada a 0.5 ng/mL de cada uno de las triazinas. Los cromatogramas obtenidos se presentan en la figura VIII.27 Las condiciones cromatográficas del análisis fueron reportadas en el capítulo de desarrollo experimental (tabla VII.4)

De acuerdo con los cromatogramas mostrados en la figura VIII.27, es posible determinar simultáneamente los herbicidas simazina, atrazina y propazina a una concentración total de 1.5 ng/mL, lo que representa una masa total de 75 ng, empleando un volumen de 50 mL de muestra. Sin embargo es posible determinar concentraciones menores de estos 3 herbicidas si se procesa un volumen de muestra mayor (de hasta 250 ml) en el IA. En la tabla VIII.30, se reportan las cantidades determinadas de estas triazinas con el método analítico establecido.

Tabla VIII.30. Determinación simultánea de 3 triazinas determinadas en agua de la presa Necaxa analizada por el método analítico establecido. Xerogel dopado con 700 μg de anticuerpo.

Analito	Volumen de muestra (mL)	Cantidad cargada (ng)	Cantidad determinada (ng)
Simazina	50	25	22
Atrazina	50	25	24
Propazina	50	25	20

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

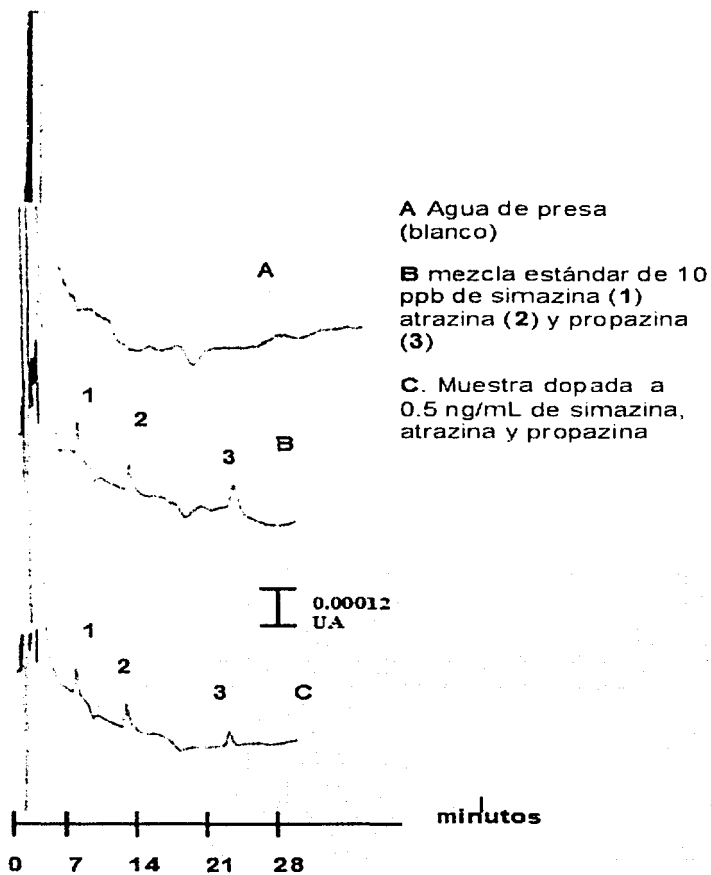


Figura VIII.27. Cromatogramas correspondientes a la determinación simultánea de las triazinas en un IA dopado con 700 μg de anti-atrazina. Una muestra de 50 mL de agua procedente de la presa Necaxa fue fortificada con simazina, atrazina y propazina a 0.5 ppb de cada una.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

8.9. CARACTERIZACIÓN FÍSICA DE LOS IAs.

Los IAs obtenidos fueron caracterizados mediante técnicas de microscopía y termoporometría.

8.9.1. Microscopías óptica y electrónica de barrido.

Mediante microscopía óptica se determinó el tamaño de las partículas (obtenidas al moler en mortero los xerogeles preparados). Estas presentaron formas irregulares con un intervalo en tamaño de 10-25 μm . Respecto a la microscopía por barrido diferencial (SEM), las microfotografías obtenidas se presentan en la figura VIII.28.

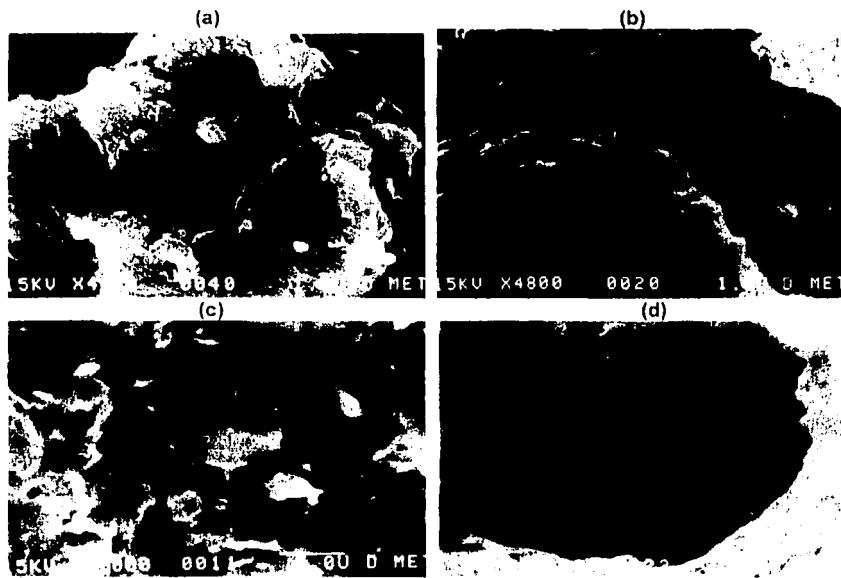


Figura VIII.28. Microfotografías de (a) hidrogel dopado con 500 μg de anti-2,4-D previamente usado en múltiples experimentos de EFS, (b) xerogel dopado con 500 μg de anti-2,4-D recientemente preparado, (c) xerogel blanco recientemente preparado, (d) enfocamiento de un poro del xerogel dopado de la figura (b). Amplificación: x4800 en (a) y (b), x16000 en (c) y (d).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

El gel blanco (figura VIII.28 c) presentó poros irregulares de un tamaño aproximado entre 100-200 nm de radio. El aumento del tamaño de los poros en los geles dopados fue muy significativo (entre 1.5-2.5 μm de radio), a pesar de ello el anticuerpo encapsulado dentro de estas cavidades sorprendentemente no se fugó. Cabe mencionar que el uso continuo de estos IAs no modificó las características estructurales aparentes del biomaterial; el biogel (b) fue recientemente preparado, el biogel (a) fue usado en por lo menos 60 análisis. Aunque en la bibliografía se ha señalado la existencia de macroporos superficiales en materiales sol-gel, hasta ahora no se había puesto en evidencia la enorme diferencia de tamaño entre los poros de un gel blanco y un gel dopado con anticuerpo, como se aprecia claramente al comparar las figuras VIII.28 c y VIII.28 d (misma ampliación). Todos estos geles fueron sometidos a un secado total (por vacío a temperatura ambiente hasta peso constante) antes del estudio de microscopía electrónica. Sin embargo, gracias a las modificaciones y cuidadosa optimización del proceso de sol-gel realizada en este trabajo, aparentemente se evitó el colapso de los poros durante el secado.

Debido a que las condiciones requeridas para el estudio SEM no son muy representativas de las condiciones en las cuales se utiliza el biomaterial para aplicaciones analíticas (hidrogeles o xerogeles secados solo hasta 50% del peso del material húmedo), se optó por realizar un estudio de termoporometría mediante la técnica de calorimetría diferencial de barrido. Este último complementa al estudio cualitativo con SEM, ya que la termoporometría da información sobre poros cuyo tamaño se encuentra entre 3-150 nm de diámetro.

8.9.2. Termoporometría

La termoporometría se realizó con xerogeles que habían sido secados hasta pérdida del 50% de peso y posteriormente rehidratados (gel blanco y geles dopados con 500 μg de anti-malatión y anti-atrazina). Para poder observar el efecto de un secado más intenso sobre la porosidad del gel, también se estudió un gel dopado (con 500 μg de anti-2,4-D) que había sido secado totalmente (para la microscopía electrónica (gel de la figura VIII.28 a) y luego rehidratado para la termoporometría.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

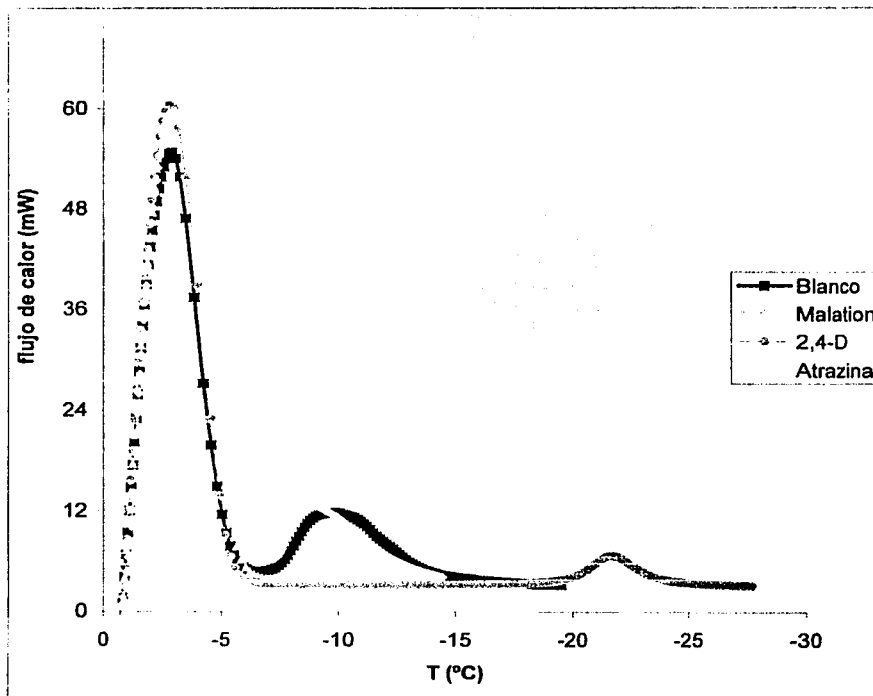


Figura VIII.29 Curvas obtenidas por calorimetría diferencial de barrido de los geles dopados y gel blanco.

El poro, volumen del poro y área superficial fueron obtenidos empleando las ecuaciones propuestas por Ishikiryama et al, las cuales han sido corroboradas y utilizadas en otros trabajos.^{66, 67} El tratamiento matemático detallado se presenta en el anexo B.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

volumen poroso en función del radio de los poros. Como puede observarse, la distribución del volumen poroso para todos los geles es francamente bimodal.

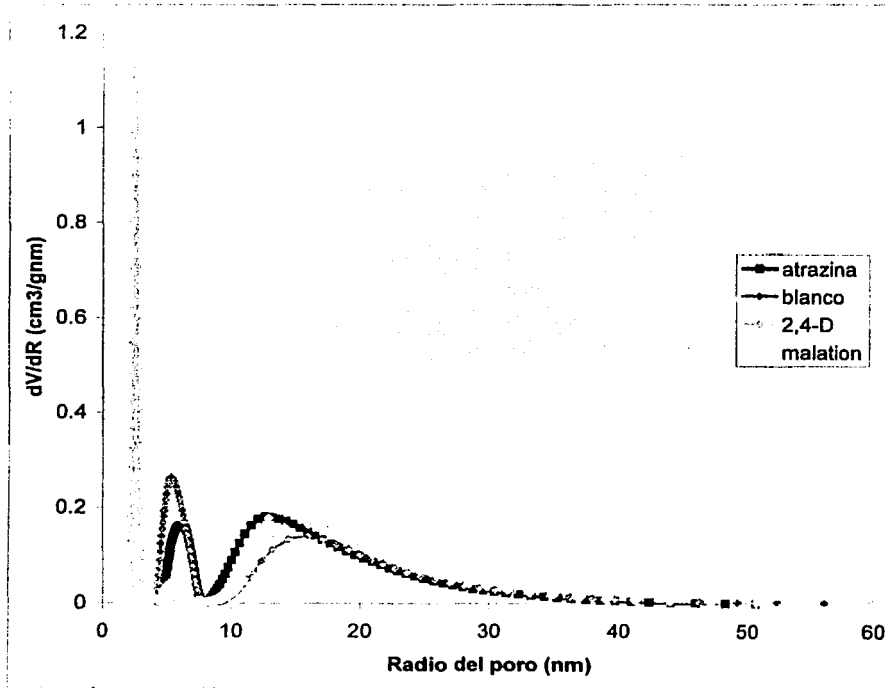


Figura VIII.30. Distribución del volumen poroso en función del tamaño de poro para los geles dopados con anticuerpo y el gel blanco.

El resumen de algunas propiedades físicas deducidas a partir de las curvas de distribución para los geles dopados y sin dopar se presenta en la tabla VIII.31.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Tabla VIII.31. Datos Obtenidos del estudio de termoporometría

Gel	Blanco		Anti- 2,4-D		Anti-Atrazina		Anti-Malati6n	
	radio del poro (nm)	4.1-8.0	9.1-49	2.2-3.5	8.8-48	4.6-7.8	7.9-55	4.6-6.7
Volumen poroso cm ³ /g	0.50	1.89	0.38	2.24	0.31	2.23	0.32	2.57
% volumen de poro	21.13	78.97	14.65	85.35	12.49	87.51	11.14	88.86
Área superficial m ² /g	181	207	242	288	106	279	120	305
% área superficial	46.68	53.32	45.73	54.27	28.39	72.61	28.13	71.87
Volumen poroso total cm ³ /g	2.39		2.62		2.54		2.89	
Área superficial total m ² /g	388		530		385		425	

Los dos intervalos de tamaño de poro detectados en los 4 geles corresponden al intervalo de mesoporos y macroporos.

Cabe hacer notar que la termoporometría no es apta para detectar los microporos (radio < 1 nm) o los grandes macroporos. Los primeros pueden ser estudiados por la técnica de adsorción-desorción de N₂ y los segundos por la técnica de intrusión con Hg. Sin embargo ambas técnicas requieren de un previo secado del material a alta temperatura, lo cual muy probablemente modificaría su estructura y por lo tanto no sería representativo de las condiciones en las cuales éste es usado. Como referencia algunos datos reportados en la literatura ⁴³ para sílices no dopadas obtenidas por sol-gel, indican que el volumen de los

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

VIII. Resultados 137

mesoporos es de alrededor de $0.3-0.5 \text{ cm}^3/\text{g}$ lo que correspondería a una fracción $\leq 20\%$ del volumen poroso total calculado para el gel blanco. En el caso de los geles dopados, los macroporos son considerablemente mayores (como lo muestran las microfotografías (SEM) y no es posible estimar la importancia del volumen macroporoso con respecto al volumen de los mesoporos.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

IX. DISCUSION DE RESULTADOS.

9.1. ACTIVIDAD DE LOS ANTICUERPOS.

Las biomoléculas principales que en este proyecto se pretendía encapsular por el método de sol-gel son los anticuerpos o inmunoglobulinas. Uno de los parámetros de referencia para poder comparar el comportamiento de las inmunoglobulinas (IgG) en el estado libre y en el estado encapsulado es la determinación de su actividad. Teóricamente una IgG presenta dos sitios activos que contienen zonas de interacción llamadas parátomos, los cuales en principio, sólo pueden ser ocupados por los sitios llamados epitomos del inmunógeno, antígeno o hapteno. Estos epitomos y parátomos son los diferentes grupos orgánicos e inorgánicos que interactúan como una función llave-cerradura; las interacciones por atracción electrostática, puentes de hidrógeno, fuerzas de Van der Waals e hidrofóbicas son las que conforman la estabilidad del complejo antígeno-anticuerpo. Para cada pesticida habrá una mayor o menor cantidad de estas fuerzas involucradas en la interacción, por ejemplo las triazinas tenderán a formar más puentes hidrógeno que el malatión o el éster del 2,4-D.

Los pesticidas son moléculas de tamaño muy pequeño que no desencadenan por sí solas una respuesta inmune adecuada en un ser vivo inmunológicamente competente. La alternativa es ligar covalentemente el pesticida a una molécula acarreadora (hemocianina, BSA entre otras), de esta manera se generará una respuesta inmune que tendrá como consecuencia la producción de inmunoglobulinas de diversos tipos: anti-molécula acarreadora (tipo I), anti-molécula acarreadora+hapteno (tipo II) y anti-hapteno (tipo III). Entre éstas las IgGs que podrán emplearse para la determinación del hapteno una vez purificadas serán las del tipo II y III.

La reacción del antígeno o hapteno con el anticuerpo se realizó en condiciones lo más cercanas a las fisiológicas: pH 7.0-7.4, temperatura ambiente y concentración salina equivalente a NaCl 0.15M. Estas condiciones pueden variar dentro de intervalo razonables sin afectar la reacción. El tiempo para formar el complejo correspondiente puede variar entre

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

0.25 a 3 horas. Bajo estas consideraciones, la determinación de actividad se efectuó manteniendo los parámetros experimentales a valores más lo cercanos a la idealidad; el empleo de una cantidad muy pequeña de disolvente orgánico (1% en solución) fue para eliminar la interacción hidrofóbica del anticuerpo y del hapteno (pesticida) con las paredes del material empleado.

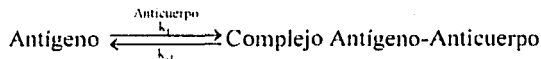
Los resultados de actividad correspondiente hacia el hapteno, no mayores al 11%, son muy similares a los encontrados para este tipo de inmunoglobulinas debido a diversos factores (heterogenicidad de las IgG, grado de purificación, pérdida de actividad durante la liofilización y almacenamiento).

Cabe señalar que soluciones de anticuerpo (1mg/mL) con un tiempo de preparación mayor a 5 semanas y mantenidas a 4°C deben ser desechadas debido a que existe una disminución muy considerable de la actividad.

9.2 TERMODINAMICA DE LA REACCION HAPTENO-ANTICUERPO

Cuando el hapteno correspondiente interacciona con los sitios activos del anticuerpo, los puentes de hidrógeno, las fuerzas de atracción electrostática y las fuerzas de Van der Waals son las fuerzas predominantes; la afinidad de la interacción aumentará o disminuirá dependiendo de la polaridad del medio. En medio acuoso, los residuos expuestos de la IgG se encuentran solvatados formando puentes de hidrógeno con el agua e interacciones de Van der Waals principalmente. Las nuevas interacciones en la interfase deben compensar la pérdida de interacciones con el agua. Consecuentemente para que esto ocurra y se produzca un saldo neto favorable, debe tenerse una fina complementariedad entre el antígeno (Ag) y el sitio activo del anticuerpo. Para descartar que las interacciones del hapteno (pesticida) con el anticuerpo (Ab) sean del tipo no específico, es necesario considerar los aspectos termodinámicos de la interacción antígeno-anticuerpo (Ag-Ab). Suponiendo una reacción simple del tipo:

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



En el estado de equilibrio

Velocidad de enlace = Velocidad de disociación

$$k_1 [\text{Ag}][\text{Ab}] = k_{-1} [\text{Ag-Ab}]$$

La constante de afinidad o enlazamiento K_b y el cambio de energía libre (ΔG) quedan dados por:

$$K_b = \frac{k_1}{k_{-1}} = \frac{[\text{Ag-Ab}]}{[\text{Ag}][\text{Ab}]}$$

$$\Delta G_{b(\text{Ag-Ab})} = -RT \ln K_{b(\text{Ag-Ab})}$$

donde $[\text{Ag}]$ y $[\text{Ab}]$ representan respectivamente las concentraciones al equilibrio de antígeno no acomplexado y de sitios de unión libres en el anticuerpo, en tanto $[\text{Ag-Ab}]$ es la concentración de complejo formado.⁴⁴

Se puede evaluar la constante de afinidad K_b para los complejos Ag-Ab estudiados en este trabajo a partir de los experimentos que se realizaron para determinar la actividad de los anticuerpos libres en solución. Para estos cálculos se considera un P.M. de 150,000 g/mol para el anticuerpo y se asume que el producto adquirido comercialmente (fracción de IgG del suero del animal inmunizado, separada y purificada por el proveedor) corresponde totalmente a moléculas de anticuerpo activo, con dos sitios de actividad equivalente por molécula a los cuales se puede enlazar el antígeno indistintamente. El volumen de solución con anticuerpo y antígeno que se vertió en el tubo Centricon YM-30 para estos

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

IX. Discusión de resultados 141

experimentos fue de 1 mL. Los datos y el valor obtenido de K_b se presentan en la tabla IX.1.

Tabla IX.1 Evaluación de la K_b de los anticuerpos empleados por su correspondiente antígeno.

Ag o hapteno P.M. (g/mol)	Ag Agregado (ng)	Ag Complejado (ng) [] mol/L	Ag libre (ng) [] mol/L	Ab Agregado (μ g) [] mol/L	Sítios Libres [] mol/L [Ab]	Complejo Ag:Ab [] mol/L [Ag-Ab]	Constante de afinidad mol/L (K_b)
Anti-2,4-D							
2,4-D éster 236	60	15 6.35×10^{-8}	45 1.9×10^{-7}	50 6.67×10^{-7}	1.20×10^{-6}	6.35×10^{-8}	2.77×10^5
Anti-malati3n							
Malati3n 330.6	70	38.9 1.17×10^{-7}	31.1 9.4×10^{-8}	100 13.3×10^{-7}	2.42×10^{-9}	1.17×10^{-7}	5.10×10^7
Anti-atrazina							
Atrazina 215	70	12 5.58×10^{-8}	58 2.7×10^{-7}	50 6.67×10^{-7}	1.22×10^{-6}	5.58×10^{-8}	1.63×10^5

Se debe hacer notar que el valor de K_b obtenido est3 probablemente subestimado dados las suposiciones hechas. En primer lugar, no toda la fracci3n IgG de prote3nas del suero corresponde a anticuerpos. Adem3s, no todo el anticuerpo generado por el animal reconoce al ant3geno y, de hecho, la mayor parte del anticuerpo producido debi3 estar dirigido contra la prote3na acarreadora (del derivado hapteno-prote3na inyectado al animal) dado el gran tama3o relativo de esta 3ltima. Finalmente, la suposici3n de que los dos sítios activos del anticuerpo son equivalentes y pueden considerarse como entidades separadas (fragmentos) es cuestionable. Una vez que uno de los sítios del anticuerpo ha enlazado una

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

IX. Discusión de resultados 142

molécula de antígeno, es evidente que la perturbación provocada tiene repercusiones sobre la energía de enlace del segundo sitio.

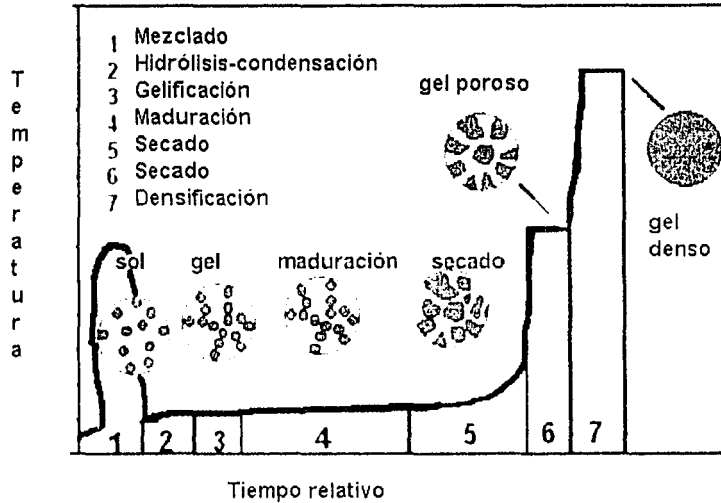
En resumen, el valor de K_b calculado es tan sólo una apreciación mínima de la constante de afinidad. A pesar de ello, su magnitud es suficientemente grande para dar una idea de la fuerte energía de enlace entre las dos entidades y derivar algunas conclusiones. Cuando la K_b tiene un valor menor de 10^4 el tipo de interacciones que predominan son las no específicas y en dicho caso no tendría sentido usar estos anticuerpos para preparar un IA selectivo.²⁷ Con los valores de K_b obtenidos se tiene una referencia excelente para asegurar que los IAs preparados tendrán afinidad por los haptenos correspondientes. El valor más alto de K_b lo presenta el anti-malatión y el más bajo el anti-atrazina, sin embargo las diferencias entre los tres valores no son muy grandes. La afinidad y la especificidad por definición no están directamente relacionadas: mientras que la afinidad se refiere a la fuerza de interacción, la especificidad se refiere a la ausencia de reactividad cruzada. Por ejemplo el anti-atrazina, es poco específico por que presenta una importante reactividad cruzada con análogos estructurales a la atrazina (simazina y propazina) lo cual es una característica frecuentemente observada con los anticuerpos policlonales.

9.3 .OPTIMIZACION DEL PROCESO DE SOL-GEL.

9.3.1. Proceso de sol-gel.

El proceso de sol-gel consta de varias etapas (figura IX.1). Para el encapsulamiento de biomoléculas, las etapas que se toman en cuenta incluyen desde la 1 hasta la 5, las etapas 6 y 7 no son adecuadas debido a que la evaporación total del agua contenida en los poros de la matriz del gel provocará la pérdida de la actividad biológica. La optimización de cada etapa del proceso y de las reacciones involucradas permitió la obtención de un biogel con las características adecuadas para un buen funcionamiento.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Figura IX.1. Etapas del proceso de sol-gel.⁹²

9.3.2. Selección del precursor.

El proceso de sol-gel es un método muy flexible para la obtención de materiales porosos. El objetivo principal era la obtención de un material suficientemente rígido, con porosidad adecuada, reutilizable y que dentro de esta matriz se pudiera atrapar eficientemente un anticuerpo conservando su actividad biológica.

La selección del alcóxido precursor se basó en diversas consideraciones que se discuten a continuación, así como en algunas de las propiedades expuestas en la tabla IX.2.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Tabla IX.2. Propiedades de algunos alcóxidos basados en silicio.⁴⁸

Nombre	M g/mol	P.E. (°C)	δ (g/ml)	μ_D	solubilidad	Velocidad de hidrólisis ácida ($\times 10^2$) L mol ⁻¹ s ⁻¹ [H ⁺] ⁻¹
TMOS (tetrametoxisilano)	152.2	121	1.02	1.71	alcoholes	10.5
TEOS (tetraetoxisilano)	208.2	169	0.93	1.63	alcoholes	5.1
MTEOS Metiltrietoxisilano	178.3	141	0.89	1.70	alcoholes	5.8
TPOS (Tetra-n- propoxisilano)	264.4	224	0.91	1.66	alcoholes	2.8

Por su mayor velocidad de hidrólisis, uno de los precursores más utilizados es el TMOS, sin embargo no se eligió este compuesto debido a que la hidrólisis del alcóxido produce metanol que es más tóxico para las biomoléculas que otros alcoholes. En este aspecto el más adecuado sería el TPOS porque el disolvente producido n-propanol es menos tóxico para las proteínas, sin embargo su velocidad de hidrólisis en medio ácido es mucho menor. El MTEOS, así como otros alquilalcoxisilanos tiene la desventaja de producir materiales con carácter hidrofóbico que resultan inapropiados para EFS porque promueven la retención no específica de compuestos no deseados. Finalmente el TEOS parecía ser el mejor compromiso.

Los alcóxidos metálicos son susceptibles a la hidrólisis ácida o básica y de acuerdo con la figura IX.2, se observa que a medida que el átomo central se encuentra más sustituido por grupos alquilo se hace más susceptible al ataque ácido por los efectos inductivos, sin embargo la red obtenida será menos entrecruzada.

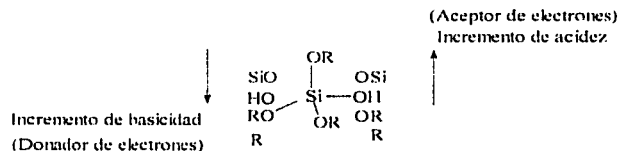


Figura IX.2. Susceptibilidad a la hidrólisis por efecto del sustituyente.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

En cuanto a la solubilidad de los alcóxidos en medios acuosos, ésta disminuye a medida que se incrementa la cadena alquílica OR o cuando se tienen alcóxidos con sustituyentes R; es decir, si se empleara un alcóxido sustituido con uno o dos grupos alquílicos y se hidrolizara en medio acuoso, tendría que agregarse un cosolvente al medio (etanol o metanol) para incrementar la solubilidad y hacer factible la hidrólisis. La desventaja de ello es que se incrementaría el riesgo de inactivación de la proteína que se quisiera encapsular.

En el caso del TEOS, el diagrama ternario de la figura IX.3, muestra las condiciones requeridas para la obtención de una solución homogénea cuando se mezcla este alcóxido con etanol y agua.

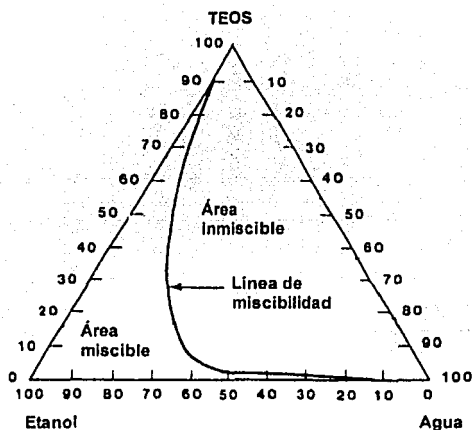


Figura IX.3. Diagrama ternario del equilibrio TEOS:ETOH:H₂O.⁴⁸

En la figura anterior se observa que existe un límite en la solubilidad del TEOS en relación a la proporción de agua y etanol, por lo que podría pensarse que sería indispensable agregar cosolvente al medio para fomentar una mejor hidrólisis. Sin embargo, la experiencia ha demostrado que la cantidad de etanol producida en la hidrólisis del alcóxido es suficiente para mantener homogéneo el medio de reacción. Lo importante es

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

entonces tener una velocidad de hidrólisis lo suficientemente rápida, la cual dependerá del pH del medio.

Con estos razonamientos el empleo del TEOS representa una alternativa muy viable, como precursor.

9.3.3. Selección del tipo de hidrólisis.

Seleccionado el precursor, el siguiente paso fue el tipo de hidrólisis a realizar. Se sabe que si es realizada en condiciones ácidas se favorece la hidrólisis pero disminuye la velocidad de condensación, mientras que en medio básico la hidrólisis es muy lenta pero la condensación es rápida. Se eligió la hidrólisis ácida, por que se pretendía obtener un gel en el menor tiempo posible y con un alto rendimiento de la reacción. Los primeros ensayos fueron realizados con la siguiente proporción de reactivos:

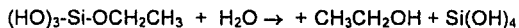
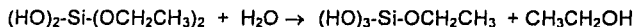
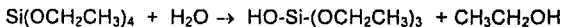
2.5 ml de TEOS + 0.1 mL de HCl 0.04M + 0.4 mL de H₂O

(Sonicación por 30 min en baño de hielo)

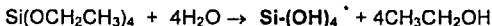
La relación molar es:

$1.1 \times 10^{-2} \text{ mol} + 4 \times 10^{-6} \text{ mol} + 2.8 \times 10^{-2} \text{ mol}$. pH de la fase acuosa 2.1

Las reacciones parciales de hidrólisis son:



Global

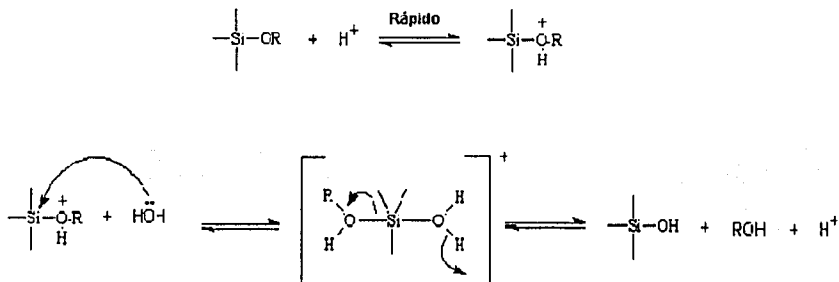


* Especie que no se encuentra como tal debido a las reacciones de condensación que ocurren de manera alterna a la hidrólisis.

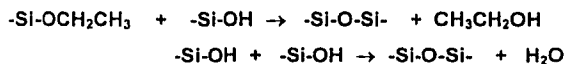
TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

IX. Discusión de resultados 147

La reacción presenta un mecanismo en donde el ataque nucleofílico del átomo de silicio por la molécula de agua es facilitado por la previa protonación de un grupo alcoxi, el cual es:



De acuerdo con la reacción global se necesitaría una mayor cantidad de agua, sin embargo la condensación aunque disminuida coexiste con la hidrólisis y se produce agua suficiente para continuar la reacción.



Con las condiciones utilizadas la hidrólisis total del alcóxido forma 4.4×10^{-2} mol de ETOH

De acuerdo con estudios publicados en la literatura,⁴⁸ la proporción molar TEOS:Agua tiene una fuerte influencia sobre el tiempo de gelificación, como se muestra en la figura IX.4. El tiempo de gelificación corresponde al tiempo en el cual la viscosidad del sol (sistema disperso) aumenta de manera muy rápida para formar el gel insoluble. Este tiempo depende de las velocidades de hidrólisis y condensación.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

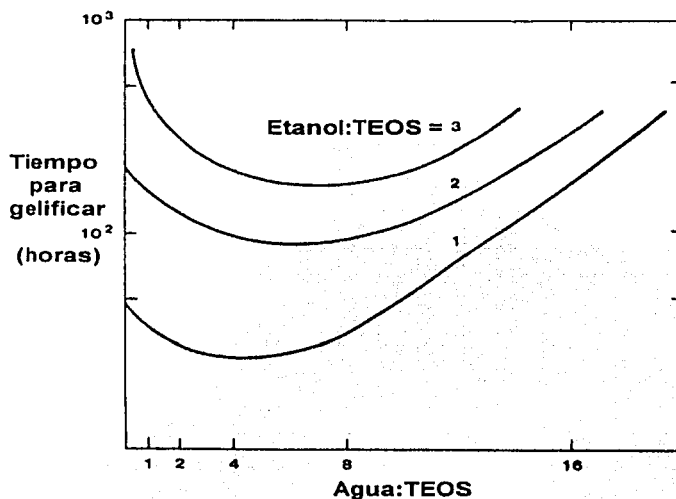


Figura IX.4. Efecto de la proporción molar Agua:TEOS en el tiempo de gelificación en un medio ácido.⁴⁸

Como se observa en la figura anterior, un aumento en la proporción molar del agua respecto al alcóxido precursor aumenta el tiempo de gelificación; la proporción ideal oscila entre 2-7. intervalo dentro del cual se encuentra la relación molar utilizada en estos ensayos. Por esta razón, se decidió mantener siempre la misma proporción molar Agua:TEOS (2.5:1).

Por otra parte, la figura IX.4 muestra también que el tiempo de gelificación es menor para una relación molar ETOH:TEOS=1, comparada con proporciones de alcohol más altas. Esta condición puede asimilarse a las condiciones iniciales del proceso cuando no se adiciona cosolvente, en las cuales el ETOH formado por la propia hidrólisis es suficiente para mantener la homogeneidad del sol. Lógicamente, si se llegara a aumentar la cantidad

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

de agua inicial, el tiempo de gelificación aumentaría por efecto de la disminución en la miscibilidad de los reactivos.

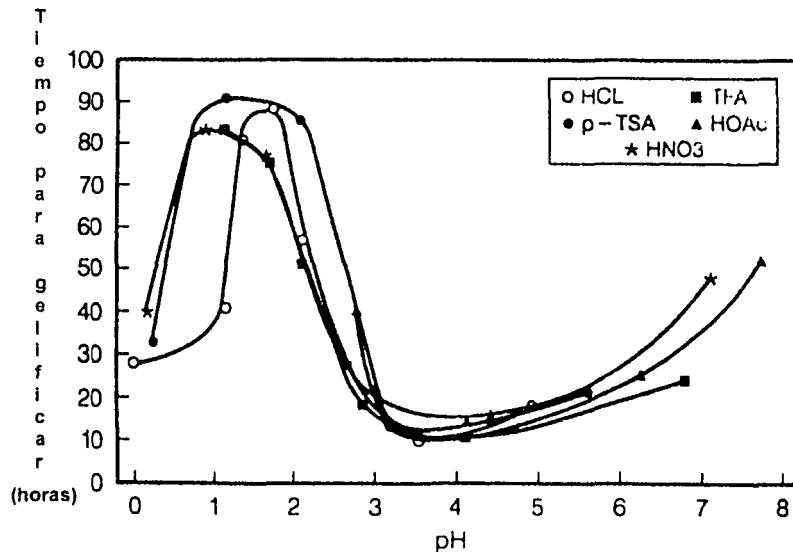


Figura IX.5. Efecto del catalizador ácido en el tiempo de gelificación.^{48, 92}

Algunos trabajos previos han mostrado que el uso de diferentes agentes para imponer el medio ácido aparentemente no tiene un efecto marcado en el tiempo de gelificación excepto para valores de pH muy ácidos (figura IX.5).^{48, 92} Sin embargo, las propiedades de la base conjugada del ácido sí afectan la velocidad de hidrólisis debido a que la base conjugada desempeña un papel importante en el desplazamiento de un grupo OR por un mecanismo tipo SN_2-Si (bimolecular nucleofílico). De acuerdo con algunos autores, el empleo de HF es el más adecuado debido al mayor efecto catalítico de la base conjugada F^- por su semejanza en tamaño al ión hidroxilo. Uno de los mecanismos de reacción propuestos se presenta en la figura IX.6.^{48, 92}

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

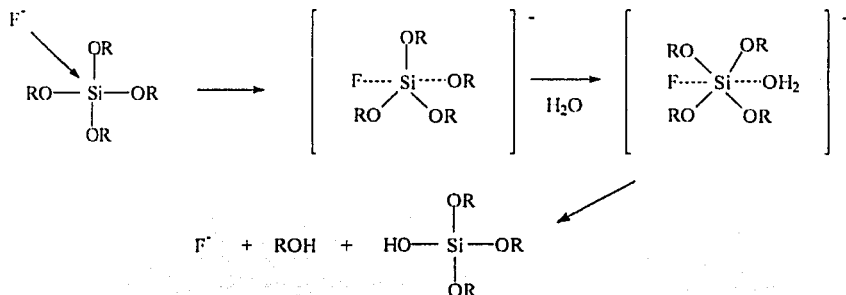


Figura IX.6. Mecanismo de reacción de la hidrólisis de un alcóxido empleando como catalizador al HF.

Cabe mencionar que en un estudio anterior ⁹³ en el que se utilizó HCl como catalizador en la formación de vidrios sol-gel, se constató un aumento notable en la cantidad de material obtenido al incrementar la concentración de ácido en el medio de reacción. Dado que para una misma cantidad de HCl añadido, se observó una disminución en el rendimiento de la reacción al aumentar la proporción de agua, se deduce que el efecto favorable proviene no tanto de la cantidad de HCl sino de la concentración de H⁺ (pH más ácido) y de Cl⁻. La cantidad de material obtenido refleja el grado hasta el cual se completa la hidrólisis del precursor al momento en que se produce la gelificación.

9.3.4. Obtención de los primeros geles blanco y geles dopados con indicadores y biomoléculas (BSA, amilasa y anti-2,4-D).

Con las primeras condiciones ensayadas para el proceso sol-gel se obtuvieron de 280 a 610 mg del producto seco en un tiempo de preparación relativamente largo (tiempo de gelificación + secado hasta peso constante de 9 días). Las características del material obtenido no eran óptimas por que los vidrios sol-gel aunque perfectamente transparentes eran muy duros y se encontraban totalmente adheridos al recipiente de reacción. Sin embargo se optó por utilizar estas condiciones para probar el encapsulamiento de indicadores ácido-base ya que no se planeaba trabajar con un monolito sino con el material

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

particulado. Los sensores de pH así obtenidos fueron molidos y empacados en una jeringa de plástico (figura IX.7) para evaluar su funcionamiento en un sistema en flujo. Aunque se comprobó la reversibilidad en el cambio de color del indicador inmovilizado y se corroboró el encapsulamiento total de estas pequeñas moléculas en los poros de la matriz de sílica, también se observó una cinética de respuesta más lenta comparada con el funcionamiento del indicador libre en solución.

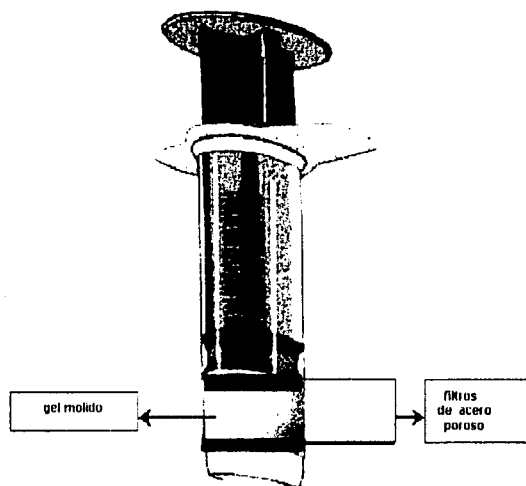


Figura IX.7. Cartuchos de extracción empleados.

En la figura IX.8, se muestra la forma en como el rojo de metilo queda atrapado dentro de los poros de una matriz de sílica rodeado de una capa de solvatación. Los pequeños iones provenientes de la solución externa difunden a través de la capa acuosa provocando el cambio de color por la protonación o desprotonación de los grupos básicos o ácidos del indicador. En algunos estudios ⁹⁴ se ha propuesto que la velocidad de movimiento del protón solvatado en los poros de una matriz de sol-gel es similar a su

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

velocidad en solución. Sin embargo, por una parte, el camino recorrido desde la solución externa hasta los poros en que se encuentra atrapado el indicador es relativamente largo y por otro lado, es necesario considerar las propiedades ácido-base de los silanoles de superficie que pueden consumir protones o iones hidroxilo. Por lo tanto, es lógico que el impacto de un cambio de pH en la solución externa se refleje con cierto retardo en el cambio de color del indicador.

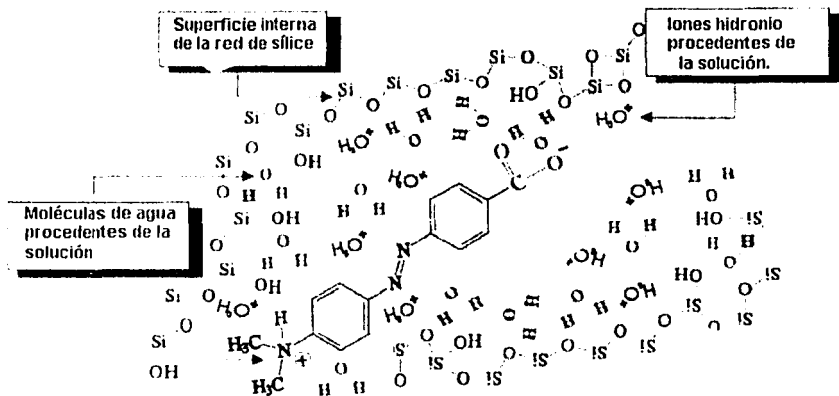


Figura IX.8. Representación hipotética del encapsulamiento de rojo de metilo en la matriz de sílice.

Con estos antecedentes el encapsulamiento de biomoléculas como la BSA y la amilasa fue el siguiente paso.

Las proteína BSA (P.M. ~ 67 KDa), la enzima α -amilasa (P.M. ~ 50 KDa) y el anticuerpo anti-2,4-D (P.M. ~ 150 KDa), son moléculas de mayor tamaño que los indicadores ácido-base por lo que el tamaño de poro que se formase en la matriz del gel durante el proceso tendría que ser el adecuado para encapsularlas perfectamente y preservar su actividad biológica, es decir conservar la estructura nativa original. El

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

encapsulamiento, realizado bajo las mismas condiciones para las 3 biomoléculas, proporcionó un excelente atrapamiento ya que en las aguas de lavado del biogel no fue detectada la presencia de proteína, sin embargo la actividad enzimática de la amilasa fue prácticamente nula al igual que la capacidad de complejación del anticuerpo inmovilizado.

Varios factores contribuyeron a la inactivación de las biomoléculas. Cabe señalar que el método de encapsulación usado se basó en métodos clásicos reportados por otros investigadores,^{21, 42, 44, 45} cuyas principales etapas se ilustran en la figura IX.9.

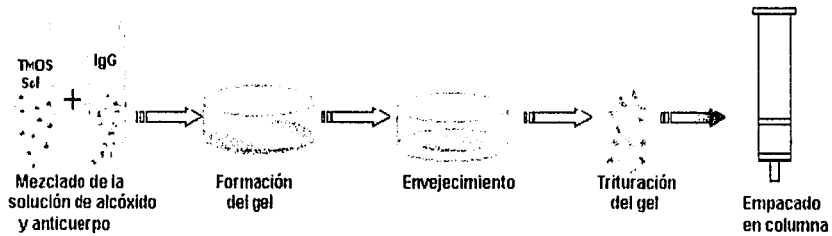


Figura IX.9. Método común de encapsulamiento de anticuerpos.⁴⁹

Este método presenta varios inconvenientes:

- La enzima o el anticuerpo se mezclan con el sol justo después de los 30 minutos de sonicación, lo que conduce a pérdida de actividad por el contacto de la biomolécula con alcóxido no hidrolizado o parcialmente hidrolizado y con el disolvente orgánico generado.
- El tiempo de gelificación es largo (varios días), lo que contribuye a incrementar la pérdida de actividad al prolongarse el contacto de la proteína con agentes desnaturizantes.
- El secado del material se realiza a temperatura ambiente o en refrigeración hasta obtener un peso constante. Durante esta etapa se produce un fuerte encogimiento del gel y el colapso de los poros, lo que puede dañar la estructura terciaria de la proteína o bloquear sus sitios activos.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Para compensar la pérdida de actividad, en la mayoría de los trabajos publicados sobre IAs se utilizan cantidades muy grandes de anticuerpo (del orden de varios mg). Con las cantidades tan pequeñas de anti-2,4-D que se emplearon en los primeros ensayos (100-200 μ g) la actividad remanente fue demasiado baja y no se detectó retención del antígeno. Para conseguir una optimización del proceso de encapsulación fueron necesarias varias modificaciones. El objetivo fue obtener un inmunogel en un menor tiempo, activo y reutilizable, empleando cantidades de anticuerpo inferiores al miligramo.

Para conservar la actividad de un anticuerpo es necesario considerar ciertos parámetros energéticos de estabilidad de esta proteína globular. Los anticuerpos son empleados en ensayos inmunoquímicos pero solo son utilizados una vez, ya que su estabilidad en solución es muy limitada. En cambio, si se logran inmovilizar de una manera adecuada en una matriz sólida, su estabilidad se prolonga por más tiempo y es posible reutilizarlos, con lo cual sus perspectivas de aplicación (p. ej. como IAs) se amplían.

Cuando un anticuerpo está en solución acuosa, se establece un equilibrio entre la biomolécula en su estado activo plegado y en su estado inactivo desplegado. El desplazamiento hacia el estado desplegado depende del tiempo, temperatura y tipo de medio (pH, sales, presencia de disolventes orgánicos u otros agentes desnaturizantes). La desnaturización de una proteína globular se representa en la figura IX.10.

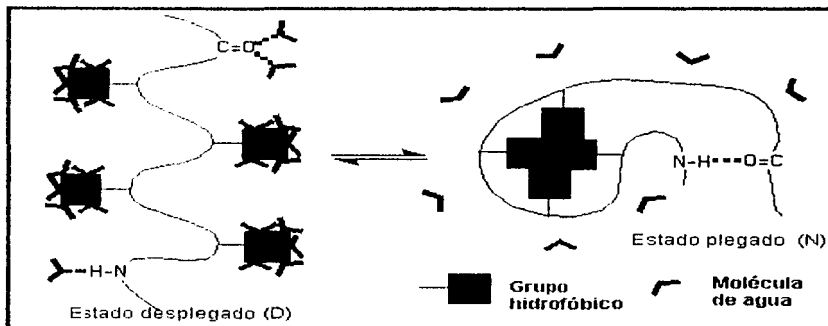


Figura IX.10. Equilibrio de una proteína globular en solución.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Se considera que el plegamiento de proteínas globulares es principalmente debido a efectos hidrofóbicos, los cuales provocan la asociación de los residuos hidrofóbicos en el centro de la proteína. In vitro, la mayoría de las proteínas se despliega o agrega cuando están en estado sólido (liofilizadas). Una vez disueltas, las proteínas tienden a estar en los estados plegados, recuperando sus actividades, debido al ambiente hidratado (similar al estado in vivo) y los efectos hidrofóbicos que éste provoca. Sin embargo, si las proteínas permanecen en la solución demasiado tiempo, el estado plegado tiende a desplegarse debido por las interacciones intermoleculares de la proteína con el agua.

Los cambios energéticos relacionados con la desnaturalización de una proteína en solución acuosa están dados por el término clásico:

$$\Delta G = \Delta H - T \Delta S$$

La diferencia en la energía libre de Gibbs de los dos estados (plegado:N y desplegado:D) es sólo de aproximadamente 5-20 Kcal/mol. Esto es equivalente a la energía libre de algunos puentes de hidrógeno o pares iónicos, cuyo valor es de aproximadamente 0.5-2 Kcal/mol y 0.4-1.0 Kcal/mol, respectivamente. La energía libre del estado nativo plegado (N) y el estado desnaturalizado desplegado (D) depende de los efectos combinados de la exposición de los grupos polares y no polares y su interacción con el agua junto con los cambios intermoleculares agua-agua. Los efectos entálpicos y entrópicos involucrados en el desdoblamiento de la proteína se compensan en tal medida que aunque la diferencia de energía libre es pequeña, los valores de ΔH y ΔS son superiores a ± 100 Kcal/mol. De manera indicativa, la figura IX 11 muestra los cambios energéticos asociados con la estabilidad de la proteína a diferentes temperaturas.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

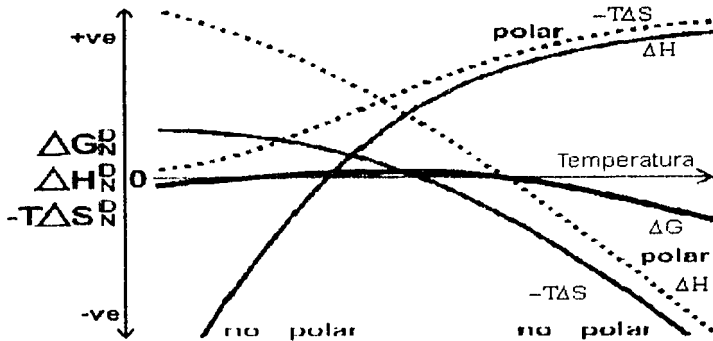


Figura IX.11. Cambios energéticos en la estabilidad de una proteína.¹⁰¹

A bajas temperaturas, la hidratación de los grupos polares y apolares en la proteína desplegada provoca una disminución en la entropía porque se induce un ordenamiento en la estructura del agua. Para los grupos polares este efecto es aún más importante a altas temperaturas ya que son capaces de crear capas de hidratación ordenadas a pesar del estado desordenado del agua a esas temperaturas. En cambio los grupos apolares son incapaces de mantener el ordenamiento del agua en esas circunstancias y de hecho contribuyen al desorden al incrementar las tensiones sobre la red de puentes de H de su estructura

La entalpía de transferencia de los grupos polares desde el interior de la proteína hacia el agua depende de la energía requerida para romper las interacciones polar-polar en la proteína plegada y agua-agua en el disolvente y de la energía liberada al formarse nuevas interacciones polar-agua. A bajas temperaturas ΔH es positivo porque el estado más estructurado del agua requiere mayor aporte de energía para romper sus enlaces. A altas temperaturas ΔH es negativo ya que los grupos polares crean su propia agua ordenada lo que libera una energía mayor que la que se requiere para romper los enlaces en las estructuras pre-existentes a estas condiciones de temperatura. Por otra parte, cuando un grupo apolar es transferido al agua, éste se aloja en las cavidades de la red (formadas por los puentes H que unen entre sí a las moléculas de agua) provocando tensiones y

deformaciones, pero no la ruptura de enlaces. En consecuencia, a bajas temperaturas, la energía requerida para ensanchar la cavidad que alojaría al grupo apolar y romper las débiles interacciones (de dispersión) entre grupos apolares de la proteína plegada es ampliamente superada por las interacciones agua-grupo apolar (dipolo-dipolo inducido) que se establecen y por el reforzamiento del orden en la estructura pre-existente, lo que genera una liberación neta de energía ($\Delta H < 0$). Al aumentar la temperatura el orden pre-existente se pierde y el efecto de los grupos apolares también, éstos no son capaces de establecer interacciones suficientemente intensas con el agua desordenada que los rodea por lo que se requiere una adición de energía para crear la nueva estructura (grupos apolares singulares inmersos en el agua).

La suma de los efectos descritos da lugar a una curva ΔG con un valor ligeramente positivo, pero muy cercano a cero, entre aproximadamente 10 y 35 °C (ver figura IX.11) y una mayor tendencia hacia el desdoblamiento de la proteína ($\Delta G < 0$) a muy bajas temperaturas ("desnaturalización fría") y particularmente a altas temperaturas ("desnaturalización caliente").

Una primera conclusión derivada de la discusión anterior es que las soluciones acuosas de anticuerpos son termodinámicamente poco estables y que esta condición no se mejora cuando se mantienen en refrigeración. Experimentalmente se comprobó este hecho pues, aún en condiciones favorables (buffer de fosfatos a pH ~7), las soluciones de anticuerpo mantenidas en refrigeración mostraron una fuerte pérdida de actividad después de 5 semanas de almacenamiento.

Por otra parte, aunque el proceso sol-gel se realiza a una temperatura favorable (temperatura ambiente ~ 25°C) para la estabilidad del anticuerpo en solución, el alcohol generado en la hidrólisis del TEOS disminuye los efectos hidrofóbicos sobre los grupos apolares de la proteína y desplaza su equilibrio hacia la forma desplegada. Adicionalmente se ha reportado⁸ un efecto altamente nocivo del TEOS sobre la actividad de los anticuerpos. Esto explica fácilmente el hecho de que los primeros geles dopados con anti-2,4-D fueran completamente inactivos, pues el anticuerpo estuvo largo tiempo en contacto con los dos agentes desnaturalizantes mencionados. Era entonces imperativo encontrar condiciones

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

tales que, al añadir el anticuerpo al sol, la gelificación se produjera muy rápidamente, de modo que el propio encapsulamiento en un espacio restringido dificultara o impidiera el desdoblamiento de la proteína.

El encapsulamiento del anticuerpo preserva su estabilidad sólo si la conformación plegada dentro de los poros de la matriz es la más favorable. Por ello, el tamaño y forma del poro son de suma importancia para mantener plegado al anticuerpo con su esfera de solvatación.

9.3.5. Modificaciones realizadas en la encapsulación de anticuerpos.

El control en la porosidad y tiempo de gelificación fueron los parámetros a optimizar para obtener un biomaterial adecuado. Se ha mencionado que la manera en que se lleva a cabo la gelificación es fundamental para las propiedades del xerogel (gel seco) obtenido al final del proceso. La formación de grandes micelas (partículas elementales) durante las primeras etapas del proceso, combinada con un alto grado de entrecruzamiento durante su agregación progresiva, conduce a un gel capaz de mantener una estructura altamente porosa durante el secado. El tamaño de las micelas aumenta cuando se prolonga el tiempo de hidrólisis por medio de una lenta velocidad de condensación. Por otra parte, el tipo de agregación depende de la importancia relativa (o radio de las constantes cinéticas) de las reacciones de hidrólisis y condensación.

En la figura IX.12 se muestra la red polimérica formada en procesos sol-gel con catalisis ácida y básica. La primera da lugar a largas cadenas de polímero con bajo grado de entrecruzamiento (red flexible) mientras que la segunda conduce a una estructura compacta de agregados fuertemente entrecruzados. En la figura IX.13, se observa más detalladamente la formación de la red polimérica para el caso de la hidrólisis ácida. Las partículas elementales formadas lentamente durante la etapa de nucleación condensan formando largas cadenas que progresivamente se agregan, aumentando gradualmente la viscosidad del sol, hasta llegar al punto de gelificación cuando se forman los enlaces suficientes entre las cadenas y la solución deja de fluir. En este momento se produce la transición sol-gel.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Catálisis ácida

-polímero principalmente lineal
o ramificado al azar.



Catálisis básica

- agregados altamente
ramificados.



Figura IX.12. Efecto del tipo de hidrólisis en la formación de la red del gel.⁴⁶

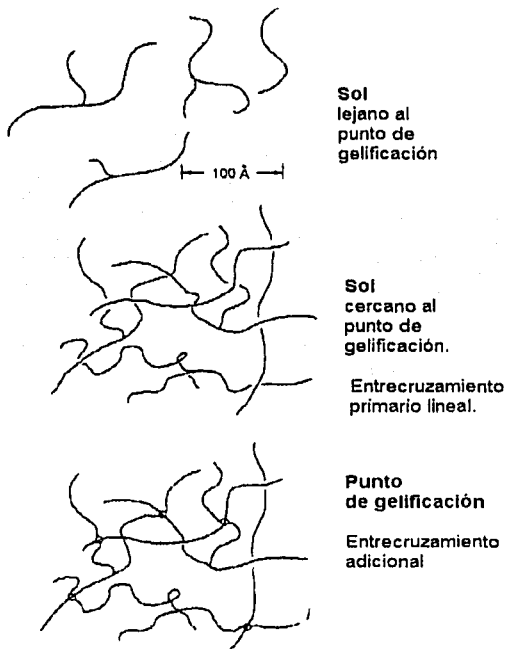


Figura IX.13. Formación de la red de sílica de la hidrólisis ácida de un alcóxido.⁴⁸

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

De acuerdo con la discusión anterior, un gel óptimo se obtendría combinado las ventajas de la hidrólisis ácida (grandes partículas elementales formadas en las primeras etapas del proceso) y de la hidrólisis básica (alto grado de interconexión entre los agregados poliméricos al momento de la gelificación). Como ilustración, en la figura IX.14, se presenta la reproducción de una microfotografía ⁹⁵ que muestra la formación del sistema coloidal durante la etapa de nucleación en un medio ácido.

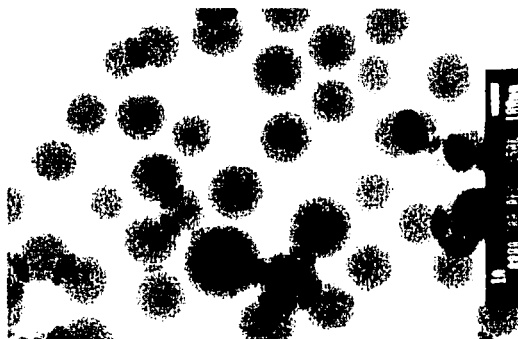


Figura IX.14. Formación del sistema coloidal en la hidrólisis ácida de alcóxidos de silicio ⁹⁵

Durante la preparación de los primeros geles dopados con anti-2,4-D (tabla VIII.2), el anticuerpo disuelto en PBS se agregó justo después de los 30 minutos de sonicación del sol. El aumento del pH provocado por el buffer (100-200 μ L, 0.02M) disminuyó la velocidad de hidrólisis y aumentó la velocidad de condensación. Después de dejar el recipiente de reacción abierto a temperatura ambiente por espacio de 36-48 horas, se produjo la gelificación. Sin embargo, debido a que los 30 min de sonicación no fueron suficientes para hidrolizar todo el TEOS (lo cual se dedujo por el olor percibido), este reactivo provocó la desnaturalización del anticuerpo en el medio de reacción. Además, como la hidrólisis se volvió más lenta y el sistema estaba abierto, parte del TEOS se evaporó disminuyendo el rendimiento de la reacción.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Con el objeto de proteger al anticuerpo se hicieron algunas modificaciones: 1). Se aumentó el volumen de HCl en la mezcla inicial para favorecer la hidrólisis del TEOS, 2) Al añadir el anticuerpo (después de la sonicación) se agregó también una alícuota de PBS más concentrado (25 μ l, 0.1 M) para asegurar la neutralización del medio ácido y 3) Se realizó un secado menos intenso y más lento del gel para evitar un fuerte colapso de los poros en esta etapa. Los resultados obtenidos mostraron que estas modificaciones no fueron suficientes para preservar la actividad del anticuerpo ni para aumentar el rendimiento de la reacción. Aparentemente la hidrólisis total del TEOS requería condiciones más drásticas.

En un estudio reportado en la literatura⁹⁶ se siguió la hidrólisis del TEOS a lo largo del tiempo. Aunque las condiciones usadas por los autores difieren de las del presente trabajo, los resultados son reveladores. De acuerdo con éstos, las especies parcialmente hidrolizadas del precursor son muy reactivas y condensan rápidamente, pero la hidrólisis misma del TEOS requiere un mayor tiempo. Después de los 30 min de reacción (en un medio considerablemente más ácido que el nuestro y con adición de cosolvente) la proporción de TEOS no hidrolizado fue superior al 45% y sólo hasta después de 150 min de reacción, la cantidad remanente de esta especie descendió abajo del 10%.

Considerando lo anterior, se decidió no sólo aumentar la cantidad de HCl sino también prolongar el tiempo de contacto del TEOS con el medio ácido por varias horas, antes de añadir el PBS y el anticuerpo. Los cambios realizados en la proporción inicial fueron los siguientes:

Anterior (sonicación por 30 min en baño de hielo).

2.5 ml de TEOS + 0.1mL de HCl 0.04M + 0.4 mL de H₂O

Relación molar

$1.1 \times 10^{-2} \text{ mol} + 4 \times 10^{-6} \text{ mol} + 2.8 \times 10^{-2} \text{ mol}$. pH de la fase acuosa = 2.1

Nuevo (sonicación por 30 min en baño de hielo).

2.5 ml de TEOS + 0.1mL de HCl 0.1M + 0.4 ml de H₂O.

Relación molar

$1.1 \times 10^{-2} \text{ mol} + 1 \times 10^{-5} \text{ mol} + 2.8 \times 10^{-2} \text{ mol}$. pH de la fase acuosa = 1.7

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Después de los 30 min en baño de hielo y bajo sonicación el recipiente con el sol se dejó en reposo a temperatura ambiente y tapado. De esta manera se dio tiempo para que la hidrólisis del TEOS se completara y se evitó la pérdida de este reactivo por evaporación. A medida que el tiempo transcurría, el sol se iba haciendo más viscoso indicando con ello que, a pesar del medio ácido desfavorable la condensación progresaba lenta pero continuamente. Cuando dejó de percibirse el olor de TEOS y se observó que la mezcla de reacción adquiría una consistencia elástica se consideró que era el momento adecuado para introducir al anticuerpo, por lo que se procedió a neutralizar el medio ácido y desestabilizar al sol.

Un fenómeno interesante fue observado durante la primera etapa del proceso. Al retirar el recipiente del baño de ultrasonido, el sol transparente se transformó en una emulsión de color blanco lechoso, regresando después de algún tiempo a su apariencia inicial. Esto puede explicarse por la presencia de TEOS no reaccionado, la baja temperatura de la mezcla al sacarla del baño y la insuficiente cantidad de etanol formado hasta ese momento, obviamente la mezcla no era miscible en esas condiciones. Al equilibrarse el recipiente a la temperatura ambiente y progresar la hidrólisis formando más alcohol y disminuyendo la cantidad de TEOS, el sol volvió a ser transparente y homogéneo.

9.3.6. Desestabilización del sol para acelerar la gelificación. Encapsulamiento del anticuerpo.

Para desestabilizar un sistema coloidal es común efectuar cambios de pH y/o de fuerza iónica del medio, los cuales modifican la estructura de la doble capa eléctrica provocando la coalescencia de las partículas coloidales. En este trabajo, se optó por agregar una solución salina de un buffer a pH ~ 7 (PBS concentrado 0.2 M) para disminuir el espesor de la doble capa eléctrica y el potencial zeta de las redes poliméricas independientes facilitando su acercamiento y con ello su agregación. Al mismo tiempo se lograba la neutralización del medio ácido y se proveía de un medio favorable para el anticuerpo. Como muestra la figura IX.15, las partículas o agregados poliméricos individuales presentes en el sol (con un tamaño del orden de 1 nm en el caso de un medio

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

ácido) condensan rápidamente en presencia de sales para formar la estructura tridimensional del gel. Debido a ello, es necesario agregar de inmediato el anticuerpo y agitar vigorosamente la solución para que se reparta homogéneamente y que quede perfectamente encapsulado, puesto que en menos de dos minutos se produce la gelificación.

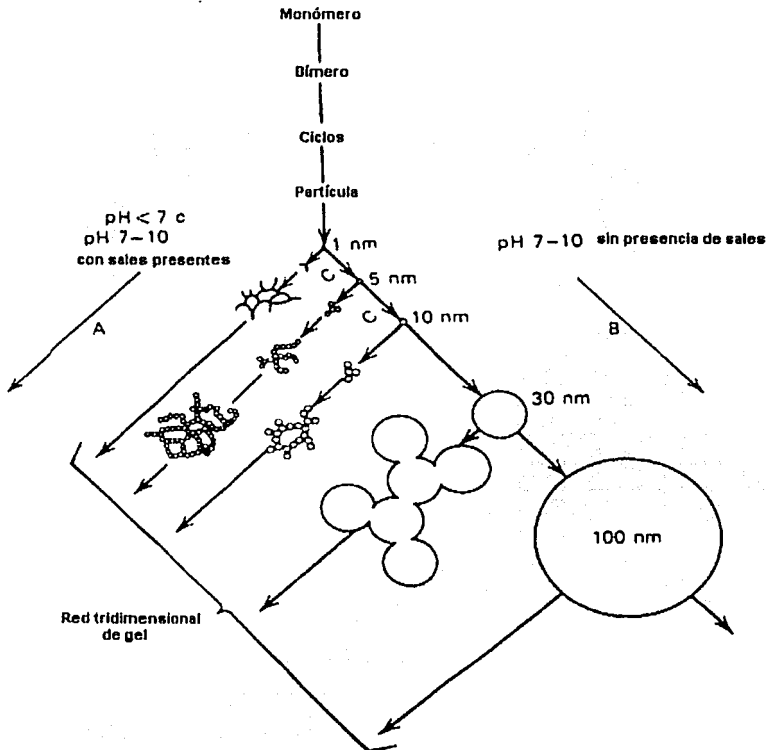


Figura IX.15. Parámetros que afectan la transición sol-gel.⁴⁸

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

De acuerdo con algunos trabajos,⁹⁶ al producirse la transición sol-gel, la red tridimensional se forma alrededor de la biomolécula conformándose a su estructura y tamaño actual. Es decir, la biomolécula actúa como una plantilla determinando la estructura y tamaño del poro que la encapsula. Por lo tanto, si en el momento en que la estructura se consolida, la proteína se encuentra plegada rodeada por su esfera de solvatación, quedará atrapada dentro de un poro de dimensiones adecuadas que favorecerá su estabilidad.

Recientemente se han realizado estudios sobre las dimensiones mínimas que debe tener el poro de la red de gel con un anticuerpo adecuadamente atrapado. Estas dimensiones están basadas en el tamaño molecular de la inmunoglobulina junto con la esfera de hidratación que la mantiene plegada; se determinó que el diámetro debe ser de al menos 60 Å aproximadamente. La forma en como queda atrapado el anticuerpo en la matriz de gel, establecida mediante simulación computarizada se ilustra en la figura IX.16.⁹⁷

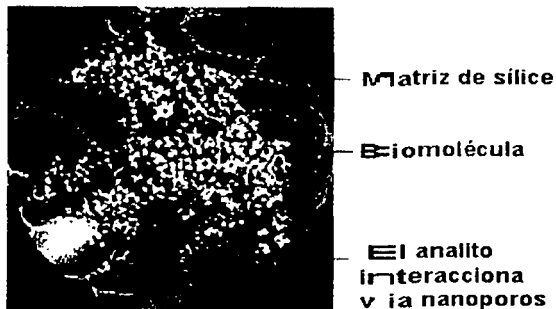


Figura IX.16. Simulación computarizada de la encapsulación de un anticuerpo en una matriz de sílica.⁹⁷

9.3.7. Lavado del IA.

Al producirse la transición sol-gel, la monofase coloidal se transforma en un sistema bifásico constituido por la matriz sólida del gel y la red de poros y canales interconectados que contienen una fase líquida atrapada. Esta fase líquida está formada por agua, buffer,

etanol, eventualmente alcóxico no hidrolizado y el anticuerpo. El lavado del IA obtenido tuvo por objeto eliminar el etanol y los posibles rastros de alcóxico sin reaccionar. Se utilizaron mezclas de disolvente orgánico-agua para la eliminación completa del TEOS. Posteriormente, se realizó un lavado abundante con agua para eliminar rastros de disolvente orgánico y finalmente un lavado con PBS 0.02M pH 7.2 para asegurar que el anticuerpo encapsulado tuviera las condiciones óptimas de pH y fuerza iónica que mantener plegada a la proteína estabilizando su conformación nativa.

9.3.8. Maduración y secado de los IAs.

Obtenido el inmunogel, el siguiente aspecto a controlar fue el tipo y extensión de secado del biomaterial. Dado los resultados decepcionantes obtenidos con los primeros geles dopados con anti-2,4-D, inicialmente se optó por trabajar con el gel húmedo empacado tras una trituración. Para asentar el lecho, se hicieron 3 o 4 experimentos de EFS en blanco (sin agregar el antígeno); consistentes en el paso sucesivo de PBS, agua y mezcla de ACN:H₂O 50:50 (v/v) para simular la carga, el lavado y elución del cartucho. De esta manera, el empaque se compactó aproximadamente a la mitad de su volumen inicial. Posteriormente, los cartuchos con los hidrogeles dopados con 300, 500 y 700 µg de anti-2,4-D se evaluaron cargando soluciones de 2,4-D éster. Los resultados obtenidos (tabla VIII.6) demostraron la persistencia de actividad en el anticuerpo encapsulado. Sin embargo, al utilizar estos cartuchos en ciclos repetidos de carga-elución-regeneración, se observó un aumento progresivo en la caída presión que dificultaba la percolación de las soluciones hasta que el cartucho se volvía materialmente inutilizable. Este problema fue mínimo con los geles dopados con 300 µg de anticuerpo, los cuales pudieron ser utilizados repetidamente (más de 50 cargas), pero resultó crítico con los geles dopados con mayor cantidad de anticuerpo.

Una explicación factible del aumento de presión en los cartuchos es por el desgaste y posterior disgregación de los bordes y vértices de las partículas irregulares del hidrogel debido a la fuerza aplicada al percolar las diferentes soluciones durante la EFS. Los polvos

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

finos así formados, probablemente migraron a través del lecho y quedaron atrapados en el filtro de acero poroso del extremo inferior del cartucho, bloqueando el flujo. De hecho, esto fue confirmado ya que ocasionalmente se desempacó cuidadosamente un cartucho bloqueado y se volvió a empaque cambiando o lavando previamente los filtros, después de lo cual el flujo quedó restaurado (al menos temporalmente).

Sin embargo, lo anterior no explica por qué la fragilidad de los hidrogeles y el consecuente aumento de presión del cartucho fue mayor al incrementarse la cantidad de anticuerpo encapsulado en ellos. Al respecto, es importante mencionar que, durante los experimentos de EFS, al pasar el solvente de elución (mezclas de MEOH:H₂O o ACN:H₂O) se notó que el empaque se apretaba fuertemente, tanto más cuando mayor cantidad de anticuerpo contenía el gel. Posteriormente, al pasar PBS para regenerar el cartucho, el empaque regresaba poco a poco a su condición inicial. Evidentemente, la mayor fuerza aplicada para percolar las soluciones entre mayor era la pérdida de permeabilidad del cartucho condujo a un más rápido desgaste del empaque y a un mayor y más rápido bloqueo de los filtros.

La hipótesis que se propone como explicación de estos fenómenos es la siguiente: En el ambiente favorable de PBS, el anticuerpo se encuentra plegado e interacciona con el analito (el pesticida-antígeno) a través de sus sitios activos. Al percolar el solvente de elución, la biomolécula tiende a cambiar su configuración y el analito es entonces liberado. Sin embargo, puesto que los anticuerpos están encapsulados en poros cuyo tamaño y forma se han adaptado a los de la proteína plegada, la tendencia al desdoblamiento ejerce presiones sobre la red tridimensional del sólido (que en el caso de un hidrogel presenta cierto grado de flexibilidad) y esto provoca posiblemente un bloqueo local del flujo. Al aumentar la cantidad de anticuerpo encapsulado, las tensiones sobre la red aumentan y el efecto anterior se magnifica. Aunado a lo anterior, es también factible que el polímero de sílice sufra cierto grado de hinchamiento en presencia del disolvente orgánico.

La hipótesis anterior está soportada por otras observaciones experimentales. La primera de ellas se refiere al tiempo de recuperación que requieren los cartuchos entre usos

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

sucesivos para alcanzar la máxima retención del analito (ver p.ej. figura VIII.6). Este tiempo de recuperación solo puede ser atribuido a que la biomolécula sufre cambios (no permanentes) en su configuración durante la elución y que después de ésta requiere pasar cierto tiempo (~ 30 min) en el ambiente favorable de PBS para recuperar su forma activa original y poder retener al soluto. Por otra parte, para comprender el comportamiento de los hidrogeles con anticuerpo, se preparó un hidrogel no dopado (hidrogel blanco), se empacó y se sometió a un tratamiento idéntico. Durante los primeros experimentos de EFS con este cartucho, el empaque se compactó al mismo nivel que lo habían hecho los geles dopados. También se notó que en los experimentos de EFS simulada (ya que este cartucho no retenía analito en las condiciones de carga empleadas) se producía un ligero aumento de presión al percolar el disolvente de elución. Este aumento de presión (indicativo de un hinchamiento del polímero en presencia del solvente orgánico) fue sin embargo mucho menor que con los geles dopados. Finalmente, se constató que el cartucho con hidrogel blanco podía usarse repetidamente en ciclos de carga-elución-regeneración sin que su permeabilidad fuera afectada aún después de un gran número de ciclos. Lo anterior, confirma que los problemas de permeabilidad de los cartuchos con hidrogeles dopados y el resultante taponamiento de los filtros están relacionados con la presencia del anticuerpo en el gel y más específicamente con la cantidad de éste.

Las propiedades de los hidrogeles (red compresible, con relativa flexibilidad y elasticidad de sus paredes) están íntimamente relacionados con los fenómenos que se producen después de la transición sol-gel. Es sabido que en el ambiente que se encuentra en los poros después de la gelación (solución de PBS, pH 7.2, en nuestro caso) las reacciones de condensación continúan ocurriendo entre residuos poliméricos no entrecruzados o entre silanoles superficiales vecinos en los poros. Estas reacciones de policondensación tienen una gran importancia en el desarrollo de la estructura tridimensional del gel ya que, por una parte los agregados se consolidan y el sólido se densifica, pero esto va acompañado por expulsión de agua de los poros y encogimiento del hidrogel.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

A manera de ilustración, la figura IX.17 muestra la sinéresis que ocurre en el poro de un gel inmaduro por condensación entre silanoles de superficie. Así, los fenómenos que ocurren en esta etapa, conocida como maduración del gel, provocan la disminución en el diámetro y volumen de los poros pero, al mismo tiempo, refuerzan hasta cierto grado la estructura del material.

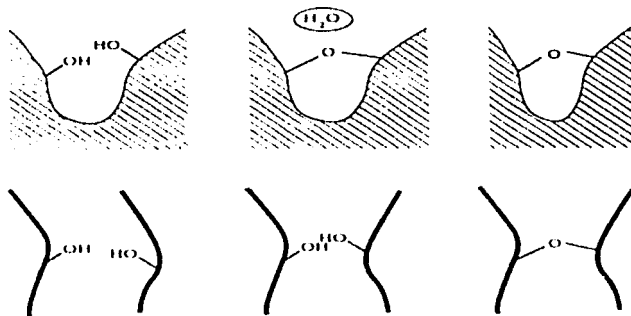


Figura IX.17. Sinéresis de una red inmadura de gel.⁴⁸

Los hidrogeles preparados en este trabajo, después de ser triturados, lavados y empacados fueron dejados en PBS durante un par de días antes de su uso para permitir su maduración. Como quedó explícito por los resultados presentados en el capítulo anterior, las propiedades de retención de los hidrogeles dopados fueron bastante buenas comparadas con datos reportados en la literatura para otros IAs sol-gel desarrollados.^{22, 42, 94} Además, como era de esperarse, la capacidad de retención de los cartuchos aumentó al incrementarse la cantidad de anticuerpo encapsulado, pero dicho aumento no fue lineal. De hecho, para los hidrogeles dopados con anti-2,4-D (tabla VIII.6 página. 95) la capacidad relativa expresada como cantidad de soluto retenido por masa de anticuerpo inmovilizado, disminuyó ligeramente al aumentar la densidad de anticuerpo en el gel. Es posible que a mayor cantidad de anticuerpo añadido al sol durante el proceso de inmovilización, la probabilidad de agregación entre estas moléculas aumente, o bien, que una vez formado el hidrogel las biomoléculas no queden homogéneamente repartidas y bien aisladas en cavidades separadas lo que provocaría perturbaciones mutuas alterando la interacción con

el analito. Cualquiera que sea la razón de este fenómeno, el principal problema que se enfrenta al tratar de aumentar la capacidad de retención del analito, por aumento de la cantidad de anticuerpo atrapado es la ya discutida pérdida acelerada de permeabilidad del cartucho. Esto es lo que realmente limita la aplicabilidad de los hidrogeles dopados. Para resolver este problema se decidió ensayar un secado lento y controlado de los geles, tal que la pérdida de agua y el colapso de los poros asociado con ella no fueran excesivos y se pudiera mantener la actividad de la biomolécula. La ventaja de un gel seco, es que puede molerse más homogéneamente en un mortero y las partículas resultantes, aunque irregulares, no presentan aristas y bordes pronunciados. Por otra parte, se ha mencionado ⁹⁸ que la resistencia química y las propiedades mecánicas de los xerogeles son muy superiores a los de los hidrogeles. Durante la etapa de secado, las fuerzas capilares originadas por la tensión superficial de la fase líquida tienden a densificar fuertemente la parte sólida del gel juntando las partículas elementales, comprimiendo la red, disminuyendo significativamente el volumen poroso y destruyendo las paredes más frágiles de la estructura tridimensional (figura IX.18).

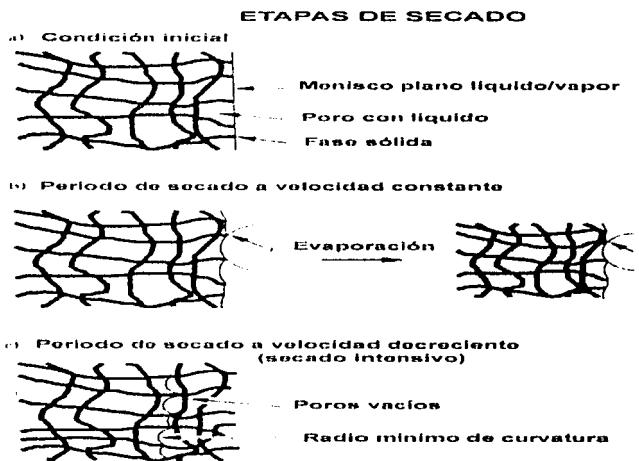


Figura IX.18 Secado de un hidrogel.⁴⁶

Aunque estos fenómenos consolidan al material y refuerzan su resistencia mecánica, el excesivo colapso de los poros puede dañar a la biomolécula encapsulada o bloquear sus sitios activos y además dificulta la difusión de especies desde el medio exterior hacia el interior del gel. En la figura IX.19 se representa esquemáticamente el efecto que tienen el tamaño de los poros, la orientación de la biomolécula y la accesibilidad de su sitio activo sobre la capacidad de interacción con el antígeno. Como puede observarse, aún cuando se logre preservar en gran medida la conformación nativa de la biomolécula durante su encapsulamiento, es indispensable mantener la estructura de porosidad adecuada para una alta capacidad de enlace. La naturaleza de la fase líquida y la manera en que ésta es removida son factores determinantes en el control de la morfología del producto final. Por ello, una opción que ha sido utilizada para mantener la estructura porosa de materiales sol-gel consiste en intercambiar la fase líquida acuosa por otro líquido de menor tensión superficial (p.ej. disolventes orgánicos o CO₂ supercrítico) antes del secado. Sin embargo, esta opción no es viable en el caso de geles dopados con moléculas delicadas como las proteínas que requieren de un medio acuoso y un secado no intensivo que les permita mantener su capa de solvatación.

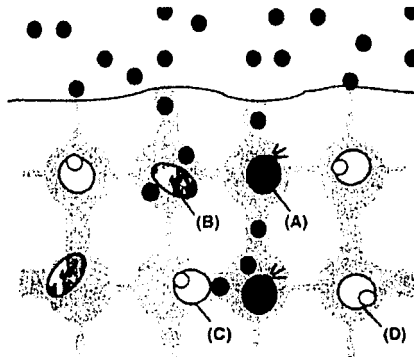


Figura IX.19. Efecto de la porosidad y orientación de una biomolécula en la conservación de su actividad en el estado encapsulado. (A) Biomolécula orientada adecuadamente que capta al sustrato (B) biomolécula inactiva (C) biomolécula parcialmente accesible para el sustrato (D) biomolécula con el sitio activo mal orientado hacia el sustrato.

Se ha sugerido ⁹⁹ que para minimizar el encogimiento del gel y mantener su estructura porosa durante el secado es necesario reforzar las propiedades mecánicas del hidrogel previo. Como se comentó en una sección anterior, esto se logra empleando condiciones de gelación que conduzcan a la formación de grandes partículas elementales y a un alto grado de interconexión en la red. En este trabajo se utilizó un medio fuertemente ácido durante la etapa de hidrólisis, lo que condujo a un proceso de nucleación lento por la baja velocidad de condensación en estas condiciones, dando como resultado la formación de grandes micelas. El sol se dejó en estas condiciones largo tiempo con lo cual se aseguró la hidrólisis prácticamente total del alcóxido y el consiguiente aumento en la concentración de micelas, así como su progresiva agregación. Posteriormente, con la adición de PBS, se produjo una fuerte aceleración de las reacciones de condensación y con ello un rápido entrecruzamiento de los agregados para formar la red polimérica. En resumen, las condiciones utilizadas, muy ácidas en las primeras etapas y neutras en la etapa previa a la gelación, fueron ideales para la formación de un hidrogel altamente poroso pero al mismo tiempo relativamente resistente.

Para la preparación de los xerogeles se optó por someter al hidrogel no maduro (justo después de la trituración y lavado) a un proceso lento de secado en refrigeración. Por lo tanto, la maduración y la evaporación del líquido ocurrieron simultáneamente. La presencia de PBS en el líquido (acuoso) de los poros del material fue probablemente muy benéfica en esta etapa. Por una parte, el pH impuesto favoreció las reacciones de policondensación y consolidación de los agregados, típicos de la maduración, que refuerzan la estructura interna del polímero. Además, la alta concentración iónica opuso resistencia a la pérdida de agua limitando la velocidad de evaporación. Dado que los geles sólo fueron secados hasta pérdida del 50% de su peso con respecto al hidrogel húmedo inicial, se aseguró la persistencia de humedad en los poros del gel para proteger al anticuerpo. En efecto, de acuerdo con los datos reportados en la literatura ⁹⁸ un xerogel totalmente seco tiene un volumen de 1/8 y un peso de 20% con respecto al hidrogel húmedo original.

Existen muchas discrepancias respecto a las condiciones óptimas de secado para un biogel. Algunos autores realizan un secado intensivo al vacío por varios días o en sistemas

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

abiertos (T ambiente o 4°C) por varias semanas, otros secan al 50% y algunos más prefieren no secar y trabajar con hidrogeles. En cuanto a la velocidad de secado, se ha recomendado¹⁰² que los biogeles derivados de tetralcoxilanos se sequen muy lentamente, pero también hay autores¹⁰⁴ que sugieren un rápido secado para que al contraerse el poro alrededor de la biomolécula restrinja sus movimientos conformacionales impidiendo su desdoblamiento. A pesar de estas diferencias, en lo que sí parece haber un consenso es que los poros de un biogel se comportan de dos maneras distintas durante el secado. Aquellos poros que están libres (sin biomolécula) se contraen fuertemente al evaporarse la fase líquida, mientras que los poros que contienen la molécula dopante se contraen en menor grado, conformándose al tamaño y forma de la proteína.

Muchas de las discrepancias encontradas en la literatura, no sólo respecto a la forma de secado sino en general respecto al procedimiento óptimo para preparar un biogel, pueden provenir de las distintas maneras en que dichos biogeles son caracterizados o evaluados posteriormente. En muchos casos, estas evaluaciones se basan en la medición de propiedades espectroscópicas (absorbancia, fluorescencia) de la molécula dopante, aprovechando la transparencia óptica de los materiales sol-gel. Un ejemplo clásico es el trabajo realizado por Dunn et al⁹⁴ quienes estudiaron los desplazamientos espectrales de la banda Soret de absorción del citocromo C encapsulado en hidrogeles y xerogeles con respecto al espectro obtenido para la misma proteína en solución (figura IX.20). La longitud de onda del máximo de absorción de la banda Soret fue casi idéntica en un hidrogel maduro y en solución. Cuando el hidrogel se secó a temperatura ambiente hasta 20% de su peso original, la banda se desplazó hacia menores longitudes de onda pero, al ser rehidratado el xerogel, la banda regresó a su posición inicial. La conclusión de los autores es que el desplazamiento de la banda en el xerogel no fue debido al colapso del poro durante el secado, el cual es un proceso irreversible, sino a un cambio en el microambiente de la proteína causado por la pérdida de agua. Al rehidratarse el xerogel, la biomolécula recuperó su esfera de solvatación y por tanto su conformación y propiedades originales. En contraposición con esta hipótesis, Wang et al⁴⁴ encontraron que las condiciones drásticas de secado produjeron una desnaturalización irreversible del anticuerpo anti-fluoresceína. Estos autores encapsularon la fluoresceína sola y el complejo fluoresceína-anti-fluoresceína

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

y compararon la fluorescencia de los geles. Los hidrogeles con el complejo encapsulado, madurados por diferentes períodos de tiempo, mostraron una fluorescencia mínima (el anticuerpo bloquea la fluorescencia de la fluoresceína). Sin embargo, al secar los hidrogeles entre 2 y 4 semanas a 4°C la fluorescencia de los xerogeles fue aumentando con el tiempo de secado hasta alcanzar la misma intensidad que la del gel con fluoresceína sola encapsulada. Al rehidratar estos xerogeles no se observó ningún cambio. Lo anterior indica que el complejo fue destruido con el secado debido a la degradación irreversible del anticuerpo.

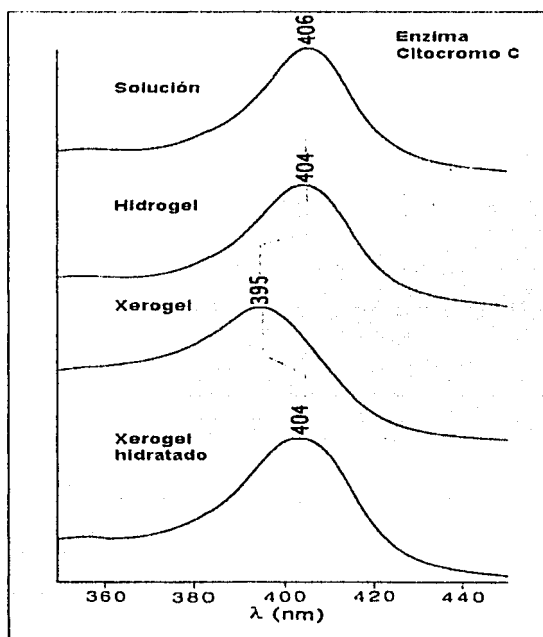


Figura IX.20. Secado y rehidratación del citocromo c en el estado encapsulado.⁹⁴

Desde nuestro punto de vista, la medida de una propiedad física de una biomolécula encapsulada no es suficiente para concluir sobre la efectividad y aplicabilidad del material

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

preparado. Es indispensable determinar el comportamiento de la especie encapsulada con respecto a su contraparte, un sustrato para una enzima o un antígeno para un anticuerpo. En un trabajo anterior del grupo de investigación con enzimas encapsuladas,⁹³ se demostró que la transformación de los respectivos sustratos por el biogel es prácticamente nula cuando el material se secaba más allá de un 50-60% de pérdida de peso.

En este trabajo, la optimización progresiva de las condiciones experimentales para la preparación de los IAs sol-gel, desde el tipo, cantidades y proporciones de los reactivos hasta el secado del gel, proporcionaron resultados muy satisfactorios. Los cartuchos empacados con xerogeles molidos, dopados con diferentes anticuerpos, pudieron ser utilizados en múltiples experimentos de EFS de los respectivos antígenos, sin que disminuyera significativamente la capacidad de retención con el uso. Tampoco se registraron problemas graves de pérdida de permeabilidad, como sucedió con los hidrogeles. Esto indica que el material efectivamente se reforzó con el secado y que el anticuerpo inmovilizado quedó bien protegido y estabilizado por el propio poro en que fue atrapado.

Un efecto adicional del secado del gel fue el aumento de retención del antígeno con respecto a la retención observada en el hidrogel equivalente. Este efecto inesperado no ha sido reportado previamente en la literatura y sin embargo fue observado sistemáticamente, tanto con los geles dopados con anti-2.4-D, como con los geles dopados con anti-malatión (tablas VIII.6 y VIII.9). Aunque no se tienen bases experimentales para comprobarla, la explicación propuesta es la siguiente. La consolidación y el reacomodo que sufre toda la estructura polimérica del gel durante el secado pudo haber inducido un mejor posicionamiento de las moléculas dopantes dentro de los poros, desbloqueando en algunos casos sus sitios activos. Alternativa y adicionalmente, es posible que esta evolución de la estructura encapsulara a las biomoléculas en espacios bien definidos y separados eliminando o reduciendo las perturbaciones mutuas y favoreciendo así la interacción individual con el soluto.²² En todo caso, es evidente que el colapso de los poros asociado con el secado no bloqueó la red de canales y poros interconectados a través de los cuales difunde el soluto hasta alcanzar los sitios activos donde se encuentra atrapado el

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

anticuerpo. También es evidente que las moléculas del anticuerpo que permanecieron estables y activas durante el proceso sol-gel no fueron dañadas durante el secado.

Como corolario de la discusión en las secciones anteriores sobre el proceso sol-gel y su optimización, en la tabla IX.3 se presentan en forma resumida las condiciones establecidas para el encapsulamiento de anticuerpos.

Tabla IX.3. Condiciones establecidas para la preparación de IAs por sol-gel.

VARIABLE	DESCRIPCION
Preparación del sol	
Alcóxido precursor	TEOS
Catalizador de hidrólisis	HCl 0.1 M
Relación molar de reactivos	TEOS:ácido:agua 1.1×10^{-2} mol: 1×10^{-5} mol: 2.8×10^{-2} mol.
Prehidrólisis	30 minutos en sonicación y baño de hielo
Evolución del sol	Hasta consistencia elástica
Desestabilización del sol para obtener el IA	
Agente	2 mL de PBS 0.2 M
Encapsulación del anticuerpo	
Tiempo y condiciones	Solución de anticuerpo en PBS 0.02M agregada inmediatamente después del agente destabilizante
Tratamiento post-gelificación	
Lavado	Mezcla de disolvente orgánico-agua→agua→PBS 0.02M
Secado	En refrigeración hasta pérdida de un 50% del peso inicial del hidrogel
Molienda y empaçado	En mortero. Suspensión del polvo en PBS y separación de finos Empacado de la suspensión en cartuchos plásticos con filtros de acero poroso.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

9.4. EVALUACION DE LOS IAs.

9.4.1 Optimización del proceso de inmuoextracción

En la optimización de los protocolos de inmuoextracción se buscó asegurar que el hapteno formara el complejo correspondiente con su anticuerpo bajo las mejores condiciones y que la matriz no interfiriera en la interacción. El estudio preliminar realizado con geles blanco (sin anticuerpo) tuvo por objetivo evaluar la interacción analito-matriz de sílice y encontrar las condiciones que permitieran eliminarla o minimizarla.

En un medio acuoso a alta fuerza iónica (solución de PBS), la adsorción de los compuestos sobre la superficie del sólido es debida principalmente a efectos hidrofóbicos reforzados por el efecto salino (salting-out). Para contrarrestar estos efectos es necesario añadir un disolvente orgánico a la solución, pero esta adición debe ser mínima para no afectar la interacción pesticida-anticuerpo.

Con solutos de moléculas pequeñas y bastante polares, como las triazinas y varios miembros de la familia de los ácidos clorofenoxicarboxílicos, bastó un contenido de 1-2% de ACN en la solución de carga para eliminar totalmente su retención en el gel blanco. Con solutos más hidrofóbicos, como los ésteres metílicos del 2,4-DB y el 2,4,5-T se requirió aumentar el contenido de ACN hasta 10% para minimizar las interacciones no específicas. Sin embargo, es evidente que en estas condiciones se altera también la interacción específica con el sitio activo del anticuerpo; por ello, en el caso del malatión se prefirió buscar otra opción. Dado que la retención de un soluto por efectos hidrofóbicos en un adsorbente polar como la sílice es relativamente débil, se trató entonces de provocar su elución por la propia fase móvil (la solución de carga), aumentando el volumen percolado, como en cualquier proceso cromatográfico. Para una cantidad constante de analito, un aumento en el volumen significa una menor concentración en el líquido y, de acuerdo con la isoterma de adsorción, una menor concentración o cantidad en el sólido. Así este doble efecto permitió minimizar la adsorción del malatión en el gel blanco, aún cuando la solución acuosa de carga (volumen mínimo de 25 mL), sólo se modificó con 2% de ACN. La discusión sobre los parámetros que fueron optimizados subsecuentemente se divide de acuerdo con las 4 etapas del proceso de EFS independientemente del IA.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

9.4.2. Preparación y carga de la muestra.

La composición de la muestra en lo que respecta a la proporción de modificador orgánico quedó fijada según los resultados obtenidos en los ensayos previos en el gel blanco. La adición de PBS 0.02 M se hizo para asegurar que la fuerza iónica del medio y el pH mantuvieran al anticuerpo en las mejores condiciones de retención. En efecto, en su medio natural (fluidos biológicos) los anticuerpos se encuentran en una solución acuosa de pH cercano a la neutralidad y con una concentración salina del orden de 0.1 a 0.15 M. La concentración de PBS finalmente fijada para todos los protocolos de inmuoextracción fue de 0.02M, lo que corresponde a una fuerza iónica 0.18 M.

Con respecto al volumen de carga, se comprobó que los 3 IAs desarrollados podían soportar la carga de un volumen importante de muestra sin que esto afectara su capacidad de retención del antígeno. Lo anterior es una indicación de la buena estabilidad del complejo formado; una vez que todos los sitios activos disponibles han sido ocupados por el correspondiente analito, el complejo no se disocia y por lo tanto el soluto no es eluido por la muestra percolada, aunque se incremente significativamente su volumen. Desde el punto de vista práctico, esto es interesante ya que permite alcanzar altos factores de preconcentración cuando se trabaja con muestras sumamente diluidas del compuesto de interés, lo que es generalmente el caso en análisis ambientales.

En realidad los resultados obtenidos en este trabajo, en lo que se refiere a la caracterización del comportamiento de los IAs, llevan a la conclusión de que los factores que limitan la retención específica del analito son básicamente dos: el número de sitios activos disponibles y la cinética de la reacción de complejación. El primero depende a su vez de varios factores como son: la actividad inicial de los anticuerpos adquiridos comercialmente, el grado de desnaturalización de estas moléculas durante el proceso sol-gel y la accesibilidad final de los sitios activos de los anticuerpos no degradados dentro de su respectivo poro. Por otra parte, el factor cinético depende de la homogeneidad del empaque y de la estructura porosa del material (tamaño, turtuosidad e interconexión de los canales y poros en el gel), que determinan la velocidad de difusión del soluto hacia el

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

anticuerpo encapsulado, y de la propia cinética del acoplamiento entre el antígeno y el anticuerpo.

El proceso que ocurre durante la carga de la muestra es un proceso cromatográfico conocido como análisis frontal. A medida que la muestra es percolada por el cartucho de inmunoadinidad el hapteno disuelto va ocupando los sitios de adsorción disponibles (básicamente se refiere a los sitios activos del anticuerpo y no a la débil adsorción no específica). Las moléculas que no encuentran un sitio libre continúan avanzando a lo largo del lecho empacado, generándose así un frente de migración del soluto el cual se dispersa o ensancha a medida que avanza (ver figura IX.21).

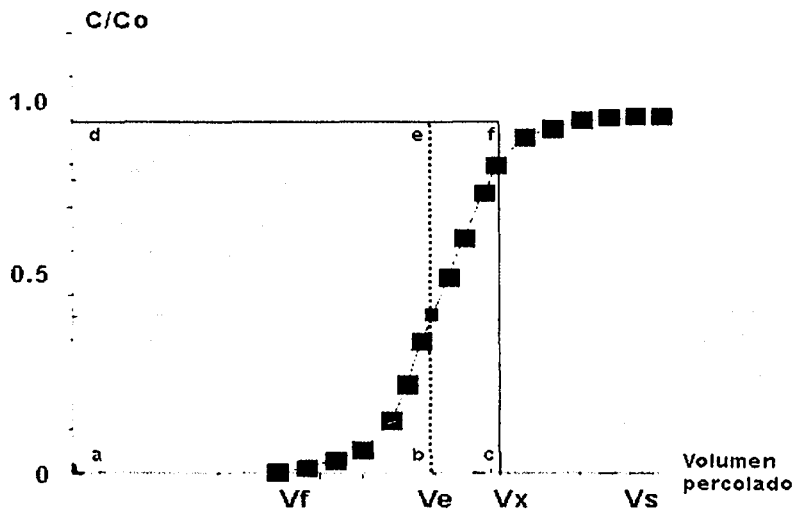


Figura IX.21. Frente de migración de un soluto en un cartucho de inmunoadinidad. C: concentración del soluto en el efluente, C_o : concentración de soluto en la muestra (o influente). V_f : volumen de fuga, V_e : volumen del frente estequiométrico (línea punteada b-e). V_s : volumen de saturación.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

A diferencia de lo que sucede con otros adsorbentes, en donde el equilibrio de distribución del soluto entre las fases móvil y estacionaria determina la velocidad de migración del frente, en el caso de los IAs esta velocidad depende fundamentalmente de la cantidad (o concentración) de sitios de adsorción. Cuando el frente emerge del cartucho tiene (idealmente) una forma sigmoideal caracterizada por tres puntos importantes, cada uno de los cuales se asocia con cierto volumen de muestra percolada, el punto de fuga, el punto estequiométrico o punto de inflexión y el punto de saturación. El punto de fuga corresponde al volumen de muestra a partir del cual el soluto comienza a emerger del cartucho, aunque todavía queden sitios libres. Debido a fenómenos de difusión y fenómenos estadísticos, a medida que los sitios de adsorción se van ocupando, las moléculas de soluto que recién entran al cartucho tendrán menor probabilidad de encontrar un sitio libre durante su recorrido; algunas de ellas no alcanzarán a ser retenidas y emergerán del cartucho, determinando de esta manera lo que se conoce como volumen de fuga (V_f). El punto estequiométrico es aquel por el cual, si se hiciera pasar un plano vertical, el frente quedaría dividido en dos secciones simétricas. El plano vertical corresponde de hecho al frente ideal (llamado frente estequiométrico) que se obtendría si no se produjera ninguna dispersión de las moléculas de soluto (no retenido) al recorrer el lecho. El volumen que corresponde al punto estequiométrico (V_e) es un indicador del número de sitios activos de adsorción que existen en el IA empacado (producto $V_e \cdot Co$). Finalmente el punto de saturación corresponde a un volumen de muestra (V_s) después del cual ya no se retiene soluto en el IA porque todos los sitios activos disponibles y accesibles están ocupados; por lo tanto, a partir de este punto, la concentración de soluto en el efluente es idéntica a la del influente.

Para un punto cualquiera de volumen V_x se define un área (el cuadrado "acdf" en la figura IX.21) que es proporcional a la cantidad de soluto cargada ($V_x \cdot Co$). La parte del área que queda sobre la curva del frente representa la cantidad de soluto retenido y la que queda debajo de la curva indica la cantidad de soluto no retenido.

Los volúmenes característicos del frente dependen de las condiciones experimentales usadas durante la carga. Es evidente que si se aumenta la concentración del soluto en la muestra, el frente de migración emergerá del cartucho a volúmenes menores (V_f , V_e y V_s disminuyen) por que los sitios de adsorción se saturan más

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

rápido. La dispersión del frente definida por la diferencia entre V_s y V_f , es debida a factores cinéticos (difusión multicanales y resistencia a la transferencia de masa en la fase móvil y en el volumen poroso) y depende por tanto del coeficiente de difusión del soluto en el fluido, del diámetro de partícula del empaque, de la homogeneidad del empaque y del empacado, así como de la velocidad de flujo del líquido.

En la figura IX.22. se muestra el efecto que produce un cambio en la velocidad de flujo sobre el perfil del frente. La curva obtenida para un cierto flujo (caracterizada por V_{f2} , V_e , V_{s2} ; en la misma figura) sería más vertical para un flujo más lento (V_{f3} , V_e , V_{s3}) y más extendida para un flujo más rápido (V_{f1} , V_e , V_{s1}). Sin embargo, el volumen correspondiente al frente estequiométrico (V_e) no cambia puesto que el número de sitios de adsorción en el IA es, obviamente, independiente del flujo. Como puede apreciarse, la eficiencia de llenado de los sitios de adsorción es mayor entre menor es el flujo pues en este caso el volumen de fuga y el volumen de saturación se acercan al volumen estequiométrico. Es decir, el analito dispone de más tiempo para alcanzar un sitio libre durante su recorrido entre menor es el flujo.

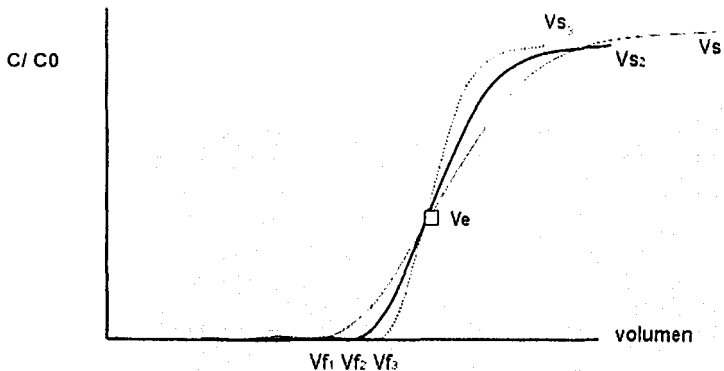


Figura IX.22. Curva teórica del efecto del flujo sobre el perfil de concentraciones del frente de migración de un hapteno.

Aunque en el trabajo realizado no se obtuvieron los frentes de migración de los analitos durante la carga, algunos de los resultados obtenidos pueden discutirse en función de lo antes expuesto sobre el análisis frontal.

En los experimentos realizados para determinar la capacidad de los cartuchos de inmunoeextracción (figuras VIII.8, VIII.14 y VIII.22 páginas de resultados 96, 108 y 122), se cargaron muestras con concentraciones progresivamente mayores de analito manteniendo el volumen y flujo constantes. Llamando V_x al volumen cargado y con referencia a la figura IX.21 se puede decir:

- En los experimentos a menor concentración, el volumen de fuga del analito fue mayor a V_x y todo el compuesto quedo adsorbido (% recobro ≈ 100).
- Al aumentar la concentración, una parte progresivamente mayor del frente emergió a volúmenes menores a V_x y por lo tanto el área bajo la curva (fracción de analito no retenido) fue aumentando (% de recobro < 100).
- En las más altas concentraciones, V_s fue menor a V_x y el área sobre la curva correspondió a una fracción cada vez más pequeña del área total (% de recobro $\rightarrow 0$).

En lo que concierne a los experimentos realizados a diferentes flujos (figuras VIII.5, VIII.12 y VIII.20 páginas de resultados 83, 107 y 121), se cargó un volumen constante de una muestra con analito en exceso respecto a la capacidad del cartucho (10 mL y 120 ng para anti-2,4-D y 25 ml y 100 ng para anti-malati6n y anti-atrazina). Por lo tanto, en todos los casos se tuvo $V_e < V_x$.

Refiriéndose a las figuras IX.2 y IX.22 se puede ver que si $V_x > V_s$, aunque el frente se ensanche al aumentar el flujo, el área sobre la curva (proporcional a la cantidad de soluto retenido) permanece constante porque el frente es simétrico con respecto al punto estequiométrico y éste no cambia de posición en estos ensayos. Sin embargo, después de un cierto valor de flujo, el ensanchamiento del frente es tal que $V_s > V_x$. En estas condiciones el área sobre la curva hasta el punto V_x es menor que el área sobre la curva total; es decir que, para el volumen de muestra cargado, no se han aprovechado todos los sitios de adsorción disponibles y aparentemente, la capacidad del cartucho disminuye. En el caso del

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

anti-2,4-D se observó una pérdida de capacidad para flujos mayores a 1ml/min, con el anti-malati6n y el anti-atrazina esto ocurri6 a flujos mayores a 4ml/min y 5 ml/min, respectivamente. Es f6cil deducir que para el anti-2,4-D el flujo limite fue considerablemente menor porque el volumen de muestra cargada (V_x) fue m6s peque1o. Por otra parte, el estudio del flujo para el cartucho anti-2,4-D se hizo con un hidrogel triturado y empacado, mientras que para los cartuchos con anti-malati6n y anti-atrazina se utiliz6 un xerogel cuidadosamente molido en mortero. En consecuencia, el empaque y el empacado del primero fueron menos eficientes que los de los dos 6ltimos, lo que se traduce en frentes de migraci6n que, para un mismo flujo, son m6s dispersos en el cartucho de anti-2,4-D. Este efecto tambi6n contribuy6 a reducir el valor de flujo limite para este IA. Finalmente, la diferencia de comportamiento entre el anti-malati6n y el anti-atrazina, con respecto al flujo, puede deberse a diferencias en la cin6tica de la reacci6n de acoplamiento hapteno-anticuerpo. Entre m6s lenta es la reacci6n m6s disperso es el frente de migraci6n y m6s r6pido se alcanza el flujo limite para un volumen igual de muestra cargada. Los resultados obtenidos indican que el malati6n requiere m6s tiempo para interactuar con su anticuerpo que la atrazina, aunque la constante de afinidad sea mayor para el primero (tabla IX.1).

El estudio del efecto del volumen de carga fue realizado en condiciones de exceso de analito, a flujo no mayor al flujo limite y aumentando progresivamente el volumen de muestra (a partir de 10 mL para el anti-2,4-D y a partir de 25 mL para el anti-malati6n y anti-atrazina). De acuerdo con lo discutido en el p6rrafo anterior, en las condiciones iniciales se tiene $V_e < V_x$ y $V_s < V_x$ por lo que el 6rea sobre la curva del frente corresponde a la ocupaci6n de todos los sitios activos disponibles. Al aumentar V_x (a cantidad de analito constante) la muestra se diluye pero el frente no cambia de posici6n porque no es un frente debido al equilibrio de distribuci6n sino a un fen6meno de saturaci6n. Por lo tanto, aunque el frente se ensancha al disminuir la concentraci6n (la velocidad del acoplamiento antígeno-anticuerpo disminuye), siempre se cumple que $V_s < V_x$. Es l6gico entonces que la capacidad de los cartuchos no se altere al aumentar el volumen de carga.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

9.4.3 Lavado del cartucho de inmunoextracción tras la carga de muestra.

El lavado tiene como función eliminar compuestos residuales (incluido también el hapteno) que hayan quedado adsorbidos no específicamente en la superficie de la matriz sólida o en alguna parte de la molécula del anticuerpo que no sea el sitio activo. Una apropiada solución de lavado debe eluir los compuestos retenidos por interacciones débiles (Van der Waals e hidrofóbicas) sin provocar la disociación del complejo formado por el hapteno con el sitio activo del anticuerpo. El efecto de un buen lavado se ilustra en la figura IX.23.

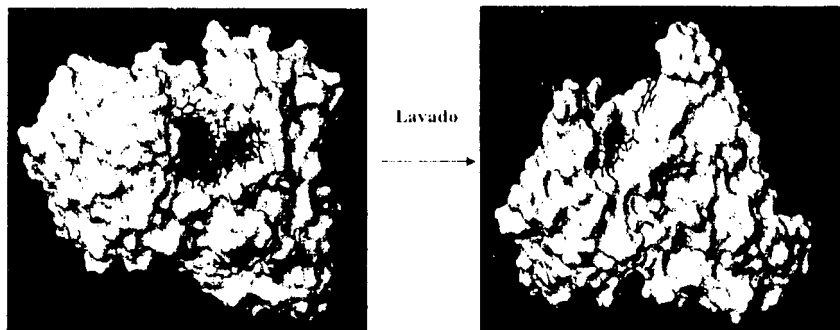


Figura IX.23. Efecto del lavado del IA en la eliminación de interacción no específica con el anticuerpo.²⁸

Otra función del lavado es eliminar los iones inorgánicos (fosfatos, cloruros, iones sodio y potasio) que quedan en el volumen intersticial del cartucho después de la carga por el PBS que ésta contiene. Estos iones se encuentran a alta concentración en el volumen poroso y el volumen interparticular por lo que las sales de fosfato, particularmente, pueden precipitar durante la elución debido al elevado contenido de disolvente orgánico en el eluyente. La formación de precipitados en el sistema provoca una serie de problemas:

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

- Los poros del IA pueden quedar ocluidos impidiendo la difusión de especies desde el exterior hacia el interior de la partícula o viceversa.
- Los filtros que retienen el empaque en el cartucho se pueden tapar parcialmente provocando pérdida de permeabilidad.
- Las partículas finas de precipitado que logran atravesar los filtros del cartucho quedan en el eluato, el cual es posteriormente inyectado al cromatógrafo. En el mejor de los casos estas finas partículas atraviesan la columna provocando perturbaciones en el cromatograma, pero también pueden acumularse en el empaque u ocluir los filtros.

Los ensayos realizados a lo largo de este trabajo mostraron que, en la mayoría de los casos, un lavado con agua pura es suficiente, puesto que el modificador orgánico adicionado a la solución de carga y su volumen minimizan la retención no específica en esa etapa. En realidad, el mayor problema lo constituye el PBS remanente después de la carga. Para eliminarlo lo mejor es lavar el cartucho a baja velocidad de flujo (p.ej. 0.5 mL/min) y con un volumen más o menos importante de agua. El inconveniente fue que al cambiar la fuerza iónica del medio que rodea al anticuerpo, se desestabilizó el complejo formado y parte del analito previamente retenido se perdió en el lavado. Por ello se tuvo que limitar el volumen de lavado a 2 mL de agua.

En esas condiciones, la inyección del eluato obtenido posteriormente produjo un gran pic al inicio del cromatograma debido a la perturbación provocada por los fosfatos. Una vía alternativa que se ensayó en algunos experimentos con buenos resultados fue realizar el lavado con 5 mL de solución isotónica de NaCl a flujo de 0.5 mL/min. La solución isotónica no altera significativamente la estabilidad del complejo hapteno-anticuerpo porque se mantiene un medio de fuerza iónica elevada. Por otra parte, la presencia de cloruros en el eluato provoca menos perturbación en el cromatograma que los fosfatos, probablemente porque los primeros son más solubles en las fases ricas en disolvente orgánico.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

9.4.4. Determinación de la composición y flujo del eluyente.

Para desestabilizar al complejo hapteno-anticuerpo y recuperar cuantitativamente al analito en un pequeño volumen de eluato es necesario alterar drásticamente el medio que rodea a la biomolécula para inducir un cambio temporal en su conformación. Una opción es utilizar disolventes orgánicos como MEOH o ACN en el eluyente, la otra opción es modificar el pH. Esta última opción se descartó porque el malatión y el 2,4-D éster se hidrolizan en medios ácidos ó básicos, el soporte de sílice es atacado en medios básicos y, además, algunos trabajos han reportado que en medio ácido el complejo no se desestabiliza suficientemente⁹⁹ por lo que la recuperación del analito no es cuantitativa.

9.4.4.1. IA con anti-2,4-D y anti-malatión

Para tener un buen criterio de elección se analizaron los perfiles de elución de los pesticidas empleando diversas mezclas acuosas con MeOH y ACN (figuras IX.24, IX.25 y IX.26). Estos perfiles se obtuvieron cargando previamente los cartuchos de inmunoextracción a saturación con el analito y, después del lavado, eluyendo con pequeñas porciones sucesivas de la mezcla disolvente orgánico-agua. Cada fracción del eluyente fue recolectada y analizada para determinar la concentración del pesticida durante el progreso de la elución.

En el caso del cartucho con anti-2,4-D, la mezcla disolvente orgánico-agua provocó la inmediata liberación de algunas moléculas de analito que comenzaron a eluir del cartucho justo después del volumen muerto generando un frente ascendente de desorción (el cual no es posible detectar experimentalmente ya que emerge en la primera centena de microlitros). El frente descendente que se observa en las figuras IX.24 y IX.25 indica que todo el analito ha sido desorbido y eluido. Evidentemente, el volumen de fin de desorción (volumen acumulado hasta la última fracción de eluyente en la que se alcanzó a detectar analito) depende de la fuerza de la fase móvil; entre más grande es ésta, mayor es la concentración de analito en las primeras fracciones y menor el volumen requerido para su elución total.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

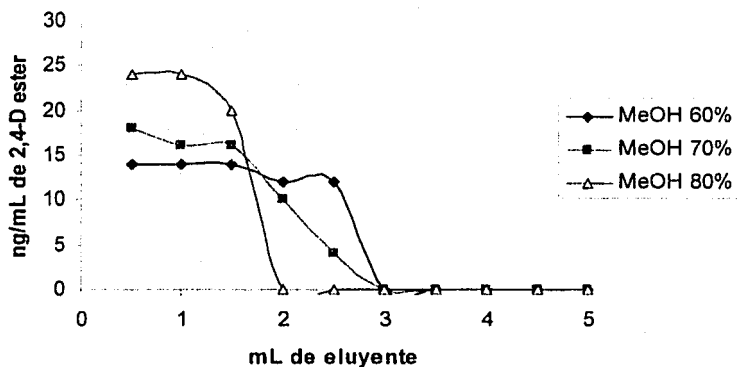


Figura IX.24. Perfiles de elución del 2,4-D éster en el IA dopado con 300 µg de anti-2,4-D empleando mezclas acuosas con MeOH.

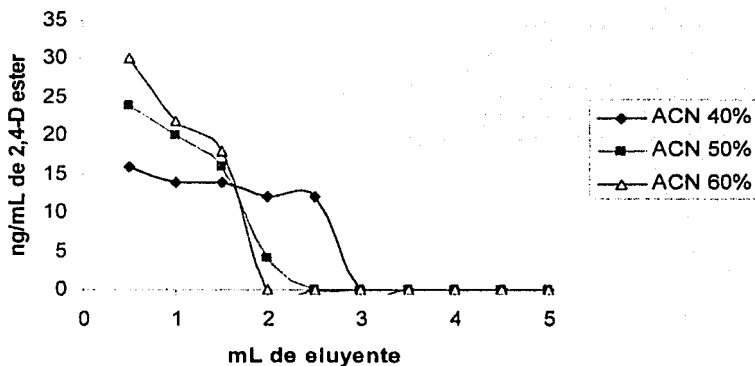


Figura IX.25. Perfiles de elución del 2,4-D éster en el IA dopado con 300 µg de anti-2,4-D empleando mezclas acuosas con ACN.

Para un adsorbente con sitios de adsorción homogéneos, la región comprendida entre los frentes ascendente y descendente es una meseta que indica la concentración de analito en la fase móvil en cuestión que está en equilibrio con el adsorbente saturado.

Los perfiles de elución del 2,4-D éster muestran, aproximadamente, este comportamiento por lo que se podría establecer que los sitios de adsorción del IA son de energía más o menos equivalente. Esto es bastante lógico dada la simplicidad de la molécula de este hapteno.

Para los fines de la EFS, el disolvente de elución más adecuado es aquél que permite recuperar todo el analito en el menor volumen posible. De acuerdo con las figuras anteriores, es posible recuperar el 2,4-D éster en sólo 2 mL de eluyente utilizando mezclas de agua con 60% de ACN u 80% de MeOH. Se prefirió la primera por tener menor contenido de disolvente orgánico, lo cual es probablemente más adecuado para preservación de la actividad del anticuerpo. Por otra parte, se fijó una velocidad de flujo más o menos lenta (0.5 mL/min) en la elución por las siguientes razones:

1. Para liberar al analito, el anticuerpo debe cambiar su conformación lo cual requiere de cierto tiempo.
2. Dado que la permeabilidad de los cartuchos disminuye cuando el empaque está embebido en mezclas ricas en disolvente orgánico, resulta difícil, y es poco conveniente para la estabilidad de la matriz sólida y del anticuerpo, percolar soluciones a altos flujos.
3. La recolección del eluato se controla mejor trabajando a flujo más lento.

En el caso del IA para malatión sólo se ensayaron mezclas ACN:H₂O. Los perfiles de elución de la figura IX.26 muestran un comportamiento peculiar ya que para las mezclas con 50, 55 y 60% de ACN se observa claramente un doble frente de desorción, que podría ser indicativo de dos tipos de sitios de adsorción con diferentes energías de enlace. La estructura de la molécula de malatión con una sección de dimetoxitiofosfato y otra sección

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

diéster etílico unidas por un puente de azufre se presta bien para generar anticuerpos que reconocen una u otra parte del hapteno.

El volumen de fin de desorción del malatión para la mezcla con 60% de ACN fue de 2 mL, por lo que esta condición se estableció como la más adecuada para la elución tomando como criterios un volumen pequeño de eluyente para altos factores de preconcentración y un contenido no demasiado alto de disolvente orgánico para mayor estabilidad del anticuerpo. Por las razones antes indicadas, el flujo de elución se fijó en 0.5 mL/min.

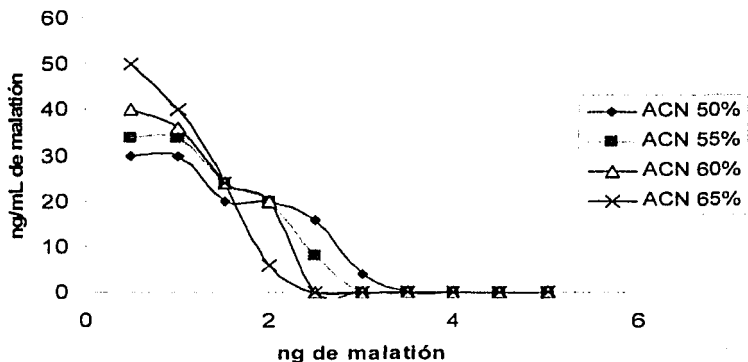


Figura IX.26. Perfiles de elución de malatión en el IA dopado con 500 µg de anti-malatión empleando mezclas acuosas con ACN.

9.4.4.2. IA con anti-atrazina.

Para la determinación de la composición del eluyente se ensayaron diversas mezclas ACN:H₂O (60:40 a 70:30), buffer de glicina y buffer de formiato. Estos dos últimos no dieron resultados satisfactorios porque la atrazina no logró desorberse completamente ni aún con 10 ml del respectivo buffer. Al ensayar eluyentes con modificador orgánico se logró recuperar cuantitativamente la atrazina en volúmenes menores, pero todavía demasiado

grandes para lo que se deseaba. Para entender mejor el comportamiento de este IA se trazaron los perfiles de elución con las mezclas ACN:H₂O (figura IX.27); como se observa, estos perfiles de elución son muy diferentes a los obtenidos con los anteriores pesticidas. A pesar de que el cartucho fue previamente saturado con atrazina, al realizar la elución el frente ascendente no emergió del cartucho después del volumen muerto, como era de esperarse sino que se recorrió hacia volúmenes mayores. Además, los frentes ascendente y descendente se juntaron, eliminando la zona de meseta y generando una curva gaussiana similar a un pico cromatográfico de elución. De hecho, la anchura y altura de la curva, así como el volumen correspondiente al vértice variaron con la fuerza del eluyente de la misma forma como lo haría un pico de elución. Curiosamente, en los tres ensayos el frente ascendente comenzó a emerger del cartucho en un volumen semejante; es decir, en la primera fracción de eluato (1 mL) analizada no se detectó atrazina en ninguno de los casos, mientras que en la segunda fracción apareció ya una concentración significativa de analito en las tres mezclas.

Se piensa que el comportamiento observado pudo ser ocasionado por algún efecto cinético. Por ejemplo, una disociación lenta del complejo hapteno-anticuerpo debida a que éste último requiere estar en contacto con el disolvente orgánico un mayor tiempo para que se modifique su configuración. Sin embargo, con los experimentos realizados no es posible llegar a conclusiones definitivas sobre estos fenómenos.

De acuerdo con los resultados, el fin de desorción se alcanza con 4 mL de eluyente para las mezclas de 65 o 70% de ACN (ésta fue la última fracción en la que se alcanzó a detectar analito). Por otra parte, puesto que durante el primer ml no hay elución del compuesto de interés, éste puede descartarse para restringir la dilución. Finalmente, las condiciones establecidas para la elución de la atrazina fueron: flujo de 0.5 mL/min, eluyente 4 mL de ACN:H₂O 65:35 (v/v), descartando el primer mL y colectando los siguientes 3 mL para el análisis.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

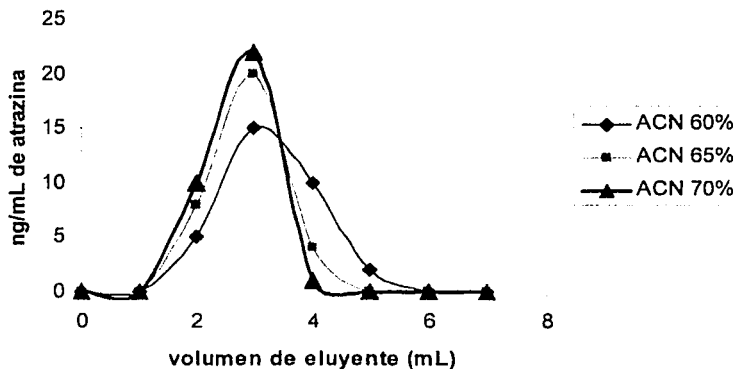


Figura IX.27. Perfiles de elución de atrazina en el IA dopado con 300 μg de anti-atrazina empleando mezclas acuosas con ACN.

9.4.5. Reacondicionamiento y tiempo de reposo de los IAs.

Después de la elución, los cartuchos se lavan con un poco más de la mezcla correspondiente ACN:H₂O, seguida por 2-3 mL de agua para desalojar el disolvente orgánico y finalmente un buen volumen (≥ 15 mL) de PBS para restituir el ambiente favorable a la biomolécula. El IA se deja en el buffer por un cierto tiempo, al que se ha denominado "tiempo de recuperación", antes de ser usado en un nuevo ciclo de adsorción-desorción.

A nivel molecular lo que ocurre con el anticuerpo en el tiempo de reposo es el reestablecimiento de los enlaces por puentes hidrogeno para restituir la configuración plegada (activa) de esta biomolécula. Los cambios conformacionales en el espacio, restringido del poro donde se encuentra encapsulado el anticuerpo no son inmediatos y requieren por lo tanto de algún tiempo para completarse. Por otra parte los puentes disulfuro y otras interacciones no covalentes intramoleculares no son afectadas durante el

proceso de EFS, lo que confiere una alta estabilidad a la inmunoglobulina. Por ello, los anticuerpos inmovilizados son capaces de resistir la acción de las variaciones abruptas de pH e incluso altas concentraciones de modificadores orgánicos. Si el IA fuera usado continuamente sin reposo, llegaría un momento en el cual no respondería ante la presencia del hapteno. El tiempo establecido de 30 minutos de reposo en PBS entre cada análisis independiente es el mínimo necesario para asegurar su perfecto funcionamiento. Cuando el IA no es utilizado es conveniente guardarlo en refrigeración, teniendo cuidado de que no se congele, por que de hacerlo se afectaría la estabilidad del anticuerpo ya que sus enlaces internos pueden romperse en la etapa de descongelación.

9.4.6. Reactividad cruzada de los IAs

9.4.6.1. IA con anti-2,4-D.

La reactividad cruzada sólo se detectó para los derivados éster del grupo de ácidos clorofenoxi probados debido a que únicamente éstos son moléculas neutras en medio PBS y, aparentemente, este requisito fue indispensable para que el anticuerpo presentara algún tipo de reconocimiento. La parte de la molécula que parece reconocer el anticuerpo es la que corresponde al anillo aromático con las posiciones 2 y 4 ocupadas por átomos de cloro. Por otro lado la alta hidrofobicidad del 2,4,5-T éster y el 2,4-DB éster hizo necesaria la adición de un porcentaje relativamente elevado de AcCN a la solución de carga (para minimizar interacciones no específicas), por lo cual su interacción con el anticuerpo no se estudió en condiciones óptimas. La cantidad retenida del 2,4-DB éster y 2,4,5-T éster es de 35 y 20 ng respectivamente, en un IA dopado con 500 µg de anticuerpo. La menor retención del segundo resulta lógica ya que éste último presenta un tercer átomo de cloro en el anillo aromático y, por tanto, tendrá menos reconocimiento que el 2,4-DB éster que es más parecido al hapteno. Desafortunadamente el IA dopado con anti-2,4-D no tiene una aplicación práctica por la inestabilidad de los derivados esterificados en solución acuosa y en el medio ambiente.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Es importante señalar que no todos los contaminantes son potencialmente adecuados para ser analizados por inmunoeextracción. La complejidad del compuesto y la posibilidad que ofrezca para acoplarlo a la proteína acarreadora dejando bien expuestos sus principales grupos funcionales (especialmente grupos polares y anillos aromáticos), son aspectos importantes para que el inmunógeno induzca la producción de anticuerpos con alta afinidad por el contaminante. Por ejemplo, en la figura IX.28 se muestran datos de constantes de afinidad de anticuerpos generados por haptenos de diferente complejidad. El valor (mínimo) evaluado para la constante de afinidad del anti-2,4-D por el 2,4-D éster de $5.54 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ es comprable al reportado para la dinitroanilina de $8 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$, posiblemente por la semejanza en la estructura de ambas moléculas.

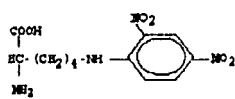
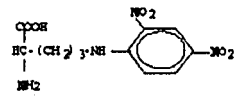
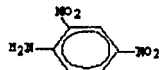
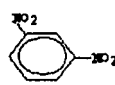
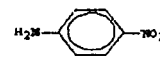
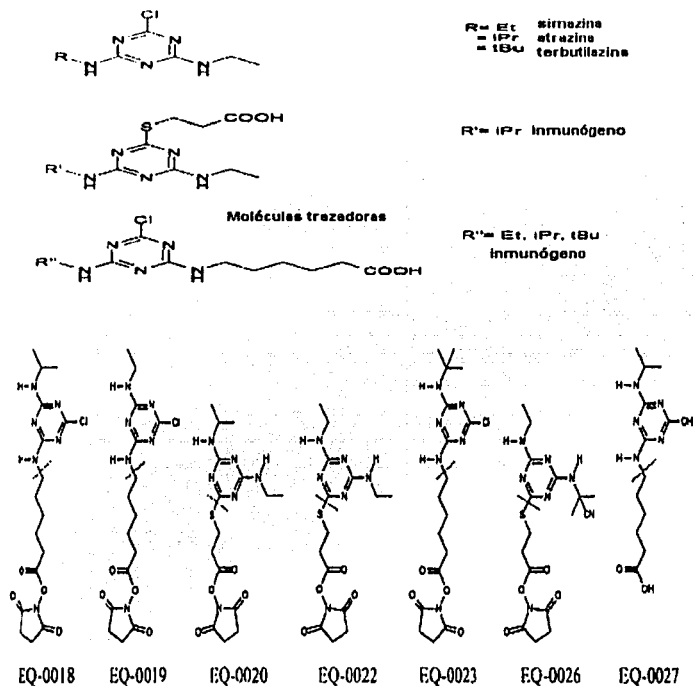
LIGANDO	Constante de afinidad K ($\times 10^5 \text{ M}^{-1}$)
	200
	80
	20
	8
	0.5

Figura IX.28. Relación de la constante de afinidad con la complejidad del hapteno.²⁸

9.4.6.2 IA con anti-atrazina

Numerosos diseños de haptenos de triazinas han sido reportados ^{32, 33, 36} para la inmunización de animales de laboratorio, los más comunes se presentan en la figura IX.29. Considerando las diversas alternativas que existen, es posible elucidar el por qué los anticuerpos anti-atrazina empleados en la encapsulación presentaron importante reactividad cruzada para simazina y propazina y una muy pobre, e indetectable bajo nuestras condiciones de análisis, para prometón y prometrina.



Haptenos derivatizados (trezadores) para acoplarse a una proteína acarreadora y convertirse en inmunógenos.

Figura IX.29. Desarrollo de inmunógenos para triazinas.³⁶

Las estructuras de las triazinas empleadas en la evaluación del IA son la simazina y propazina (figura VI.13) las cuales difieren solo en los grupos alquilo de la posición 4 y 6, respectivamente, en comparación con la atrazina. El prometón y la prometrina difieren en el grupo funcional en la posición 2. Teniendo en cuenta lo anterior, el posible inmunógeno al parecer se sintetizó mediante un enlace covalente en la posición alquilamino 4 o 6, porque si se hubiese sintetizado en la posición 2 los grupos metiltilio o metoxi de la prometrina y el prometón, respectivamente, no interferirían en la respuesta del anticuerpo hacia estos análogos estructurales a la atrazina. Es posible que una pequeña cantidad de estas triazinas hubiese podido complejarse con el anticuerpo, pero el método analítico no alcanzó a detectarlas. Sin embargo, se tienen reportes ³² de reactividad cruzada cercana al 10% para prometón con anticuerpos monoclonales anti-atrazina, por lo que la reactividad cruzada de los anticuerpos policlonales podría ser un poco mayor.

9.4.7. Estabilidad de los IAs

La comparación de los resultados de estabilidad para los tres diferentes IAs desarrollados se presenta en la figura IX.30. Se observa claramente que por al menos 14 a 15 semanas se conservaron en buena medida las propiedades de retención iniciales. La disminución de capacidad al cabo de este periodo osciló entre 14-25%, lo cual resulta excelente para un biomaterial. Estos cartuchos se mantuvieron en refrigeración entre ensayos subsecuentes y sólo fueron empleados para el estudio de estabilidad. Es interesante hacer notar que, a pesar de las diferentes características de cada tipo de anticuerpo (evidenciadas particularmente en el estudio de elución), el comportamiento observado respecto a la estabilidad es bastante semejante. Por ello, se deduce que esta propiedad está relacionada más bien con el encapsulamiento y no con el anticuerpo. Las biomoléculas, cualesquiera que éstas sean, parecen estar bien protegidas dentro de los poros de la matriz de gel. La presencia de agentes nocivos, que provocan su desnaturalización irreversible en solución, no causa ninguna transformación o daño permanente cuando están encapsuladas.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

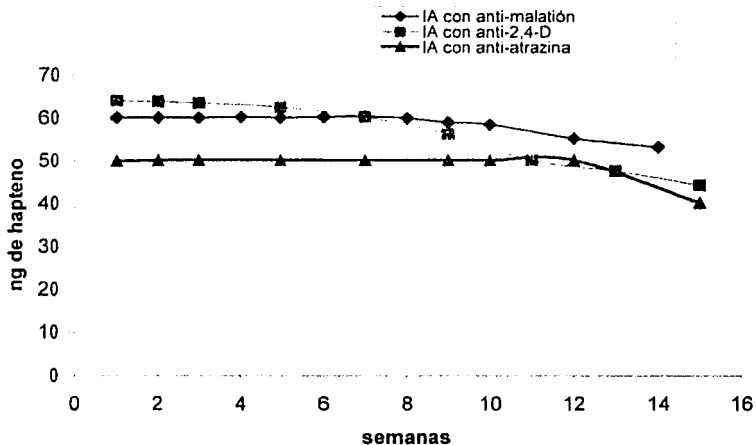


Figura IX.30. Estabilidad de los IAs dopados con 500 µg de anticuerpo.

9.4.8. Comparación de los IAs obtenidos por enlace covalente y por el método de sol-gel propuesto

Las principales ventajas del método desarrollado para obtener IA por vía sol-gel, comparado con los métodos basados en la inmovilización del anticuerpo por enlace covalente, son: su simplicidad, bajo costo, efectividad y repetibilidad.

El método químico es muy delicado, con rendimientos bajos y variables, por lo que generalmente se emplea un fuerte exceso de la materia prima más cara, el anticuerpo. La reproducibilidad de lote a lote deja mucho que desear, aún utilizando el mismo lote de IgG. Por estas razones, muy pocos IA para la EFS de contaminantes han podido salir al mercado y son muy escasos los proveedores que ofrecen estos productos. Cabe mencionar que la inmovilización de biomoléculas en soportes sólidos por enlace covalente es un proceso que se ha estudiado y reportado desde la década de 1960.¹⁰⁰ La llamada cromatografía de bioafinidad, empleada para la purificación de proteínas, ácidos nucleicos etc., está basado.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

en el uso de materiales con enzimas, anticuerpos o antígenos químicamente enlazados. Aunque se han realizado muchos progresos en este campo, aún persisten problemas en la reacción de acoplamiento por lo que se siguen buscando nuevas alternativas.

En el método sol-gel propuesto, toda la IgG añadida es encapsulada y, aunque hay pérdida de actividad durante el proceso, se estima que la recuperación es superior al 40% para los geles con anti-2,4-D y anti-atrazina (comparación de las tablas VIII.1, VIII.6 y VIII.18) y del orden del 25% para el anti-malatón (comparación de las tablas VIII.1 y VIII.9). El aspecto más interesante del método es sin duda la repetibilidad en las características (retención) del biomaterial preparado en ensayos independientes. Para una misma cantidad y un mismo lote de IgG encapsuladas, las diferencias de capacidad de los IAs obtenidos fueron inferiores al 5%. Esta excelente repetibilidad coloca al método sol-gel como una de las vías más promisorias para el futuro de los IAs. Sin embargo, en este trabajo sólo se prepararon IAs con pequeñas cantidades de anticuerpo encapsulado (≤ 1 mg). En la literatura se reportan cantidades mucho mayores (≥ 10 mg) de anticuerpo inmovilizado por enlace químico en un gramo de sílica. Por ello, las capacidades de estos IAs son considerablemente mayores. Para que el método sol-gel sea competitivo en este aspecto requiere que, en futuros trabajos, los investigadores se enfoquen hacia la preparación de geles con alta densidad de anticuerpo y el estudio de su comportamiento.

9.4.9. Comparación con otros métodos analíticos basados en inmunoeextracción

Algunos métodos analíticos que se han implementado para el análisis de triazinas y 2,4-D en muestras acuosas están basados en EFS con IAs preparados por enlace covalente del anticuerpo. En general, estos IAs se han sintetizado utilizando cantidades relativamente grandes de anticuerpos policlonales, por lo que la densidad de biomolécula en el material llega a alcanzar valores de 25 mg/g de soporte.

I. Ferrer et al²⁵ utilizaron cartuchos empacados con 80 mg de IA. con una densidad de anticuerpo similar a la antes mencionada, para la determinación de triazinas en agua superficial. Los recobros obtenidos para simazina, atrazina y propazina en el análisis de 20

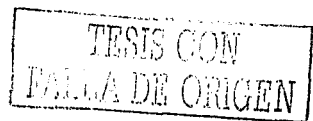
TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

ml de muestra dopada a 0.2 ppb de cada compuesto fueron superiores al 90%. Estos investigadores utilizaron como sistema de análisis la cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas (con ionización química a presión atmosférica) y reportan haber alcanzado límites de detección del orden de la parte por trillón (1 ppt= 0.001ng/mL). La altísima sensibilidad alcanzada, a pesar del moderado volumen de muestra procesado, es atribuida a la gran especificidad del método de preparación de muestra combinada con la gran sensibilidad del método de detección.

Houben et al ¹⁴ desarrollaron IAs para 2,4-D y atrazina enlazando químicamente los correspondientes anticuerpos a un soporte de sílica. Aunque no se indica la cantidad de anticuerpo empleado para la preparación del biomaterial se intuye que ésta debió ser considerable dadas las altas capacidades que determinaron para sus cartuchos empacados con 1 g de IA. Por ejemplo, reportan capacidades de hasta 600 ng en los cartuchos con IA para atrazina y 1200 ng en los empacados IA para 2,4-D. Con respecto a estos últimos se menciona que varios compuestos de la familia de los herbicidas clorofenoxi fueron más retenidos que el propio 2,4-D (analito-hapteno); aunque no se especifica cuáles fueron éstos, podría tratarse de los derivados esterificados, como en nuestro caso. Por otra parte, Houben observó que los cartuchos requerían de un tiempo de reposo entre análisis sucesivos para poder retener adecuadamente al analito. Esto concuerda con lo observado en el presente trabajo para los IAs sol-gel. Finalmente, cabe mencionar que en la investigación referida no se realizó un estudio a fondo sobre el problema de retención no específica y además en varios casos se obtuvieron recobros significativamente superiores al 100%. Razón por la cual algunos datos resultan cuestionables.

Por otra parte, es importante hacer notar que hasta ahora no se ha encontrado ninguna publicación en donde se reporte el desarrollo o aplicación de un IA para malatión.

Aunque los trabajos antes comentados presentan resultados muy superiores en algunos aspectos a los obtenidos en el presente trabajo, es necesario tomar en cuenta varios factores. El primero de ellos es la materia prima utilizada para la preparación de los IAs. Como ya se ha indicado, en el presente estudio se emplearon anticuerpos policlonales



adquiridos comercialmente y se utilizaron cantidades inferiores al mg para preparar cada IA. En los trabajos mencionados se usaron anticuerpos desarrollados y purificados en laboratorios de investigación y la cantidad empleada fue de varios mg. Por lo tanto, la calidad y cantidad de la materia prima más importante no fue la misma y consecuentemente la capacidad de los cartuchos respectivos no puede compararse directamente. Una medida de comparación más apropiada sería la capacidad relativa, o sea la cantidad de analito retenido por peso de anticuerpo inmovilizado; sin embargo, este dato generalmente no es reportado en las publicaciones sobre el tema. Por otra parte, en lo que se refiere a la sensibilidad de los métodos analíticos, ésta depende no sólo del método de preparación de muestra sino también de la instrumentación analítica. Es evidente que la sensibilidad de un detector UV común (como el utilizado en este trabajo) no es comparable con la de un detector de masas (utilizado en el trabajo de Ferrer et al.).²⁵

En conclusión, se considera que los métodos analíticos desarrollados en este trabajo, utilizando IAS menos costosos para la EFS de la muestra e instrumentación analítica común, poseen la capacidad y calidad necesarias para ser empleados en análisis ambientales. En efecto, los alcances de estos métodos son compatibles con las normas norteamericanas de calidad del agua y pueden fácilmente reajustarse (aumentando el volumen de muestra procesada) para cumplir con las estrictas normas europeas.

9.5. CARACTERIZACION DE LOS IAs.

9.5.1. Microscopia óptica y electrónica.

La forma y textura del material obtenido por sol-gel depende del tratamiento al que se someta el sistema coloidal formado una vez que las reacciones de hidrólisis y condensación han avanzado suficientemente (figura IX.31). Para obtener partículas esféricas regulares una de las vías consiste en emulsificar el sol con una fase orgánica adecuada bajo condiciones perfectamente controladas de temperatura, pH y concentración de electrolito. Este tratamiento conduce a la solidificación de las micropartículas que se separan en granos esféricos, los cuales son posteriormente deshidratados para dar partículas esféricas porosas con un área superficial y una porosidad muy reproducible. El

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

sol puede ser también utilizado para formar un recubrimiento sobre un soporte sólido. La partícula irregular del xerogel que se forma en la superficie del soporte después de la inmersión de éste en el sol y secado a temperatura ambiente, puede consolidarse y densificarse por calentamiento para obtener una película más homogénea. Finalmente la vía de gelificación consiste, como ya se ha mencionado en secciones anteriores, en dejar crecer las partículas coloidales por agregación hasta que se produce la transición sol-gel. El hidrogel formado puede ser utilizado como tal, ya sea en forma de monolito o fragmentado en pequeños trozos. Alternativamente, puede ser sometido a un secado controlado para obtener un xerogel más rígido, denso y uniforme, el cual si es calentado a alta temperatura forma una cerámica o vidrio denso y transparente. Otra vía que ha sido explorada para obtener materiales rígidos pero de gran porosidad (aerogeles) consiste en intercambiar el líquido de los poros del hidrogel por CO₂ supercrítico, de esta manera el material es secado sin que se produzca encogimiento o colapso de los poros.

De las diferentes formas de manufactura mencionadas, solo los xerogeles, a diferentes grados de secado, los hidrogeles y las películas de hidrogel se han utilizado en el caso de los biomateriales. El tratamiento a alta temperatura, la emulsificación con solventes y el secado supercrítico son procesos incompatibles (por el momento) con la persistencia de actividad de las biomoléculas.

En este trabajo, los xerogeles sintetizados fueron fragmentados y molidos manualmente en un mortero. A las partículas irregulares obtenidas se les retiraron los polvos más finos por un proceso simple de sedimentación de los granos más gruesos y separación del polvo sobrenadante. Por ello, el intervalo de diámetros de partícula observado por microscopía óptica fue relativamente amplio (10-25 μm). Sin embargo, puesto que la aplicación del biomaterial fue para extracción en fase sólida fuera de línea, la dispersión del tamaño de partícula no tuvo ninguna repercusión significativa en la eficiencia del proceso. El tamaño de las partículas empacadas fue suficientemente pequeño para lograr un empacado homogéneo y permitir aplicar flujos de hasta 4-5 ml/min en la carga de los cartuchos sin afectar la recuperación del analito. Una propuesta que queda para trabajos

TESIS CON
FALLA DE ENTREN

posteriores es la de afinar el tratamiento final de los biomateriales sol-gel para poder aplicarlos en sistemas EFS en línea, en los cuales se requiere un empaque más regular, homogéneo y rígido

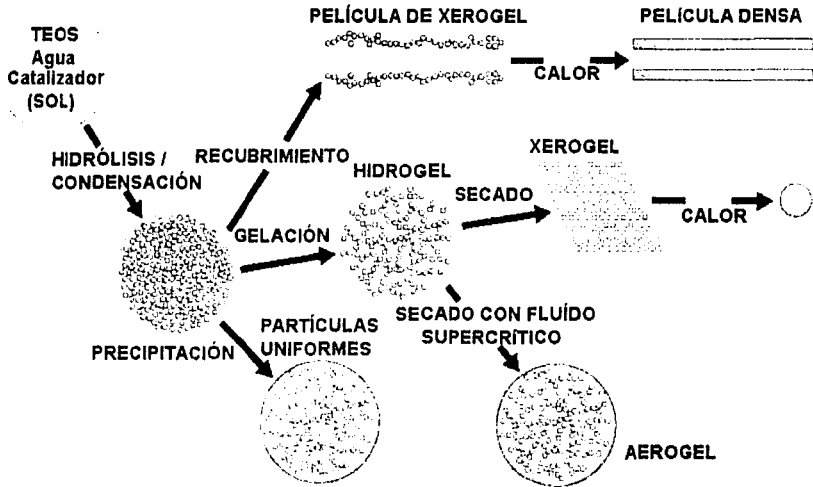


Figura IX.31. Disposición de las partículas de un gel en diferentes estados de hidratación.⁹⁵

Por otra parte, la microscopía electrónica de barrido con su gran poder de resolución y amplificación de la imagen permitió observar detalladamente la estructura externa de los geles sintetizados. Hasta ahora, no se había mostrado (ni comentado) en ninguna publicación la impresionante diferencia en el tamaño de los poros superficiales de un gel dopado con una biomolécula y uno sin dopar. Por ello, no es posible saber si los enormes poros observados en el biogel tienen que ver con la manera como se llevó a cabo el encapsulamiento del anticuerpo en este trabajo o es un caso general. Aunque en muchas publicaciones se ha especulado sobre el hecho de que la biomolécula crea su propia cavidad interna adaptada a su tamaño, no había pruebas visibles de dicha hipótesis. Las imágenes obtenidas y el hecho de haber constatado que no hay pérdida o fuga de la

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

biomolécula una vez que el gel se ha formado, permiten concluir que efectivamente la molécula dopante crea fuertes perturbaciones en la red en formación, con posible ruptura de enlaces ya formados, dando lugar a la aparición de grandes huecos en la estructura. Aunque las dimensiones de un anticuerpo plegado oscilan entre 6-8 nm de diámetro es posible que al ser adicionado en un medio isotónico (PBS) se encuentre rodeado de una gran esfera de solvatación que origina el gran impacto en la estructura polimérica (los poros superficiales observados tienen diámetros de 3-5 μm). Posteriormente, ya en el seno del sol, la biomolécula debe perder parte de su esfera de solvatación y actuar como núcleo de condensación alrededor del cual se entreteje la red dejándola perfectamente encapsulada. Sin embargo, puesto que el material despliega actividad biológica, es evidente que la cavidad no se encuentra totalmente cerrada sino que se conecta con el conjunto de canales y poros más pequeños de la estructura tridimensional.

Otro punto interesante mostrado en las microfotografías es que aún en el caso del gel no dopado los poros superficiales son relativamente grandes (200-400 nm de diámetro). Esta estructura altamente porosa es el resultado del método sol-gel desarrollado y optimizado en este trabajo, gracias al cual el material resultante es suficientemente fuerte para resistir la presión capilar ejercida en la estructura durante el secado por la alta tensión superficial del disolvente acuoso. En algunos trabajos se sugiere intercambiar la solución acuosa de los poros por un solvente de menor tensión superficial para evitar su colapso en la etapa de secado. También se indica que con los métodos de secado clásicos el encogimiento del material y el colapso de los poros conduce a sólidos con un volumen poroso de al máximo 1 cm^3/g .⁹⁹ Considerando que en nuestro caso el sólido se secó totalmente para el estudio SEM, primero por evaporación lenta en refrigeración (hasta pérdida del 50% de su peso) y luego con ayuda del vacío a temperatura ambiente (hasta peso constante), es obvio que con este "secado clásico" no ocurrió el colapso de la estructura antes señalado.

Finalmente, también es importante constatar que la estructura aparente de los geles no es afectada por el uso repetido en experimentos de EFS, como lo muestran las fotografías de un gel usado y un gel recientemente preparado (figuras VIII.28 a y b)

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

presentadas en el capítulo anterior. Durante la EFS, el material es sometido a cambios drásticos de disolvente, PBS en la carga y mezclas acuosas ricas en ACN o MeOH en la elución. En presencia del disolvente orgánico hay hinchamiento del empaque, reflejado en un aumento de presión del cartucho, y en presencia de PBS las partículas se contraen lentamente regresando a su tamaño original. Este hinchamiento y contracción alternados durante más de 50 ciclos de adsorción-desorción no provocaron cambios visibles en la estructura, lo cual demuestra sus buenas propiedades mecánicas e indica que la naturaleza polimérica del esqueleto sólido le confiere a éste una gran flexibilidad.

9.5.2. Termoporometría.

Entre las técnicas más conocidas y utilizadas para la caracterización de la estructura de los materiales poliméricos se encuentran la porosimetría por intrusión de Hg y el equilibrio de adsorción-desorción del N₂. Sin embargo, estas técnicas requieren de una muestra perfectamente seca (generalmente sometida a un tratamiento previo a alta temperatura) por lo que no son adecuadas para la caracterización de hidrogeles o de xerogeles parcialmente secados, que son las condiciones o estado final al que se llevaron los IAs preparados. De hecho, los xerogeles secados al 50% fueron posteriormente rehidratados y después de ello siempre se mantuvieron sumergidos en líquido, tanto durante los experimentos de EFS como durante su almacenamiento.

La termoporometría es un método alternativo de caracterización que se lleva a cabo con el material húmedo. Se basa en el análisis de la transformación de fase del agua confinada en los poros. El diámetro de los poros se deduce de la medida de la temperatura de solidificación (o la temperatura de fusión) del agua, el volumen de los poros se calcula de la cantidad de energía involucrada en la transición de fase y, finalmente, la superficie de los poros se calcula asumiendo que éstos son cilíndricos. La superficie externa de las partículas del material no se toma en cuenta, lo cual no introduce error significativo en el área superficial de sólidos porosos (como los IAs) pues representa una proporción ínfima del área total. En la tabla VI. 6 se compararon las tres técnicas de caracterización mencionadas. Cabe señalar que algunos autores han constatado que la porosimetría por intrusión de Hg no proporciona resultados confiables cuando el diámetro de los poros es

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

inferior a -20 nm, mientras que la técnica basada en las isothermas de adsorción-desorción de N₂ tiende a subestimar el tamaño de los poros cuando éstos sobrepasan algunas decenas de nm de diámetro. Asimismo se ha mencionado en el caso de la termoporometría, que las curvas de fusión obtenidas por DSC son menos confiables que las curvas de congelamiento ya que en las primeras es difícil evitar y/o corregir los retrasos térmicos y de tiempo.^{90, 31}

La ecuación empleada para calcular el tamaño de poro a partir de los resultados obtenidos por termoporometría fue deducida en el anexo B.

$$R = \frac{\alpha}{|\Delta T|} + \beta$$

donde R es el radio del poro, α y β son coeficientes que dependen de la temperatura y espesor de la capa de agua no congelable en el poro respectivamente. Del tratamiento matemático correspondiente se obtuvo finalmente la ecuación:

$$R = \frac{56.36}{|\Delta T|} + 0.1 = \frac{-56.36}{\Delta T} + 0.1$$

donde ΔT es el abatimiento del punto de congelación del agua dentro del poro.

De acuerdo con los resultados reportados en la tabla VIII.31 del capítulo anterior, todos los geles (blanco y dopados) presentaron una distribución bimodal de tamaño de poro. El intervalo de poros más pequeños ($R \leq 8$ nm) tiene proporcionalmente una incertidumbre mayor en cuanto al tamaño de poro y en cuanto al volumen poroso por el valor asumido para β . En cambio, para el intervalo de poros más grandes, el espesor de la capa de agua no congeable (cuyo valor oscila entre 0.3-1.3 nm) tiene relativamente poco impacto en el tamaño de poro y volumen poroso calculados.

Para los geles que tuvieron un secado suave y controlado (gel blanco y geles con anti-malati6n y anti-atrazina) el tamaño de los mesoporos detectado por la técnica empleada fue mayor a 8 nm (80 Å) de diámetro. Este tamaño de poro es suficientemente grande para no obstruir o dificultar la difusi6n de pequeños solutos, como el malati6n o atrazina, hacia el

TESIS CON
FALLA EN ORIGEN

interior del gel. Esto concuerda con la observación experimental del efecto del flujo sobre la capacidad de retención de los IAs; estos geles pudieron trabajarse hasta ~ 5 ml/min sin que se afectara la retención del soluto. A manera de comparación cabe mencionar que algunas fases estacionarias comerciales para cromatografía de líquidos (fases marcadas Si-60) están basadas en un soporte de sílice con poros de 60 Å de diámetro.

En el caso del gel dopado con anti-2,4-D, que había sido secado en mayor grado que los otros geles, se observó una ligera disminución de tamaño para el intervalo de poros más pequeños (diámetro entre 44 y 77 Å), lo cual indica que el proceso de secado total provocó un mayor colapso en algunas secciones frágiles del material. Sin embargo, el efecto fue muy leve como puede constatarse por el volumen poroso total de este gel que fue similar al de los otros geles dopados. La persistencia de poros de mayor tamaño, responsables por el 85% del volumen poroso en el gel con anti-2,4-D es una demostración de que el proceso sol-gel desarrollado es capaz de producir geles resistentes que conservan una estructura altamente porosa ($> 2\text{cm}^3/\text{g}$), similar a la de un aerogel, aun siendo sometidos a un secado intenso.

De hecho, todos los geles, incluyendo el gel blanco, presentaron grandes áreas superficiales y alta porosidad lo cual es favorable para una rápida cinética de difusión de los analitos a través de la estructura porosa. La mayor proporción del volumen poroso correspondió al intervalo de poros de mayor tamaño, particularmente en el caso de los geles dopados en comparación con el gel blanco. Esto es debido a que el anticuerpo encapsulado modifica las propiedades de la matriz sólida volviéndola más porosa. Comparando los datos obtenidos por termoporometría (tabla VIII.31) con lo observado en las microfotografías del SEM, se concluye que los macroporos superficiales en realidad albergan una red de poros interconectados de menor tamaño, dentro de algunos de los cuales se aloja la biomolécula huésped.

Por otra parte, es necesario considerar que la superficie específica y en menor grado el volumen poroso dependen de la forma asumida para los poros. Sin embargo, los valores obtenidos para estas propiedades asumiendo poros cilíndricos en los trabajos de

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Ishikiriya et al.^{66, 67} correlacionan bien con los que se obtienen por las técnicas de intrusión de Hg y adsorción-desorción de N₂ ya que estas dos técnicas también asumen forma de poro cilíndrico para sus cálculos. Por esta razón también se asumió dicha forma de poro para estimar las propiedades físicas de los IAs, aunque es evidente que los valores obtenidos deben ser tomados con reserva, particularmente en el caso del área superficial

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

X. CONCLUSIONES.

Con base en los resultados de este trabajo se puede concluir que el método desarrollado para la preparación de IAs basado en el proceso de sol-gel es una alternativa eficaz que presenta interesantes ventajas frente a otros métodos anteriormente publicados, la mayoría de los cuales se basan en el enlazamiento químico del anticuerpo. Asimismo, se confirma que la extracción por inmunofinidad es una de las mejores opciones para la preparación de muestra en el monitoreo ambiental de pesticidas en matrices acuosas complejas. Estas aseveraciones se basan en lo siguiente:

- El método de inmovilización por sol-gel permite preservar en buena medida la actividad biológica de los anticuerpos. Los cartuchos empacados con este biomaterial presentan buena estabilidad (entre 8-12 semanas; dependiendo del anticuerpo encapsulado) y son reutilizables (alrededor de 60-80 ciclos de operación), lo que los convierte en una alternativa atractiva para el procesamiento de muestras por EFS.
- La capacidad de los IAs depende de la cantidad de anticuerpo inmovilizado. Con cantidades del orden de los 500 μg de anticuerpo se pueden retener selectivamente cantidades de analito apropiadas para una precisa y exacta determinación cromatográfica posterior.
- Dado que la capacidad de los IA es independiente del volumen de muestra cargado (al menos hasta 250 mL), es posible lograr altas tasas de preconcentración del analito y por lo tanto permiten alcanzar límites de detección sumamente bajos (inferiores a las partes por billón) compatibles con las más estrictas normas de regulación de la calidad del agua.
- Los IAs que presentan reactividad cruzada tienen la ventaja de poder ser utilizados para la extracción de analitos estructuralmente análogos como en el caso de las triazinas.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

- Estos IAs son altamente específicos para el pesticida (o los miembros de la familia del pesticida) que dio origen al anticuerpo policlonal encapsulado. Otros pesticidas o compuestos de estructura diferente no son reconocidos
- En comparación con los IAs sintetizados por vía química, los que son sintetizados por encapsulamiento del anticuerpo en sol-gel, resultan más económicos y son más reproducibles. Debido a la menor manipulación de la biomolécula y a las condiciones suaves del proceso de inmovilización, se preserva mejor la actividad del anticuerpo y en consecuencia se requieren menores cantidades de éste para tener un inmunoabsorbente de capacidad adecuada para la EFS de pesticidas. Esto se traduce en una significativa disminución de los costos de manufactura.
- Los IAs sintetizados son adecuados para el análisis de pesticidas en muestras acuosas. Se demostró que es posible su empleo en la determinación de malatión, atrazina, simazina y propazina en aguas superficiales dopadas a niveles que oscilan entre 0.5-1.2 $\mu\text{g/L}$
- Los límites de detección de los métodos analíticos desarrollados usando los IAs preparados para la EFS de la muestra fueron del orden de 0.1-0.2 $\mu\text{g/L}$. Estos límites alcanzados con el procesamiento de 50 mL de muestra, son compatibles con las normas establecidas en E.U. para la calidad del agua, respecto a los pesticidas examinados en este trabajo. Sin embargo, es posible reducir estos límites por lo menos hasta la cuarta parte, incrementando el volumen de muestra analizada. En este caso, los métodos desarrollados serían también compatibles con las estrictas normas ambientales europeas.
- Finalmente este tipo de preparación de muestra, en la cual la extracción preconcentración y limpieza se efectúan en el mismo paso gracias a la específica y fuerte interacción antígeno-anticuerpo, representa una excelente alternativa para la EFS de muestras acuosas, especialmente cuando se tienen matrices complejas

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

como las aguas superficiales. El mayor costo de los IAs, respecto a los adsorbentes tradicionales (especialmente de fase reversa) para EFS, se compensa por la simplificación y rapidez que se alcanza en la etapa de tratamiento de muestra. Las activas investigaciones de la última década sobre la inmovilización de biomoléculas, dentro de las cuales se encuadra el presente trabajo, han presentado alternativas que contribuyen a resolver una importante parte del problema que representa la preparación de IAs. La otra parte, referida a la reducida disponibilidad de anticuerpos, a la falta de una mayor variedad de éstos y a la no muy buena reproducibilidad en sus propiedades, será muy probablemente resuelta en los próximos años gracias al explosivo progreso en el campo de la biotecnología.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

11.1 ANEXO A.

11.1.1. Estadística empleada para el montaje de métodos analíticos.^{102, 103}

En el estudio de linealidad del método una vez obtenidos los puntos de cada curva, se requiere deducir una ecuación que relacione a la variable dependiente o respuesta "y" (*área del pico*), con la variable independiente "x" (concentración cargada). La relación que ajusta el conjunto de datos experimentales se caracteriza por una ecuación de predicción llamada ecuación de regresión.

El término de regresión lineal, significa que la media de y_x (variable aleatoria "y" que corresponde a un valor fijo de "x") está relacionada linealmente con x, y que la ecuación que las relaciona es la recta en su forma usual dada por:

$$\mu_{y_x} = \alpha + \beta x \quad (1)$$

En donde α es la ordenada al origen, β es la pendiente y μ_{y_x} es la media de y_x y éstos son los parámetros por estimar a partir de los resultados experimentales. Indicando a sus estimadores por a y b, respectivamente, a la estimación de μ_{y_x} por \hat{y} , obtenemos la recta de regresión muestral:

$$\hat{y} = a + bx \quad (2)$$

11.1.2. Coeficiente de correlación.

Para estimar si los puntos experimentales se ajustan o no a dicha línea recta, se necesita calcular el coeficiente de correlación con la siguiente ecuación de acuerdo con la Guía de Validación de Métodos Analíticos:

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

$$r = \frac{[n(\sum xy) - (\sum x)(\sum y)]}{[n(\sum x^2) - (\sum x)^2][n(\sum y^2) - (\sum y)^2]} \quad (3)$$

donde, r es el coeficiente de correlación y n es el número de observaciones.

El coeficiente puede tomar valores en el intervalo de $-1 \leq r \leq 1$, describiendo $r=1$ o $r=-1$, correlaciones perfectas, entonces cuando no existe una correlación lineal entre " x " y " y ", el valor de r es de cero.

La prueba estadística para verificar si el coeficiente de correlación es realmente significativo, considerando el número de pares de valores empleados en su cálculo, es mediante la determinación del valor de la t de Student, usando la ecuación:

$$t = \frac{r}{1-r^2} (n-2) \quad (4)$$

El valor calculado de t se compara con el tabulado al nivel de significancia deseado para una prueba t de 2 colas con $(n-2)$ grados de libertad.

Hipótesis nula

H_0 : Que no existe correlación lineal entre " x " y " y "

Contra la hipótesis alterna

H_A : Que sí existe una correlación lineal entre " x " y " y "

Si el valor calculado de t es mayor que el tabulado en tablas, la hipótesis nula se rechaza y queda demostrada entonces la hipótesis alterna de que sí existe una correlación lineal entre " x " y " y "

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

11.1.3. Estimadores de la pendiente y la ordenada al origen.

Al igual que el coeficiente de correlación r los estimadores de la pendiente y la ordenada al origen se calcularon con Microsoft Excell 2000, el cual emplea las siguientes ecuaciones según el método de mínimos cuadrados:

$$b = \frac{n(\sum xy) - (\sum x)(\sum y)}{[n(\sum x^2) - (\sum x)^2]} \quad (5)$$

$$a = \frac{[(\sum y)(\sum x^2)] - [(\sum x)(\sum xy)]}{[n(\sum x^2) - (\sum x)^2]} \quad (6)$$

El error estándar o típico ($S_{y,x}$) de la estimación σ , para cada curva de calibración, se calculó mediante la ecuación:

$$S_{y,x} = \frac{S_{yy} - (S_{xy})^2 / S_{xx}}{n-2} \quad (7)$$

donde

$$S_{xx} = \sum_i (x_i - \bar{x})^2 \quad (8)$$

$$S_{yy} = \sum_i (y_i - \bar{y})^2 \quad (9)$$

$$S_{xy} = \sum_i (x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y}) \quad (10)$$

Una vez calculados los valores de los estimadores a y b , se calculó el intervalo de confianza para cada variable, para lo cual se emplearon las ecuaciones siguientes

$$a \pm t_{\alpha/2} S_a \quad (11)$$

$$b \pm t_{\alpha/2} S_b \quad (12)$$

donde

$$S_a = S_{y,x} \left(\frac{1}{n} + \frac{x^2}{S_{xx}} \right) \quad (13)$$

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

$$Sb = \frac{S_{y \cdot x}}{S_{xx}} \quad (14)$$

Sa y Sb son estimadores de la desviación estándar de la ordenada al origen y la pendiente respectivamente.

11.1.4. Prueba de hipótesis para la pendiente

β es la pendiente de la línea de regresión, esto es, β es el cambio promedio de las "y" correspondiente a un incremento unitario en "x". Si la pendiente tiene un valor de cero, $\beta=0$, entonces la línea de regresión es horizontal y la media de "y" no depende linealmente de "x".

Hipótesis nula

$$H_0: \beta=0$$

Contra la hipótesis alterna

$$H_A: \beta \neq 0$$

Se usa la prueba t para contrastar la hipótesis nula H_0

$$t_0 = \frac{(b-0)}{S_b} \quad (15)$$

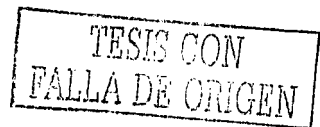
Se rechaza H_0 si el valor calculado para el estadístico t_0 :

Es mayor que el valor del estadístico, $t_{\alpha/2}$

Al nivel de probabilidad estudiado

Entonces quedará demostrada la hipótesis alterna, es decir, que realmente existe una relación entre "y" y "x".

11.1.5. Prueba de hipótesis para la ordenada al origen.



α representa la intersección de la línea de regresión con el eje de las ordenadas y nos permite evaluar la exactitud en un análisis de correlación. Si la ordenada al origen tienen un valor de cero, $\alpha=0$, significará que no hay respuesta en el eje de las ordenadas cuando el valor de la variable independiente, x , es nulo.

Hipótesis nula

$$H_0 : \alpha = 0$$

(la intersección con el eje de las ordenadas es cero)

Contra la hipótesis alterna

$$H_A : \alpha \neq 0$$

(la intersección con el eje de las ordenas es diferente de cero)

Se realiza al igual que en el caso anterior la prueba t , pero ahora con la siguiente ecuación:

$$t_0 = \frac{(\alpha - 0)}{S_\alpha} \quad (16)$$

Se rechaza H_0 si el valor calculado para el estadístico t_0 :

Es mayor que el valor del estadístico, $t_{\alpha/2}$

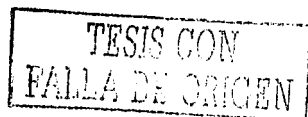
Al nivel de probabilidad estudiado

Si se comprueba que la ordenada al origen obtenida para cada caso no difiere estadísticamente de cero, se aceptará entonces la hipótesis nula y esto significa que los métodos no presentan errores sistemáticos.

El nivel de confianza empleado en todos los casos fue del 95%.

11.1.6. Límites de detección y cuantificación.

Límite de detección (LDD). Es la mínima concentración de una sustancia en una muestra que puede ser detectada, pero no necesariamente cuantificada, bajo las



condiciones de operación establecidas. El LDD se calcula utilizando la ecuación de la recta de regresión de los puntos experimentales Respuesta Vs Concentración y asignando a "y" el valor de "y_{LDD}" según:

$$y_{LDD} = y_B + 3S_B \quad (17)$$

donde y_B es la señal promedio del blanco y S_B es su desviación estándar. Cuando no es posible, o resulta muy complicado, medir la respuesta del blanco, es usual estimar y_B por el valor de la ordenada al origen de la recta de regresión y S_B por el valor de la desviación estándar de dicha ordenada al origen. Por lo tanto:

$$\hat{y}_{LDD} = a + 3S_a = a + bx_{LDD} \quad (18)$$

de donde:

$$x_{LDD} = \frac{\hat{y}_{LDD} - a}{b} \quad (19)$$

Otra forma de calcular el límite de detección consiste en realizar el análisis de 7 muestras como mínimo por el método analítico desarrollado. El LDD se estima mediante la ecuación:

$$LDD = t_{(n-1, \alpha=0.99)} S_c \quad (20)$$

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

Límite de cuantificación (LDC). Es la menor concentración de una sustancia en una muestra que puede ser determinada con precisión y exactitud de manera aceptable bajo las condiciones de operación establecidas.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

De manera similar al caso anterior, el LDC se calcula utilizando la recta de regresión y asignando a "y" el valor y_{LDC} según:

$$y_{LDC} = y_n + 10S_R \quad (21)$$

Utilizando como estimadores la ordenada al origen y su desviación estándar se obtiene finalmente:

$$x_{LDC} = \frac{y_{LDC} - a}{b} \quad (22)$$

Existe otra manera de determinar el LDC y se basa en el criterio de realizar el análisis de 7 muestras como mínimo por el método analítico desarrollado. El LDC se estima multiplicando por 10 la desviación estándar (S_0) expresada en unidades de concentración.

$$LDC = 10 * S_0 \quad (23)$$

11.1.7. Exactitud de un método por análisis de 7 réplicas:

La exactitud del método se refiere a la diferencia que existe entre un valor obtenido por el método y el valor verdadero aceptado. La falta de exactitud nos indica que existen errores sistemáticos. 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 valor verdadero se atribuye únicamente a errores aleatorios. De esta manera la evaluación adopta como hipótesis:

Hipótesis nula:

$$H_0 : \bar{X} = \mu$$

(No hay error sistemático)

Se realiza la prueba t , con la siguiente ecuación:

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

$$t = \frac{(\bar{X} - \mu) \sqrt{\frac{n}{s}}}{s} \quad \text{g.l.} = n-1 \quad (24)$$

donde

\bar{X} = media muestral

μ = valor verdadero

n = número de réplicas

s = desviación estándar

Se rechaza H_0 si el valor calculado para el estadístico $|t|$:

Es mayor que el valor del estadístico, t_{α} , al nivel de probabilidad estudiado

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

11.2. ANEXO B.

11.2.1 Deducción matemática para obtener tamaño del poro, volumen del poro y área superficial.^{86, 87, 90}

11.2.1.1. Tratamiento teórico.

La temperatura del punto triple para un líquido que llena los poros de un material depende de las interfaces sólido-líquido y líquido-gas. El tratamiento teórico del equilibrio termodinámico entre las fases debe tomar en cuenta la curvatura de las interfaces entre las tres fases. Cuando la interfase es curva, la habilidad de las moléculas para difundir de una fase a otra está directamente relacionada con la curvatura local de la interfase y es necesario considerar este parámetro además de la tensión superficial y la diferencia de presión a través de la interfase. Esto introduce una ecuación suplementaria (ecuación de Laplace) en las ecuaciones de Gibbs-Duhem para el equilibrio de fases. La ecuación de Laplace involucra al radio principal de curvatura de la interfase, por lo que mediante el conocimiento de otros parámetros termodinámicos y la medida de la disminución de la temperatura del punto triple del líquido (generalmente agua) es posible determinar dicho radio y por lo tanto el tamaño de los poros en el material.

Considerando como ejemplo la fusión del hielo confinado en un poro cilíndrico, la relación entre el abatimiento de la temperatura de fusión y el radio del poro se deriva del siguiente tratamiento aproximado.

- Aplicando la ecuación de Laplace a las interfaces líquido-aire ($l-a$) y sólido-líquido ($s-l$) se tiene:

$$p^l - p^a = \frac{2\gamma^{l,a}}{R^{l,a}} = \frac{2\gamma^{l,s}}{r/\cos\theta^{l,s}} \quad (1)$$

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

$$p^s - p' = \frac{2\gamma^{s,l}}{R^{s,l}} = \frac{2\gamma^{s,l}}{r/\cos\theta^{s,l}} \quad (2)$$

de (1) y (2) por eliminación de p' se obtiene

$$p^s - p^* = \frac{2\gamma^{s,l}}{r/\cos\theta^{s,l}} + \frac{2\gamma^{l,a}}{r/\cos\theta^{l,a}} \quad (3)$$

donde $p^l - p'$ es la diferencia de presión a través de la interfase $l-j$, γ^{lj} es la tensión superficial, R^{lj} es el radio de curvatura de la interfase, r es el radio aparente del poro (o sea el radio efectivo del poro menos el espesor de la capa de agua no congelable) y θ^{lj} es el ángulo de contacto entre las fases.

- El equilibrio termodinámico entre las fases está dado por

$$d\mu^l = -s^l dT + v^l dp' \quad d\mu^s = -s^s dT + v^s dp^s \quad (4)$$

$$d\mu^l = d\mu^s \quad (5)$$

donde s^l y v^l son la entropía molar y el volumen molar del agua en la fase l del poro y T es la temperatura absoluta. Por lo tanto, al equilibrio:

$$(s^s - s^l)dT = -\frac{\Delta H_f}{T} dT = v^s dp^s - v^l dp' \quad (6)$$

sustituyendo (1) y (3) en (6) e integrando bajo p^* constante da:

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

$$-\ln \frac{T_f}{T_o} = \frac{2}{\Delta H_f} \left\{ \frac{v^s \gamma^{s,l} \cos \theta^{s,l}}{r} + (v^s - v^l) \frac{\gamma^{l,s} \cos \theta^{l,s}}{r} \right\} \quad (7)$$

donde T_o es la temperatura del punto triple del agua en el medio exterior a la partícula, T_f es la temperatura de fusión del hielo en el poro y ΔH_f es la entalpía molar de fusión, la cual se supuso constante en el intervalo de temperatura de T_o a T_f . Haciendo la aproximación de que $\Delta T = T_f - T_o \ll T_o$, el término de la izquierda puede ser expresado por:

$$-\ln \frac{T_f}{T_o} = \ln \left(1 - \frac{\Delta T}{T_o} \right) \approx -\frac{\Delta T}{T_o} \quad (8)$$

Si además se supone que v^l y v^s son aproximadamente iguales al volumen molar del agua en el medio externo a la partícula, v_m , y representando $\theta^{s,l}$ por θ , se obtiene finalmente:

$$r \approx \frac{-2 \gamma^{s,l} v_m T_o \cos \theta}{\Delta H_f \Delta T} \quad (9)$$

La ecuación (9) es la base para el cálculo del radio del poro a partir del abatimiento de la temperatura de fusión del hielo en el poro. La ecuación anterior puede escribirse en forma simplificada de la siguiente manera:

$$r = \frac{-\alpha}{\Delta T} = \frac{\alpha}{|\Delta T|} \quad (10)$$

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Por otra parte, dado que el agua contenida en el poro consta de una capa de agua adsorbida no congelable de espesor β y la fase acuosa líquida congelable, el radio efectivo del poro R queda dado por:

$$R = \frac{\alpha}{|\Delta T|} + \beta \quad (11)$$

Ishikiriyama et al.^{86, 87} realizaron un estudio con 12 sílicas comerciales que fueron caracterizadas por termoporometría, intrusión de Hg y adsorción-desorción de N₂. Ajustando el radio correspondiente al pico de la curva de distribución de tamaño de poro (DTP) deducida a partir del termograma obtenido por DSC, al radio del pico de la curva DTP obtenida por alguna de las otras técnicas (según conviniera en función de los tamaños de poro), se optimizó mediante un programa iterativo el valor del coeficiente α para cada sílica. Por otra parte, el coeficiente β fue optimizado ajustando las áreas de los picos de las curvas DTP al volumen poroso total de las sílicas estudiadas. Los coeficientes α fueron graficados en función del abatimiento de la temperatura de congelamiento y de la temperatura de fusión observado para cada sílica. Estas gráficas mostraron que existe una relación lineal entre α y ΔT , cuyos valores de pendiente y ordenada al origen (a $T=T_0$, punto triple normal del agua) son ligeramente diferentes para el congelamiento y la fusión y dependen de la forma asumida para los poros (factor correctivo z por la forma del poro que aparece en las ecuaciones del anexo B; $z=2$ para poros cilíndricos y $z=3$ para poros esféricos). Las ecuaciones obtenidas por los autores para el coeficiente α asumiendo un poro cilíndrico son:

$$\alpha(T) = 56.36 - 0.9024|\Delta T| \quad \text{en congelamiento} \quad (12)$$

$$\alpha(T) = 33.30 - 0.3181|\Delta T| \quad \text{en fusión} \quad (13)$$

La dependencia de α en ΔT remueve algunos errores provenientes de las aproximaciones realizadas para la derivación de la ecuación (9) (particularmente en lo que se refiere a la no dependencia de ΔH con T en el intervalo ΔT).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

En lo que se refiere a los valores de β , los autores encontraron que para las sílicas estudiadas éstos variaban entre 0.3-1.3 nm, siendo poco dependientes de la forma asumida para el poro. De hecho señalan que el espesor de la capa de agua no congelable corresponde a 1-4 monocapas de agua adsorbida ya que el radio de Van der Waals del agua es de aproximadamente 0.3 nm. Los valores de β mencionados fueron obtenidos de las curvas de fusión ya que con las curvas de congelamiento se puede subestimar el espesor de la capa de agua no congelable debido a posibles fenómenos de sobreenfriamiento.

En el presente trabajo, las propiedades de los geles se dedujeron a partir de la curva de congelamiento, asumiendo un valor de $\beta = 1$ nm. Sustituyendo este valor y la ecuación (12) en (11) se obtiene:

$$R = \frac{56.36}{|\Delta T|} + 0.1 = \frac{-56.36}{\Delta T} + 0.1 \quad (14)$$

La ecuación (14) fue utilizada para transformar la escala de temperatura del termograma en una escala de radio de poro. Las subsecuentes transformaciones de la curva experimental para obtener la curva DTP se detallan a continuación

11.2.1.2. Transformación de la grafica obtenida (figura VIII.29) con los datos de flujo de calor $\frac{dq}{dt}$ (mW) vs T.

Para obtener la distribución del radio del poro se necesita generar la curva $\frac{dV}{dR}$ ($cm^3 / g \text{ nm}$) vs R (nm) a partir de las siguientes ecuaciones:

- Obtención de R

$$R = -\frac{\alpha(T)}{\Delta T} + \beta$$

$$\beta = 1 \text{ nm}$$

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

$$\alpha(T) = 56.36 - 0.9024\Delta T \quad (\text{poros cilíndricos})$$

$$\Delta T = (T - T_0)$$

donde $T_0 = 273.13 \text{ }^\circ\text{K} = 0 \text{ }^\circ\text{C}$ y ΔT es (-) por que es el descenso del punto de congelación del agua, dividiendo entre T (en $^\circ\text{C}$, ya que $\Delta T = T - 0$) y sustituyendo

$$R = -\frac{56.36}{T} + 0.0976 \quad (15)$$

- Obtención de $\frac{dV}{dR}$ ($\text{cm}^3 / \mu\text{m}$)

$$\frac{dV}{dR} = \frac{dq}{dt} \frac{dt}{dR} \frac{1}{m \Delta H_m(T) \rho(T) (R-\beta)^2} R^2$$

a) $\frac{dq}{dt}$ es la ordenada de la curva en mW ó $\frac{\text{m} \cdot \text{J}}{\text{s}}$ se divide entre 1000 para obtener $\frac{\text{J}}{\text{s}}$

b) $\frac{dt}{dR}$ es la velocidad de barrido v_b , en ($^\circ\text{C}/\text{s}$) y estableciendo que $\Delta T = 0$ cuando $T = T_0$ y

$$t = t_0(\text{s}) \text{ se cumple para cualquier } t \quad t = t_0 - \frac{\Delta T}{v_b} \text{ por lo tanto } T = -(t - t_0)v_b$$

de esta manera:

$$\frac{dt}{dR} = \frac{dt}{dT} \frac{dT}{dR} \text{ donde } \frac{dt}{dT} = -\frac{1}{v_b} \text{ y } \frac{dT}{dR} = \frac{1}{dR/dT}$$

$$\text{como } \frac{dR}{dT} = \frac{d(-\frac{56.36}{T} + 0.0976)}{dT} = \frac{56.36}{T^2}$$

por lo tanto

$$\frac{dT}{dR} = \frac{T^2}{56.36} \text{ quedando finalmente:}$$

$$\frac{dt}{dR} = -\frac{T^2}{v_b \cdot 56.36} \text{ con unidades (s/nm)}$$

c) m es la masa del gel en gramos (g)

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

d) $\Delta H_m(T)$ es la entalpia de fusión del hielo como función de la temperatura dentro de los poros y está dada por la ecuación:

$$\Delta H_m(T) = 334.1 + 2.119T - 0.00783T^2 \text{ en unidades (J/g) con } T \text{ en } ^\circ\text{C}$$

e) $\rho(T)$ es la densidad del agua como función de la temperatura y esta dada por la ecuación:

$$\rho(T) = 0.9171 - 1.0729 \times 10^{-4} T \text{ con unidades (g/cm}^3\text{)}$$

f) $\frac{R^4}{(R-\beta)^2}$ es un factor de corrección por la forma del poro y por el espesor de la capa de agua que no se congela en el poro; se asumen poros cilíndricos $\alpha=2$ con espesor $\beta=1\text{nm}$, donde R es el radio del poro en nm y T en $^\circ\text{C}$.

$$R = -\frac{56.36}{T} + 0.0976$$

por lo tanto

$$\frac{R^2}{(R-\beta)^2} = \frac{\left(-\frac{56.36}{T} + 0.0976\right)^2}{\left(-\frac{56.36}{T} - 0.9024\right)^2} \text{ adimensional}$$

Finalmente la ordenada $\frac{dV}{dR} (\text{cm}^3 / \text{gnm})$ queda:

$$\frac{dV}{dR} = \frac{4\eta}{1000} \left(\frac{-T^2}{v_i 56.36} \right) \left(\frac{1}{m} \right) \left(\frac{1}{334.1 + 2.119T - 0.00783T^2} \right) \left(\frac{1}{0.9171 - 1.0729 \times 10^{-4} T} \right) \left(\frac{\left(-\frac{56.36}{T} + 0.1\right)^2}{\left(-\frac{56.36}{T} - 0.9024\right)^2} \right) \quad (16)$$

11.2.1.3. Obtención del volumen poroso a partir de la curva de distribución del poro.

$$V_p = \int_{r/R}^{\infty} \frac{dV}{dR} \text{ es un área bajo la curva, se obtienen unidades en (cm}^3\text{/g)} \quad (17)$$

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Obtención de la superficie de los poros (cilíndricos).

$$s = \int \frac{x}{R} \frac{dV}{dR} dR \quad \text{donde } x=2$$

$$s = \int \frac{2}{R} \frac{dV}{dR} dR$$

es un área bajo la curva, pero también puede obtenerse a partir del volumen poroso total de la siguiente manera:

$$s = \frac{2V_p}{R} \quad \text{multiplicado por } 1000 \text{ se obtienen unidades en } (m^2/g) \quad (18)$$

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

XII. BIBLIOGRAFIA.

1. Lawrence J. and Scott P.; In environmental analysis: Techniques, applications and quality assurance. Elsevier, Amsterdam, (1993).
2. Pichon V., Bouzige M. and Hennion M.-C.; New trends in environmental trace-analysis of organic pollutants: class-selective immunoextraction and clean-up in one step using immunosorbents. *Anal. Chim. Acta* **376**, 21-35 (1998).
3. Bouzige M., Legeay P., Pichon V. and Hennion M.-C.; Selective on-line immunoextraction coupled to liquid chromatography for the trace determination of benzidine, congors and related azo dyes in surface water and industrial effluents. *J. Chromatogr. A* **846**, 317-329 (1999).
4. Wong R., Pont J., Johnson D., Zulalian J., Chin T. and Karu A.; In immunoanalysis of agrochemicals. Emerging technologies. American Chemical Society, Washington D.C. Vol. 586 (1995).
5. Pichon V., Durand N., Le Goffic F. and Hennion M.-C.; Selective trace enrichment on immunosorbents for the multiresidue analysis of phenylurea and triazine pesticides. *J. Chrom. A*, **725**, 107-119 (1996).
6. Pichon V., Bouzige M., Miede C. and Hennion M.-C.; Immunosorbents: natural molecular recognition materials for sample preparation of complex environmental matrices. *Trends. Anal. Chem.* **18**, 219-235 (1999).
7. Pichon V., Hennion M., Daniel R. and Barceló D.; Preparation and evaluation of immunosorbents for selective trace enrichment of phenylurea and triazine herbicides in environmental waters. *Anal. Chem.* **67**, 2451-2460 (1995).
8. Bouzige M., Pichon V. and Hennion M.-C.; On-line coupling of immunosorbent and liquid chromatographic analysis for the selective extraction and determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in water samples at the ng/l level. *J. Chromatogr. A* **823**, 197-210 (1998).
9. Rejeb S., Durand N., Martel A., Poulennec B., Lawrence J., Hennion M.-C. and Le Goffic F.; Development of anti-phenylurea antibody purification techniques for improved environmental applications. *Anal. Chim. Acta* **376**, 41-48 (1998).
10. Martín-Esteban A., Fernández P. and Camara, C.; Immunosorbents: A new tool for pesticide simple handling in environmental analysis. *Fressenius J. Anal. Chem.* **357**, 927-933 (1997).
11. Goodrow M. and Hammock B.; Hapten design for compound-selective antibodies: ELISAS for environmentally deleterious small molecules. *Anal. Chim. Acta* **376**, 83-91 (1998).
12. Clarke W., Beckwith J., Jackson A., Reynolds B., Karle M. and Hage D.; Antibody immobilization to high-performance liquid chromatography supports. Characterization of maximum loading capacity for intact immunoglobulin G and Fab fragments. *J. Chrom. A*, **888**, 13-22 (2000).
13. Pichon V., Chen, L. and Hennion M.-C.; On-line preconcentration and liquid chromatographic analysis of phenylurea pesticides in environmental water using a silica-based immunosorbent. *Anal. Chim. Acta* **311**, 429-436 (1995).
14. Houben A., Meulenber e. and Stoks P.; Immunoaffinity extraction of pesticides from surface water. *Anal. Chim. Acta* **74**, 69-74 (1999).

TRUSE CON
FALLA DE ORIGEN

15. Gottfried D., Kagan A., Hoffman B. and Friedman J.; Impeded rotation of a protein in a sol-gel matrix. *J. Phys. Chem. B*, **103**, 2803-2807 (1999).
16. Wang R., Narang U., Prasad N. and Bright F.; Removal of ribonucleases from solution using and inhibitor-based sol-gel-derived biogel. *Anal. Chem.* **67**, 1935-1939 (1995).
17. Bhatia R., Brinker C., Gupta A. and Singh A.; Aqueous sol-gel process for protein encapsulation. *Chem. Mater.* **12**, 2234-2241 (2000).
18. Shabat D., Grynspan F., Saphier S., Turniansky A., Avnir D. and Keinan E.; An efficient sol-gel reactor for antibody-catalyzed transformations. *Chem. Mater.* **9**, 2258-2260 (1997).
19. Wei Y., Dong H., Xu J. and Feng Q.; Simultaneous immobilization of horseradish peroxidase and glucose oxidase in mesoporous sol-gel host materials. *Chemphyschem.* **9**, 802-808 (2002).
20. Dosoretz C., Armon, R., Starosvetzky J. and Rothschild N.; Activity of parathion hydrolase and other enzymes entrapped in sol-gel glass. *J. Sol-Gel Sci. and Technol.* **7**, 7-11 (1996).
21. Bronshtein A., Aharonson A., Avnir, D.; Turniansky A. and Altstein M.; Sol-gel matrixes doped with atrazine antibodies: atrazine binding properties. *Chem. Mater.* **9**, 2632-2639 (1997).
22. Pulido-Tofiño P.; Ballesteros-Moreno J.M. and Perez-Conde M.C.; Sol-gel glass doped with isotropuron antibody as selective support for the development of a flow-through fluoroimmunosensor. *Anal. Chim. Acta* **429**, 337-345 (2001).
23. Cichna M., Markl P., Knopp D. and Niessner R.; On-line coupling of sol-gel-generated immunoaffinity columns with high-performance liquid chromatography. *J. Chrom. A*, **919**, 51-58 (2001).
24. Cichna M. and Markl P.; Optimization of pyrene immunoaffinity columns prepared by the sol-gel method. *Chem. Mater.* **9**, 2640-2646 (1997).
25. Ferrer I., Hennion M-C. and Barceló D.; Immunosorbents coupled on-line with liquid chromatography/atmospheric pressure chemical ionization/mass spectrometry for the part per trillion Level determination of pesticides in sediments and natural waters using low preconcentration volumes. *Anal. Chem.* **69**, 4508-4514 (1997).
26. Roitt I. and Brostoff J.; *Inmunología*. Masson-Salvat (Ediciones Científicas y Técnicas), 3ra ed. Barcelona, España, (1993).
27. Catty D.; *Antibodies. A practical approach*. Vol. 1. IRL Press, UK (1989).
28. Ferencik M.; *Handbook of immunochemistry*. Chapman & Hall, New York, U.S.A. (1994).
29. Vann Oss. C and Van Regenmortel M.; *Immunochemistry*. Marcel Dekker Inc. New York, U.S.A. (1994).
30. Díaz-Zagoya J.; *Bioquímica e Inmunología*. Facultad de Medicina UNAM, México D.F. (1998).
31. Ternyinc T.; *Técnicas inmunoenzimáticas*. Grupo Editorial Iberoamérica, México D.F. (1989) pp.1-20.
32. Bruun L., Koch C., Jakobsen M., Pedersen B., Christiansen M. and Aamand J.; Characterization of monoclonal antibodies raised against different structures belonging to the s-triazine group of herbicides. *Anal. Chim. Acta* **436**, 87-101 (2001).
33. Oubiña A., Gascón J. and Barceló D.; Multianalyte effect in the determination of cross-reactivities of pesticide immunoassay in water matrices. *Anal. Chim. Acta* **347**, 121-130 (1997).

TESIS CON
PALLA DE ORIGEN

34. Bjarnasson B., Bousios N., Eremin S. and Johansson G.; Flow injection enzyme immunoassay of atrazine herbicide in water. *Anal. Chim. Acta* **347**, 111-120 (1997).
35. Hock B.; Antibodies for immunosensors. *Anal. Chim. Acta* **347**, 177-186 (1997).
36. Goodrow M. and Hammock B.; Hapten design for compound-selective antibodies: ELISAs for environmentally deleterious small molecules. *Anal. Chim. Acta* **376**, 83-91 (1998).
37. Hage D.; Survey of recent advances in analytical applications of immunoaffinity chromatography. Review. *J. Chrom. B*, **715**, 3-28 (1998).
38. Barceló D., Gaultz G. and Abuknesha R.; Immunosensors for pesticide determination in natural waters. *Trends. Anal. Chem.* **20**, 124-131 (2001).
39. Van Emon J., Gerlach C. and Bowman K.; Bioseparation and bioanalytical techniques in environmental monitoring. Review. *J. Chrom. B*, **715**, 211-228 (1998).
40. Stevenson D.; Immunoaffinity solid-phase extraction. Review. *J. Chrom. B*, **745**, 39-48 (2000).
41. Dalluge J., Hankemeier T., Vreuls R. and Brinkman U.; On-line coupling of immunoaffinity-based solid-phase extraction and gas chromatography for the determination of s-triazines in aqueous samples. *J. Chrom. A*, **830**, 377-386 (1999).
42. Bronshtein A., Aharonson N., Turniansky A. and Altstein M.; Sol-gel-based immunoaffinity chromatography: Application to nitroaromatic compounds. *Chem. Mater.* **12**, 2050-2058 (2000).
43. Gottfried D., Kagan A., Hoffman B. and Friedman J.; Impeded rotation of a protein in a sol-gel matrix. *J. Phys. Chem. B*, **103**, 2803-2807 (1999).
44. Wang R., Narang U., Prasad N. and Bright F.; Affinity of antiluorescein antibodies encapsulated within transparent sol-gel glass. *Anal. Chem.* **65**, 2671-2675 (1993).
45. Dunbar R., Jordan D. and Bright F.; Development of chemical sensing platforms based on so-gel derived thin films: origin of film age vs performance trade-offs. *Anal. Chem.* **68**, 604-610 (1996).
46. Livage J., Roux C., Farhati K. and Monjour L. Antibody-antigen reactions in porous sol-gel matrices. *J. Sol-gel. Sci. and Technol.* **8**, 663-666, (1997).
47. Setford S.; Immunosensing in organic and mixed aqueous-organic phase environments. *Trends. Anal. Chem.* **19**, 330-339 (1998).
48. Brinker C., Shrer G.; Sol-gel science. Academic Press, New York, U.S.A. (1991).
49. Laboratory of environmental analysis PD Dr. Dietmar Knoop <http://www.ws.chemie.tu-muenchen.de/elisa1/mattsgg.html>.
50. Hennion M-C. and Barceló D.; Strengths and limitations of immunoassays for effective and efficient use for pesticide analysis in water samples: A review. *Anal. Chim. Acta* **362**, 3-34 (1998).
51. Delaunay N., Pichon V. and Hennion M-C.; Immunoaffinity solid-phase extraction for the trace-analysis of low-molecular-mass analytes in complex sample matrices. Review. *Journal of Chromatography B*, **745**, 15-37 (2000).
52. FAO. Especificaciones de la FAO para productos destinados a la protección de las plantas. OMS. (2000).
53. Worthing C.; The pesticide manual: A world compendium. 8th ed., The British Crop Protection Council, Croydon, England (1987).
54. Murphy S.; Toxic effects of pesticides, 3rd ed., Casarett and Doull's Toxicology, New York, USA, (1986) pp. 519-581

TEREC CON
FALLA DE ORIGEN

55. Hartley D. and Kidd H.; *The Agrochemicals Handbook*. The Royal Society of Chemistry, The University of Nottingham, England (1986).
56. Csuros M.; *Environmental, sampling and analysis for technicians*. CRC Press, U.S.A. (1994).
57. Tomlin C.; *The Pesticide Manual*, 11th British Crop Protection Council, Farnham, Surrey, UK (1997).
58. Eto M.; *Organophosphorus Pesticides: Organic and Biological Chemistry*, CRC Press, Inc., Boca Raton, FL. (1989) pp. 200-255.
59. A Pesticide Information Project of Cooperative Extension Offices of Cornell University, Michigan State University, Oregon State University, and University of California at Davis. <http://pmep.cce.cornell.edu/> -malathion, atrazine, simazine, and propazine, 2,4-D-, (2003).
60. The University of Minnesota Biocatalysis-Biodegradation Database. <http://umbdd.ahc.umn.edu/index.html>. (2003).
61. Renbeerg L.; Ion exchange technique for the determination of chlorinated phenols and phenoxy acids in organic tissue, soil and water. *Anal. Chem.* **46**, 459-461 (1974).
62. Smith R. and Pietrzyk D.; LC enrichment, separation and determination of chlorophenols and phenoxyacetic acids on PRP-1. *J. Chrom.Sci.* **21**, 282-287 (1983).
63. Geerdink R.; Balkom C. and Berrower H.; Determinations of phenoxyacetic acid herbicides in water with a polymeric pre-column preconcentration and tetrabutylammonium ion-pair separation on a PRP-1 column *J. Chrom. A.* **481**, 275-285 (1989).
64. Schiilister W.; Automatic measurement of bentazone and phenoxy acid herbicides by HPLC with three different detections. *Chromatographia* **29**, 24-30 (1990).
65. Incorvina M.; Determination of chlorophenoxy acid using high-performance liquid chromatography-particle beam mass spectrometry. *J. Chrom. A.* **542**, 385-395 (1991).
66. Chiron S., Martínez E. and Barceló D.; On line and off-line sample preparation of acidic herbicides and bentazone transformation products in estuarine waters. *J. Chrom. A.* **665**, 283-293 (1994).
67. Wells M. and Zhou Yu L.; Solid-phase extraction of acidic herbicides Review *J. Chrom A.* **885**, 237-250 (2000).
68. Mazen H. and Reinhold W.; Rapid screening of triazines and quantitative determination in drinking water. *J. Biochem. Biophys. Methods* **1606**, (2002) in press.
69. Petra M., Krämer A. and Franke C.; Standfuß-Gabisch Flow injection immunoaffinity analysis (FIIA) —A screening technology for atrazine and diuron in water samples *Anal. Chim. Acta* **399**, 89-97 (1999).
70. Carrasco P., Escola R., Marco M. and Bayona J.; Development and application of immunoaffinity chromatography for the determination of the triazinic biocides in seawater. *J. Chrom. A.* **909**, 61-72 (2001).
71. Bouaid A., Ramos L., Gonzalez M., Fernandez P. and Camara C.; Solid-phase microextraction method for the determination of atrazine and four organophosphorus pesticides in soil samples by gas chromatography. *J. Chrom. A.* **939**, 13-21 (2001).
72. Salleh S., Saito Y. and Jinno K.; An approach to solventless sample preparation procedure for pesticides analysis using solid phase microextraction/supercritical fluid extraction technique. *Anal. Chim. Acta* **418**, 69-77 (2000).
73. Gong A. and Ye Ch.; Analysis of trace atrazine and simazine in environmental samples by liquid chromatography-fluorescence detection with pre-column derivatization reaction. *J. Chrom. A.* **827**, 57-63 (1998).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

74. Mills G., Application of an on-line liquid chromatographic system for the determination of polar herbicides in drinking water within a routine laboratory *J. Chrom. A*, **813**, 63–70 (1998).
75. Carabias-Martínez R., Rodríguez-Gonzalo E., Herrero-Hernández E., Sánchez-San Roman F. and Prado-Flores MG., Determination of herbicides and metabolites by solid-phase extraction and liquid chromatography. Evaluation of pollution due to herbicides in surface and groundwaters. *J. Chrom. A*, **950**, 157–166 (2002).
76. Hong Z., Xinhong H., Jianqing L. and Xu-Li Ch., Determination and load of organophosphorus and organochlorine pesticides at water from Jiulong River Estuary, *China Marine Pollution Bulletin* **45**, 397–402 (2002).
77. Tomkins B. and Ilgner R.; Determination of atrazine and four organophosphorus pesticides in ground water using solid phase microextraction (SPME) followed by gas chromatography with selected-ion monitoring. *J. Chrom. A*, **972**, 183–194 (2002).
78. Tolosa I., Douy B. and Carvalho F.; Comparison of the performance of graphitized carbon black and poly(styrene–divinylbenzene) cartridges for the determination of pesticides and industrial phosphates in environmental waters *J. Chrom. A*, **864**, 121–136 (1999).
79. Beltran J., Lopez F., Cepria O. and Hernandez F., Solid-phase microextraction for quantitative analysis of organophosphorus pesticides in environmental water samples. *J. Chrom. A*, **808**, 257–263 (1998).
80. Sng M., Lee F. and Lasko H.; Solid-phase microextraction of organophosphorus pesticides from water. *J. Chrom. A*, **759**, 225-230 (1997).
81. Yacobi B., Holt D. and Kazmerski L.; Microanalysis of solids. Plenum Press, New York, U.S.A. (1994) pp. 25-60.
82. Albella, J.; Introducción a la ciencia de materiales. Consejo Superior de Investigaciones Científicas (ISIC), Madrid, España (1993) pp. 555-583 y 639-663.
83. Eberhart J.; Structural and chemical analysis of materials. John Wiley & Sons, New York, U.S.A. (1991) pp.458-481
84. Callister D.; Materials science and engineering. John Wiley & Sons, New York, U.S.A. (1994).
85. Unger K., Sing W.; Studies in surface science and catalysis Vol. 39. Characterization of porous solids. Elsevier, Holland, (1988) pp. 295-315.
86. Ishikiryama K., Todoki M. and Motomura K.; Pore size distribution (PSD). Measurements of silica gels by means of differential scanning calorimetry. I. Optimization for determination of PSD. *J. Colloid and Interface Sci.* **171**, 92-102 (1995).
87. Ishikiryama K., Todoki M. and Motomura K.; Pore size distribution (PSD). Measurements of silica gels by means of differential scanning calorimetry. II. Thermoporosimetry. *J. Colloid and Interface Sci.* **171**, 103-111, (1995).
88. Biay I., Raymond J. and Quinson J.; Textural characterization of silica and silica-alumina gels: comparison of different techniques. *J. Sol-gel. Sci. and Technol.* **8**, 189-194, (1997).
89. Rigacci A., Achard P. and Pirard R.; Structural investigation in monolithic silica aerogels and thermal properties. *J. Non-Crystal. Solid.* **225**, 260-265 (1998).
90. Iza M., Woerly S., Danumah C., Kaliaghine S. and Bousmina M.; Determination of pore size distribution for mesoporous materials and polymeric gels by means of DSC measurements: thermoporosimetry. *Polymer.* **41**, 5885-5893, (2000).
91. Bradford M.; A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248-254 (1976).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

92. Scott R.; Silica gel and bonded phases. John Wiley & Sons, New York U.S.A. (1993).
93. Zamudio Morales Enrique, Tesis de Maestría. "Preparación de sensores químicos y bioquímicos por la técnica de sol-gel", (2003),
94. Dunn B. and Zink J.; Probes of pore environment and molecule-matrix interactions in sol-gel materials, *Chem. Mater.* **9**, 2280-2291 (1997).
95. Livage J.; Sol-gel synthesis of solids. Encyclopedia of inorganic chemistry. John Wiley & Sons, New York U.S.A. (1994) pp.3836-3851.
96. Rodriguez S.A.; Colon L.A.; Investigations of a sol-gel derived stationary phase for open tubular capillary electrochromatography. *Anal. Chim. Acta.* **397**, 207-215 (1999).
97. Jin W. and Brennan J.; Properties and applications of proteins encapsulated within sol-gel derived materials. *Anal. Chim. Acta* **461**, 1-36 (2002).
98. Gill I. and Ballesteros A.; Bioencapsulation within synthetic polymers (Part 1). Sol-gel encapsulated biologicals. *Trends. Biotechnol.* **18**, 282-296 (2000).
99. Lecloux J. and Pirard J.; High temperature catalysis through sol-gel synthesis *J. Non-Cryst. Solids* **225**, 146-152 (1998).
100. Axen R.; Porath J. and Ernback S.; Chemical coupling of peptides and proteins to polysaccharide by means of cyanogens halide. *Nature* **214**, 1320-1304 1967.
101. Makhtadze I. and Privalov P.; Contribution of hydration to protein folding thermodynamics I. The enthalpy of hydration, *J. Mol. Biol.* **232** 639-657. (1993).
102. Miller J C. Miller J. N.; Estadística para Química Analítica, 2^{da} ed., Adisson-Wesley Iberoamericana, USA (1993) pp.87-119
103. Miller I. Freund J.; Probabilidad y estadística para ingenieros químicos 4^{ta}. Prentice May Hispanoamericana, México (1992) pp. 326-385.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Preparation and Characterization of a Sol–Gel Immunosorbent Doped with 2,4-D Antibodies

Juan C. Vazquez-Lira, Evangelina Camacho-Frias, Araceli Peña-Alvarez, and Luz E. Vera-Avila*

Departamento de Química Analítica, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510 México D.F., México

Received July 2, 2002. Revised Manuscript Received October 11, 2002

An optimized sol–gel technique was used for the entrapment of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) antibodies in a silica matrix derived from tetraethoxysilane (TEOS). Immunoextraction cartridges with reproducible binding capacity for 2,4-D methyl ester (test solute) were prepared from the doped dry gels and wet hydrogels. Although the surface of these biomaterials was characterized by wide macropores, there was no evidence of antibody leakage, as demonstrated by the good precision of the results obtained from repeated extractions performed in the same cartridge. The 2,4-D antibody (commercially obtained), free or encapsulated, was highly selective toward the esterified 2,4-D molecule. Optimal extraction was achieved from samples containing phosphate buffer 0.01–0.15 M (pH ~7), which were loaded at a maximal flow rate of 1 mL min⁻¹ in cartridges left under buffer for at least 30 min between consecutive experiments. Recoveries of 100%, for loaded ester amounts lower than the cartridge capacity, were obtained under these conditions. A binding capacity of 130 ng of 2,4-D ester per mg of immobilized antibody, corresponding to 42% of the free antibody activity, was obtained with the best gels. The capacity of these immunosorbent cartridges remained practically constant during eight weeks or 50–60 adsorption–desorption cycles.

Introduction

The development of new adsorbent materials and better methodologies for the solid phase extraction (SPE) of trace pollutants from environmental matrices has been the subject of much research work during recent years. Because of their high selectivity, immunosorbents are becoming one of the most interesting new SPE phases for environmental analysis. Indeed, immunosorbents for some pesticides (phenylureas, triazines) and mycotoxins (aflatoxins) have already been successfully commercialized, and many others are actually under development (benzidines, polyaromatic hydrocarbons, and imidazolines).^{1–4}

The antecedent of these biomaterials can be found since the late 1960s in the works of Porath et al.,⁵ and many others, that gave rise to a new form of chromatography based on biological recognition. Affinity (or more properly bioaffinity) chromatography was initially

devoted to the isolation and purification of proteins, nucleic acids, and in general big biomolecules or their corresponding substrates, from tissue extracts or biological fluids. Thus, the applications of this separation technique were restricted for a long time to the medical and biological fields (drug therapy, clinical diagnosis, biotechnology, etc.). The great progress in immunology during the past decade has rendered it theoretically possible to generate antibodies against almost any compound. This has permitted extension of application of affinity chromatography to the environmental field.

Immunosorbents are prepared by the physical or chemical immobilization of an antibody (or sometimes an antigen) in a solid support. The production of antibodies against pesticides is based on the conjugation of the small target molecule (the hapten) to a large immunogenic carrier molecule (typically bovine serum albumin, BSA, or keyhole limpet hemocyanin, KLH). Subsequent immunization of a suitable vertebrate (sheep or rabbit) followed by collection of the antiserum after several months and isolation of the G-type immunoglobulin (IgG) fraction, finally renders the prime material for the immunosorbent preparation.⁷

The most usual way to immobilize antibodies in a solid support is by covalent linkage. To present, this has been the only approach used in the production of sorbents for the commercialized immunextraction cartridges. However, some undesirable effects, such as

* To whom correspondence should be addressed. Phone: 5255 562 23790. Fax: 5255 562 23723. E-mail: luzetena@servidor.unam.mx.

(1) Lawrence, J. E.; Scott, P. M. In *Environmental Analysis Techniques, Applications and Quality Assurance*; Barcelo, D., Ed.; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 1993; p 273.

(2) Pichon, V.; Bouzige, M.; Hennion, M. C. *Anal Chim Acta* 1998, 376, 21.

(3) Bouzige, M.; Legeay, P.; Pichon, V.; Hennion, M. C. *J Chromatogr A* 1999, 846, 317.

(4) Wong, R. B.; Pont, J. I.; Johnson, D. H.; Zolalian, J.; Chin, I.; Kaur, A. E. In *Immunoanalysis of Agrochemicals: Emerging Technologies*; Nelson, J. O.; Kaur, A. E.; Wong, R. B., Eds.; American Chemical Society: Washington, DC, 1995; Vol. 586, p 235.

(5) Porath, J.; Axen, R.; Ernback, S. *Nature (London)* 1967, 215, 1491.

(6) Porath, J. *Nature (London)* 1968, 218, 834.

(7) Martín Esteban, A.; Fernández, P.; Camara, C. *Fresenius' J. Anal Chem* 1997, 357, 927.



distortion or loss of the three-dimensional structure of the antibody or steric hindrance of its binding site,⁸ can occur during the coupling reaction. An alternative approach for the immobilization of sensitive molecules is their encapsulation in the pores of a solid support by means of sol-gel techniques.⁹⁻¹⁶ This process is carried out under mild conditions and at ambient temperature, which lowers the risks of conformational changes in the guest molecule. Besides, because the molecules are not attached to the support, there are no orientation problems, and the access of the target solute to the active site is less hindered. It has also been claimed that the physical entrapment prevents leakage of the biomolecule and increases its resistance to thermal and chemical denaturation.¹³⁻¹⁵ These facts have encouraged the development of sol-gel sorbents for applications in the environmental field. Thus, the preparation and evaluation of immunosensors or immunoafinity columns for isoproturon,¹⁸ atrazine,¹⁹ polycyclic aromatic hydrocarbons,²⁰ and parathion²¹ have already been reported.

However, some problems still have to be solved to obtain a highly active, stable, and rugged material by sol-gel methods. For example, the production of high levels of alcohol during the hydrolysis and polymerization of the precursor can result in significant denaturation or inactivation of the biomolecule.¹¹⁻¹³ Shrinkage and pore collapse effects during the drying of the gel need to be reduced to prevent excessive loss of porosity, and also because matrix compression can disable conformational sensitive proteins.^{11,17}

The phenoxyalkyl acids, usually formulated in the form of salt or alkyl esters, are an important group of selective growth stimulating herbicides. They have been extensively used in many countries since the 1940s for the control of weeds in dams, cereal lawns, and pasturelands. In particular, 2,4-D and 4-(2,4-dichlorophenoxy)butyric acid (2,4-DB) are among the most commonly used herbicides in Mexico. Although these compounds are considered only moderately toxic, their widescale production and use, and their relatively high solubility and persistence in water²² demand the development of selective, sensitive, and yet simple methods for their regular monitoring in natural and potable waters.

The aim of this work was to optimize the sol-gel conditions for the encapsulation of 2,4-D antibodies, to evaluate the performance, selectivity, and stability of cartridges packed with the obtained material, and to propose an immunooxtraction protocol derived from this evaluation. 2,4-D Antibodies are commercially available, but, to our knowledge, an immunosorbent for 2,4-D has not yet been commercialized or reported.

Experimental Section

Reagents. HPLC grade acetonitrile (AcCN) was from Pro-labo (Paris, France). Reagent water was obtained from a Nanopure detontizer (Barnstead Thermolyne, Dubuque, IA). Other analytical grade reagents used for the preparation of buffers (NaCl, KCl, H₃PO₄, NaOH, acetic acid, and formic acid) or as additives (HClO₄) in some HPLC mobile phases, were purchased from Baker (Phillipsburg, N.J.), Tetraethyloxysilane 99% (TEOS) from Fluka (Buchs, Switzerland) used to prepare the sol-gel glasses. Phosphate-buffered saline solutions (PBS) of pH 7.2 were 0.02 M phosphate, 0.157 M NaCl, and 0.0027 M KCl (unless otherwise indicated). They were prepared in reagent water by dilution of the appropriate aliquot of H₃PO₄, neutralization with NaOH, and addition of the alkaline salts. The PBS solutions of different concentration used in some experiments had the same phosphate/NaCl/KCl molar ratio.

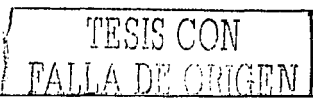
2,4-D, 2,4-DB, and the related compounds (2,4,5-trichlorophenoxyacetic acid (2,4,5-T), 2-(2,4-dichlorophenoxy)propionic acid (2,4-DP), 2,4-dichlorophenol (2,4-DPh), 2,4-D methyl ester (2,4-D ester), 2,4-DB methyl ester (2,4-DB ester), and 2,4,5-T methyl ester (2,4,5-T ester) were purchased from Chem Service (West Chester, PA) or Polyscience (Niles, IL). The acidity constants (pK_a) of the phenoxyalkyl acids are between 2.6 (2,4-D) and 4.8 (2,4-DB). Stock solutions of these compounds (1000 mg/L) were prepared in AcCN. Working solutions (single compounds or mixed compounds) were prepared from the stock solutions in AcCN/water 50:50 (v/v) for HPLC analysis, or in PBS containing 1-10% (v/v) AcCN for the immunooxtraction experiments. The solutions of the esters in PBS were always prepared just before use.

Polyclonal 2,4-D antibodies were purchased from Abken (Ottawa, ON) in the format of 2 mg portions of lyophilized 95% pure IgG fraction. The lyophilized material was stored at -20 °C, and only one 2-mg portion at a time was dissolved in PBS to obtain a protein concentration of 1 mg mL⁻¹ (antibody solution). When not in use, this solution was kept at 4 °C. After a period of not more than 2 months, the remaining antibody solution was discarded and a new one was prepared. Two different lots of polyclonal 2,4-D antibodies were used during this work.

HPLC Analysis. The chromatographic system consisted of a model LC 1150 quaternary pump from Polymer Laboratories (Amherst, MA) equipped with a model 7600 mobile phase degasser from Jones Chromatography (Glannorgan, UK) and a Spectromonitor 3200 (Thermo Separation Products, Riviera Beach, FL) UV detector, set at a wavelength of 230 nm. Chromatograms were recorded and integrated by a Hewlett-Packard (Avondale, PA) 3396 Series II integrator. A 7125 Rheodyne valve with a 100-μL loop was used to inject the standards and the samples (eluates from the SPE experiments) in the analytical column (150 × 4.6 mm i.d.), packed with 5 μm Hypersil ODS (Cheshire, UK). To increase the sensitivity of detection, some SPE eluates containing very low solute amounts were preconcentrated by solvent evaporation under a gentle N₂ stream and reconstituted in 200 μL of mobile phase prior to analysis. Mobile phases were AcCN/water mixtures in different proportions, depending on the compound(s) to be determined. For the phenoxyalkyl acids, the mobile phase was acidified with HClO₄ (pH 1.5 in the aqueous portion). A flow rate of 1 mL min⁻¹ was used throughout.

Preparation of the Sol-Gel Immunosorbent. The sol-gel entrapment of the antibodies was carried out by a

(8) Walters, R. R. *Anal. Chem.* **1985**, *57*, 1099 A.
 (9) Braun, S.; Rappoport, S.; Zusman, R.; Avnir, D.; Ottolenghi, M. *Mater. Lett.* **1990**, *10*, 1.
 (10) Ellerby, L. M.; Nishida, C. R.; Nishida, F.; Yamazaki, S. A.; Dunn, B.; Valentine, J. S.; Zink, J. I. *Sensory* **1992**, *255*, 1113.
 (11) Wang, R.; Narang, U.; Prasad, P. N.; Brigg, F. V. *Anal. Chem.* **1993**, *65*, 2871.
 (12) Wu, S.; Ellerby, L. M.; Cohen, J. S.; Dunn, B.; El-Sayed, M. A.; Valentine, J. S.; Zink, J. I. *Chem. Mater.* **1993**, *5*, 115.
 (13) Liu, D.-M.; Chen, I.-W. *Acta Mater.* **1999**, *47*, 1535.
 (14) Dunn, B.; Miller, J. M.; Dave, B. C.; Valentine, J. S.; Zink, J. I. *Acta Mater.* **1998**, *46*, 737.
 (15) Liu, E. H.; Dave, B. C.; Fukuto, J. M.; Dunn, B.; Zink, J. I.; Valentine, J. S. *J. Mater. Chem.* **1999**, *9*, 45.
 (16) Reetz, M. T.; Zonta, A.; Stropekamp, J.; Rufuska, A.; Tschae, B. *J. Sol-Gel Sci Technol.* **1996**, *7*, 35.
 (17) Gill, I.; Ballessteros, A. *Trends Biotechnol.* **2000**, *18*, 282.
 (18) Valido Tolino, P.; Barrero Moreno, J. M.; Perez-Conde, M. C. *Anal. Chim. Acta* **2001**, *429*, 337.
 (19) Bronshteln, A.; Aharonson, N.; Avnir, D.; Turniansky, A.; Alston, M. *Chem. Mater.* **1997**, *9*, 2632.
 (20) Ichino, M.; Markl, P.; Knopp, D.; Nlessner, R. *Chem. Mater.* **1997**, *9*, 2640.
 (21) Dusoretz, C.; Armon, R.; Starosvetzky, J.; Rothschild, N. *J. Sol-Gel Sci Technol.* **1996**, *7*, 7.
 (22) Hamann, R. *Ketrumin A. Chemmagazin* **1987**, *16*, 527.



procedure in which thorough hydrolysis of the precursor was achieved in the presence of a relatively high acid concentration, but, prior to the addition of the antibody, the excess acid was buffered with a concentrated PBS solution. Briefly, 0.1 mL of 0.1 M aqueous HCl, 0.4 mL of reagent water, and 2.5 mL of TEOS were mixed with stirring. The mixture was sonicated under ice cooling for 30 min and left at ambient temperature until it acquired an elastic consistency. A 2 mL aliquot of 0.2 M PBS was then added to the sol. Immediately followed by addition of antibody solution (300–700 μ L) and vigorous stirring, gelation occurred within 1 min. After 5 min, the gel was superficially rinsed with PBS, thoroughly crushed with a spatula, and transferred to a vacuum filter unit where it was then abundantly washed, first with water and finally with PBS. The Bradford test²³ applied to the liquid fractions collected during the washing gave a negative result, indicating that there was no antibody leakage from the gel. Therefore, it was assumed that all the added IgG was permanently encapsulated in the silica matrix. The amount of gel obtained by this procedure (wet basis) was 3.6 ± 0.2 g ($n = 6$).

The crushed gels (wet hydrogel) suspended in PBS were carefully poured into inverted 3-mL (1 cm i.d.) plastic syringes (Nipro, Miami, FL), using stainless steel frits at both ends of the column to retain the packing. Then, the gel bed was washed with PBS and stored in this buffer at 4 °C until use. To settle down the packing, three or four blank runs consisting of the sequential passage of PBS, water, and AcCN/water 50:50 (v/v) through the cartridges were initially performed. The bed was progressively compacted to about half its initial size, arriving at a final height of 1.1–1.6 cm (bed volume 1.10–1.25 mL).

To test the effect of drying on the immunosorbent performance, some hydrogels (doped with 500 μ g of antibody) that had been previously crushed and washed were transferred to open glass beakers and stored in refrigeration until a weight loss of 50% was achieved (about 2–3 days). The obtained sol-gel glasses (dried gel) were ground in a mortar, and the powder was suspended in PBS to withdraw the finest particles; the particle sizes in the remaining material (measured with an Olympus CE 0849 optical microscope) were between 10 and 25 μ m. Finally, the immunosorbents were packed and stored in refrigeration under buffer. In this case, the packed bed (~1.4 cm, bed volume ~1.10 mL) remained practically constant during the initial blank runs performed in the cartridges and also during their further use.

Scanning electron micrographs (SEM) of the doped gels and a blank (undoped) gel were obtained on a JEOL JSM 5900 LB instrument.

Immunoextraction. To control the nonspecific adsorption of the analytes, preliminary experiments were carried out in a cartridge packed with a dried blank gel. The latter was prepared in exactly the same way as the immunosorbent but without addition of the antibody. Solutions of the different compounds (100 ng) in 10 mL of PBS containing 0–10% (v/v) AcCN were separately percolated through the cartridge; after rinsing with water (2 mL), an AcCN/water 50:50 (v/v) eluent was used to dislodge the eventually retained compounds. From the HPLC analysis of the eluates, the amount of AcCN required in the sample to avoid or limit the adsorption of each compound on the silica support or the cartridge walls was deduced.

The binding of the test solute (2,4-D ester) to sol-gel cartridges doped with anti 2,4-D was studied as a function of several experimental parameters. From the results of this study, the following general procedure was finally adopted for the immunoextraction experiments.

The immunosorbent cartridge (kept in refrigeration) is first equilibrated to room temperature for 1 h and rinsed with 15 mL of fresh PBS. The analyte solution (in PBS with the appropriate AcCN content) is passed through the cartridge, using the syringe plunger to push the solution at a flow rate of ~1 mL min⁻¹. Then, the cartridge is rinsed with 2 mL of

reagent water and eluted with 2 mL of AcCN/water 50:50 (v/v) at the same flow rate as before. The eluate is analyzed by HPLC to determine the amount of bound compound. Finally, the cartridge is rinsed with an extra 4 mL volume of the AcCN/water mixture, 10 mL of water, and 15 mL of PBS. After at least 30 min under buffer, the cartridge is ready for a new SPE experiment.

The immunoextraction procedure was used to determine the capacity of cartridges packed with wet hydrogels doped with 300, 500, and 700 μ g of 2,4-D antibody and dried gels doped with 500 μ g; the test solute for these experiments was 2,4-D ester. The selectivity of the immunosorbent was studied in the dried gel cartridge, 10 mL solutions containing 100 ng of the analyte (the acid herbicides, the esters, or the phenol) were processed in this cartridge according to the established procedure. Finally, some extraction experiments of 2,4-D solutions in various buffers (acetic acid/acetate pH 4.7, formic acid/formate pH 3.8, and perchloric acid pH 1.5) were also carried out in the dried gel.

Stability and Reusability. A cartridge packed with wet hydrogel doped with 300 μ g of antibody was used in numerous SPE experiments. From time to time its capacity was evaluated by processing a 10 mL solution containing 120 ng of 2,4-D ester. Another test was carried out in a cartridge packed with dried gel doped with 500 μ g of antibody. This cartridge was stored in refrigeration for 14 weeks and its capacity was measured several times during this period.

Activity of the Free Antibody. Two solutions, 2,4-D and 2,4-D ester, were used to measure the binding capacity of the antibody in solution. Briefly, 1 mL of PBS/AcCN 99:1 (v/v) containing 60 or 120 ng of the solute and 50 μ L (50 μ g) of the antibody was placed into a Centrifuge Y-30 tube; the mixture was slightly sonicated and then incubated for 15 min at room temperature. At the end of the incubation, the solution with the unbound compound was separated from the solute-antibody complex by centrifugation at 2000g for 16 min. The complex was washed twice with 350 μ L of PBS-AcCN 99:1 (v/v), centrifuging each time at the same speed as before for 7 min. The flow-through was analyzed by HPLC to determine the amount of unbound compound.

Results and Discussion

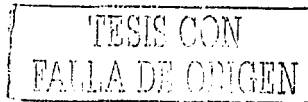
Sol-Gel Immunosorbent. In accordance with some reported techniques,^{18,21} the first doped gels were dried by different methods (vacuum, lyophilization, and air-dry at room temperature, or in refrigeration) until constant weight was achieved. The results were disappointing, as neither the target antigen 2,4-D, nor the closely related compound 2,4-D ester, were retained to any extent in these gels. Considering the good results reported by Bronshtein et al.¹⁹ using a nondried anti-atrazine gel, a freshly prepared wet gel doped with 300 μ g of 2,4-D antibody was crushed and packed, keeping it under buffer at all times. The successful extraction of 2,4-D ester indicated the persistence of the antibody activity in the gel. As will be discussed later, the lack of retention of 2,4-D was not due to activity loss during the encapsulation of the antibody but was a problem of the antibody itself. Therefore, 2,4-D ester was used as the "antigen" to evaluate the obtained gels and to optimize the immunoextraction conditions.

The wet hydrogels doped with different antibody amounts presented interesting retention properties and higher binding capacities than other (dry or wet) sol-gel immunosorbents previously reported.^{19,24,25} However,

(24) Turiansky, A.; Avnir, D.; Bronshtein, A.; Aharonson, N.; Altstein, M. *J. Sol-Gel Sci. Technol.* 1996, 7, 137.

(25) Chelma, M.; Knopp, D.; Niessner, R. *Anal. Chim. Acta* 1997, 339, 241.

(23) Bradford M. M. *Anal. Biochem.* 1976, 72, 248.



an important drawback of these gels was the progressive decrease of the bed permeability at each SPE experiment. The latter provoked a high pressure drop and rendered the cartridge operationally useless after some adsorption-desorption cycles. This effect was small for gels containing the lowest antibody amount (300 μg), which could be reused in more than 50 cycles, but became critical at higher antibody density. To understand the origin of this phenomenon, a cartridge was packed with a crushed blank hydrogel and was submitted to the same solvent changes as in the SPE experiments. In this case, the packed bed also suffered an initial compaction (the same as the doped hydrogels) but the permeability of the cartridge did not change thereafter, even after multiple assay cycles. Therefore, the permeability loss in the doped gel cartridges is effectively related to the presence and concentration of the antibody, although its exact cause could not be discerned.

Finally, a more delicate drying of the gels was tried, which was stopped when a weight loss of 50% was achieved. In these conditions the material could be easily ground in a mortar without agglomeration of the gel particles, and the antibody activity was not lost. During the slow drying of the material, the liquid phase (aqueous buffer) was progressively expelled from the pores, leading to consolidation of the aggregates and densification of the solid part of the gel but apparently maintaining a highly porous three dimensional network. Indeed, compared to the wet hydrogels containing the same antibody amount, the dried gels were fairly superior: the binding capacity of the encapsulated antibodies was still higher and the permeability of the cartridges remained constant during their use in multiple SPE experiments. It has been mentioned that the way the gelation is conducted is crucial to the final properties of the dried solid. For example, the formation of large micelles in the first stage of the sol-gel process, combined with a high degree of interconnection during their progressive aggregation, conduct to highly porous silica xerogels. The micelle size increases with longer hydrolysis times, whereas the type of aggregation depends on the relative importance of the hydrolysis and condensation reactions.²⁵⁻²⁷ It is known that acid media promote rapid hydrolysis and slow condensation, but basic or neutral conditions accelerate the condensation reactions; in addition, it has been well established that the latter continue to occur long past the gelation point.¹⁵⁻²⁸ Even in an apparently dry sol-gel, evolution of the dopant microenvironment has been observed over a time period of one month.²⁷ In our sol-gel procedure, the low pH of the initial mixture and the relatively long hydrolysis time probably produced large elementary particles that very slowly condensed to form branched aggregates. Upon addition of PBS followed by the antibody solution, also in PBS, condensation was greatly accelerated, and gelation rapidly occurred. However, further evolution of the gels maintained under buffer and those slowly dried in refrigeration led to different properties and behavior for each gel type.

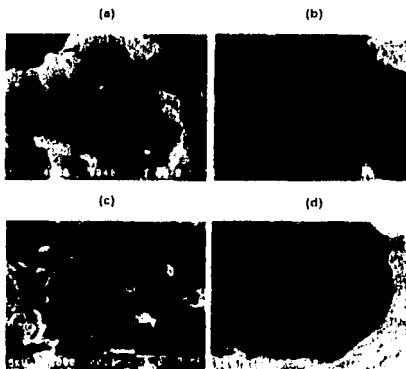


Figure 1. Scanning electron micrographs of silica gels derived from TEOS: (a) wet hydrogel doped with 500 μg of anti 2,4 D that was previously used in several immunoelectroextraction experiments (4800 fold magnification), (b) freshly prepared dried gel doped with 500 μg of anti 2,4 D (4800 fold magnification), (c) freshly prepared dried blank gel (16,000 fold magnification), (d) focusing of one pore in the freshly prepared dried gel doped with 500 μg of antibody (16,000 fold magnification). All the gels were thoroughly vacuum dried before the SEM study. The scale bar in the figure panels represents 1 μm .

Figure 1 shows the reproduction of the SEM images obtained from a wet hydrogel that was previously used in several SPE experiments doped with 500 μg of antibody (Figure 1a), and two freshly prepared dried gels, one was doped with 500 μg of antibody (Figure 1b and d) and the other was a blank gel (Figure 1c). The used hydrogel (recovered from a cartridge with a high pressure drop) was first slowly dried in refrigeration (to ~50% weight loss) and ground to a fine powder; then, the three gels were thoroughly vacuum-dried in closed vessels for 2 days at ambient temperature. Although this treatment could have altered the porosity of the materials, a reduction of their volume during the vacuum drying was not perceived. For comparison purposes, it is important to keep in mind that all the gels were prepared using the same procedure, and prior to the SEM study were submitted to identical drying conditions. Figure 1 panels c and d (same magnification) clearly show the astonishing difference in pore size between the antibody doped and undoped glasses. The surface of the latter presents multiple nanopores with maximal diameter of about 200-400 nm, whereas the former is characterized by much larger cavities with external diameters of 3-5 μm . Indeed, if the antibody was trapped inside those wide pores it is really surprising that leakage did not occur. This reinforces some hypotheses^{17,28} about the existence of interactions and/or interpenetration of some parts of the guest biomolecule and the silica matrix; probably, the antibody is not so free inside the pore. On the other hand, there is no remarkable difference between the used hydrogel and the freshly prepared dried gel (Figure 1a-b), indicating that the repeated SPE experiments performed in the former did not affect the apparent structure. Thus, the

(26) Lecloux, A. J.; Pinard, J. P. *J. Non-Cryst. Solids* **1998**, *229*, 116.
 (27) Durban, R. A.; Jordan, J. D.; Bogha, L. V. *Anal. Chem.* **1986**, *58*, 2671.
 (28) Dunn, B.; Zink, J. I. *Chem. Mater.* **1997**, *9*, 2280.



Table 1. Required Acetonitrile Content in the Aqueous Samples to Avoid Non-Specific Adsorption of the Compounds in a Blank Sol-Gel Cartridge^a

compound	retained amount with plain aqueous samples (ng)	acetonitrile required for no retention (%)
2,4-D	n.d. ^b	0
2,4-DB	25	7
2,4,5-T	10	1
2,4-DP	7	1
2,4-DPh	n.d. ^b	0
2,4-D ester	8	1
2,4-DB ester	60	>10 ^c
2,4,5-T ester	50	10

^a 10-mL Samples with 100 ng of solute were loaded in the cartridge. ^b n.d., Compound not detected in the eluting solvent. ^c With this acetonitrile content in the sample, the solute peak in the chromatogram of the eluate corresponded to 10 ng.

permeability loss in the wet hydrogel cartridges cannot be ascribed to structural changes of the silica matrix.

Optimization of the Immunoextraction Conditions. Table 1 shows the results obtained from the preliminary experiments carried out in a blank gel cartridge. It is observed that all the analytes, with the exception of 2,4-D and 2,4-DPh, were retained to some extent in the cartridge when the applied samples were plainly aqueous. The AcCN amount required in the different analyte solutions to avoid their nonspecific adsorption was highly dependent on the compound hydrophobicity, indicating that a reverse phase mechanism was responsible for this adsorption. The most hydrophobic compound, 2,4-DB ester, was still slightly retained (about 10% of the loaded amount) with the highest acetonitrile content assayed in these experiments. To discern between adsorption on the cartridge walls or on the silica support, a simulated extraction of each analyte (in PBS with 1% of AcCN) was performed in an empty syringe with only the two frits inside. The absence of solute peaks in the analyzed eluates demonstrated that the cartridge material did not adsorb any of the compounds in these conditions. Therefore, non-specific adsorption was mainly due to the silica matrix.

To establish the immunoextraction protocol, the optimal elution conditions were first determined. A 300- μ g anti-2,4-D cartridge was loaded with a fixed excess of 2,4-D ester (120 ng in PBS with 1% of AcCN) and eluted with different AcCN/water mixtures. Figure 2a shows that the maximal amount of recovered compound was reached with 2 mL of an eluent containing 50% (v/v) AcCN. Higher acetonitrile contents did not increase the solute recovery, and on the contrary may increase the risk of antibody damage. During these experiments, it was observed that a water rinsing of the cartridge was absolutely necessary before the elution step. This was because of the PBS that remained in the interstitial volume of the packing after loading the sample; in the presence of rich acetonitrile mixtures, the phosphate salts form a very fine precipitate that may provoke frit-clogging problems, and also undesirable perturbations in the chromatogram when the eluate is injected in the HPLC system. It was verified that the solute recovery was not affected by water rinsing volumes of up to 5 mL, but a 2-mL rinsing was enough to avoid all the mentioned problems.

The ionic strength and the pH of the sample are important parameters that commonly affect the perfor-

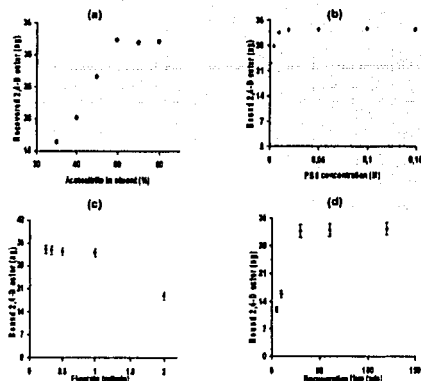


Figure 2. Optimization of immunoextraction conditions in a cartridge packed with wet hydrogel containing 300 μ g of anti-2,4-D. Panel (a) amount of recovered 2,4-D methyl ester as a function of the AcCN content in the eluting solvent. Panels (b-d) effect of other experimental parameters on the solute binding: (b) PBS concentration in the applied sample, (c) flow rate used during the percolation of the sample, and (d) recuperation time between consecutive immunoextraction experiments. 10-mL Samples containing 120 ng of the ester in 0.02 M PBS (variable in b) with 1% (v/v) of AcCN were loaded in the cartridge at a flow rate of 1 mL min^{-1} (variable in c). Elution was performed with 2 mL of 50% (v/v) AcCN in water (variable in a). The recuperation time between experiments was at least 1 h (in d).

mance of immunosorbents. Therefore, the extraction of 2,4-D ester from PBS (pH 7.2) at different concentrations (0.005–0.15 M) and from other buffers at different pH levels (1.5, 3.8, and 4.7) was studied. Maximal solute binding was obtained with samples containing PBS at concentrations 0.01–0.15 M (Figure 2b), which approximately correspond to a range of 0.097–1.45 M in ionic strength. This result is not surprising considering that the natural media for antibodies (i.e., biological fluids) have a pH close to neutrality and a relatively high saline concentration of about 0.1–0.15 M. Indeed, a null 2,4-D ester recovery was observed in the experiments with acid buffers, probably because in this particular case the pH of the solution affects not only the solute-antibody interaction but also the solute stability. As the pH decreases, the ester hydrolysis is accelerated.

Loading of the sample in the cartridge (300 μ g of antibody, wet hydrogel) was carried out at different flow rates, and the effect of this variable on the amount of bound 2,4-D ester was determined. Figure 2c shows that maximal binding is obtained at flow rates lower than 2 mL min^{-1} (<1.8 bed vols min^{-1}). From these results, it is evident that the solute-antibody complex is not instantaneously formed. Considering the enormous pores in the doped gels (Figure 1), it is tempting to conclude that the rate-controlling factor is not solute diffusion but the complexing reaction itself. Complicated phenomena, including position or conformational local changes occur as the antigen or the substrate an-

proaches the active site of an antibody or an enzyme, respectively. Although there are many cases where protein-ligand binding in solution is extremely fast, the same is probably not true for an entrapped biomolecule because the matrix can more or less hinder its reorientational motion. Shabat et al.²⁹ studied the kinetics of hydrolysis of some esters catalyzed by antibodies encapsulated in a silica hydrogel; from the obtained results they concluded that the diffusion rates of substrates and products within the gel matrix did not inhibit the catalytic reaction to any significant extent. However, it has also been pointed out³⁰ that the presence of small pores or bottlenecks even in large pores can reduce the diffusion coefficients of solutes in the interior of a silica matrix. Additionally, solute partitioning between the support and the bulk solution may also contribute to decreasing the rate of transport of species to the encapsulated biomolecule. Whether the observed flow rate effect on the binding of 2,4-D ester is mostly due to matrix restricting conformational transitions near the active site of the antibody, or to the solute diffusion rate through the porous network, cannot be resolved with the current data. Nevertheless, from a practical point of view, a flow rate of $0.5\text{--}1\text{ mL min}^{-1}$ ($0.45\text{--}0.90$ bed vols min^{-1}), where the binding of 2,4-D ester is maximal, is sufficiently good for immunoadsorption purposes.

Finally, using the previously found optimal conditions, a series of adsorption-desorption cycles was carried out in the same cartridge. At the end of each cycle, the cartridge was left in PBS for some variable time (recuperation time). Figure 2d shows the dependence of the extracted 2,4-D ester amount on the recuperation time. For maximal binding, the cartridge must be left under buffer for 30 min or more between consecutive cycles. This kinetical effect is undoubtedly related to the conditions used during the elution step and the phenomena occurring at that moment. The rich acetonitrile mixture probably induces a profound conformational change in the entrapped biomolecule, resulting in the dissociation of the solute-antibody complex. After washing the cartridge with water (10 mL) and PBS (15 mL) to dislodge the organic solvent from the void volume of the support, the antibody still needs a relatively long time in the favorable PBS environment to recover its original (active) conformation.

Conformational changes in sol-gel entrapped biomolecules have been reported in some works.^{11,13,15} These studies are based on the comparison of optical properties (absorbance and fluorescence spectra) between the encapsulated and the native proteins. Variations in the intensity of the optical response and/or wavelength shifts are indicative of the extent of conformational change or denaturation due to, for example, the presence of organic solvent in the pores of doped gels or resulting from the aging/drying of the biomaterial. Drastic drying conditions led to irreversible denaturation as shown by Wang et al.¹¹ by comparing the fluorescence spectra of sol-gels doped with fluorescein alone and with the fluorescein-antifluorescein complex. On the contrary, reversible conformational changes of

(29) Shabat, D.; Grivysjan, I.; Sapich, S.; Turiansky, A.; Avnir, D.; Keinan, E. *Chem Mater* 1997, 9, 2258.
(30) Bhunia, R. B.; Brinker, C. J.; Gupta, A. K.; Singh, A. K. *Chem Mater* 2000, 12, 2434.

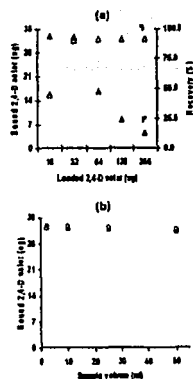


Figure 3. Binding capacity of a sol-gel cartridge (300 μg of anti 2,4-D, wet hydrogel). The cartridge was loaded (flow rate 1 mL min^{-1} ; recuperation time at least 1 h) with (a) 10-mL sample volumes containing different 2,4-D ester amounts: (Δ) bound analyte (ng), (\blacktriangle) % recovery; (b) different sample volumes containing a fixed dose (120 ng) of 2,4-D ester: (O) alone, (\blacksquare) in the presence of 2,4-D and 2,4-DPh (120 ng each).

the entrapped cytochrome *c* have been well established by Dumri et al.¹⁴ Of special relevance to our own work is their observation of the partial denaturation of the protein after soaking the gel in pure methanol, which was indicated by the wavelength shift of the heme *soret* band in the absorption spectrum; however, when the same gel was immersed in buffer for 48 h, the recovered spectrum was identical to that of the native protein. The authors suggested that the confinement of cytochrome *c* within the silica matrix constrained its mobility so that aggregation in alcohol was prevented, yet the molecule remained sensitive to changes in the local environment. Accordingly, the previously described behavior of the encapsulated 2,4-D antibody indicates that this molecule can also switch between different conformations without permanently losing its activity.

Binding Capacity of the Encapsulated Antibodies. The extraction of 10-mL solutions of 2,4-D ester at different concentrations was performed in a cartridge packed with wet hydrogel (300 μg of antibody). Figure 3a shows the variation of the extracted compound amount (expressed as bound 2,4-D ester and as % recovery) as a function of the total loaded amount. A break point is observed in the curves. Before this point, the analyte binding increases linearly with the loaded amount and all the applied ester is extracted (100% recovery); afterward, the amount of retained compound remains constant, at about 32 ng, which means that the excess solute breaks through from the cartridge during the loading step.

Breakthrough can be due to elution of the compound (weak retention) or to saturation of the immunosorbent (limited adsorption sites). To determine which effect was responsible for the observed behavior, the binding of 2,4-D ester was studied as a function of the sample volume applied to the cartridge. First, the immunoad-

Table 2. Immunoextraction of a Fixed Dose (120 ng) of 2,4-D Ester in Sol-Gel Cartridges Doped with Different Anti 2,4-D Amounts

antibody amount (μ g)	IgG lot ^a	gel type	extracted		binding capacity (ng/mg) ^b
			n	solute (ng)	
300	1	wet hydrogel	9	31.4	1.4
500	1	wet hydrogel	9	46.7	2.8
500	2	wet hydrogel	5	47.0	2.9
700	1	wet hydrogel	9	58.8	1.8
500	2	dried gel	5	62.9	1.1
500	2	dried gel	5	65.2	1.4

^a Two different lots of immunoglobulin (IgG) were used. ^b Binding capacity of the entrapped antibody expressed as ng of extracted solute per mg of entrapped antibody (commercially purchased IgG)

traction of samples containing 120 ng of the ester in volumes varying from 5 to 50 mL was carried out. In a second study, the same experiment was repeated but the samples also contained 120 ng of 2,4-D and 2,4-DPh. From the results shown in Figure 3b, it can be deduced that the immunosorbent strongly retains a certain ester amount (~32 ng) by interaction with the active antibody sites and not by other nonspecific interactions (i.e., hydrophobic), because neither the higher sample volumes, nor the presence of possible competitors provoked a decrease in the amount of bound compound. However, the number of available (active) adsorption sites in the gel limits the cartridge capacity.

Increasing the amount of encapsulated antibody can, in principle, increase the cartridge capacity. Therefore, a new set of experiments was carried out in cartridges with different antibody contents. Four cartridges packed with wet hydrogels and two others packed with dried gels were loaded with 10 mL of a 12 ng mL⁻¹ 2,4-D ester solution. Several replicates were performed in each cartridge. The amount of extracted solute and the corresponding relative standard deviation (RSD) are presented in Table 2. Considering first the results from the wet hydrogels; it is observed that, as expected, the amount of bound solute increases with the amount of entrapped antibody. The calculated RSD, lower than 3%, demonstrates the excellent repeatability obtained with the optimized immunoextraction procedure and also gives an indication of the good immunosorbent stability. It is also interesting to note the similarity of results obtained with the two gels doped with antibody (500 μ g) from different lots; apparently, the purchased IgG had the same or similar activity in the two lots. This fact is extremely important for the future development and more widespread use of immunosorbents and immunoextraction protocols, which require ensuring the availability of reproducible antibodies. On the other hand, the last column in Table 2 shows the normalized binding capacity of the encapsulated antibody in each cartridge. This parameter decreases as the concentration of IgG in the gel increases. A similar effect was observed by Pulido Tofiño et al.¹⁸ in (dried) gels doped with isoproterenol antibody. As proposed in that work, the decrease of the binding capacity with the antibody density could be due to reduced solute accessibility to the active sites (or to other perturbations of the solute-antibody interaction) provoked by the nearest neighbor protein molecules in the gel. Therefore, the preparation of immunosorbents with high antibody load is not cost-effective, and the question of how much capacity is

Table 3. Immunoextraction of Phenoxyalkyl Methyl Esters in a Sol-Gel Cartridge Doped with 500 μ g of Anti 2,4-D^a

compound	total retained amount (ng)	specific retention (ng) ^b
2,4-D ester	63	63
2,4,5-T ester	20	20
2,4-DB ester	45	35

^a 100 ng of the compound in 10 mL of 0.02 M PBS containing 1% (2,4-D ester) or 10% (2,4,5-T ester and 2,4-DB ester) of acetonitrile were loaded in the cartridge. ^b Specific retention = total retention - retention in a blank cartridge under the same conditions

really needed in the SPE cartridge should be carefully analyzed.

Concerning the experiments carried out in the dried gel cartridges; unexpectedly it was found that the extracted solute amount was about 30% higher than in equivalent wet hydrogel cartridges (Table 2). Indeed, the normalized binding capacity of the antibody was the highest one, even higher than that of the wet hydrogel with the lowest antibody density. The reason for this is not clear because the external appearance and porosity of dried and nondried gels are practically identical (Figure 1). It could be possible that a certain evolution of the internal pore structure occurred during the slow drying of the gel which favored the positioning of some antibody molecules rendering their active site more accessible. Alternatively, this evolution could have created well-separated cages for the entrapped molecules, thus reducing harmful perturbations between neighbors during the solute binding.

Finally, comparison of the results obtained in equivalent cartridges (the two dried gels or the two wet hydrogels with 500 μ g of antibody each) proves that the immunosorbents prepared by the optimized sol-gel technique proposed in this work are fairly reproducible.

Specificity of the Immunosorbent. A cartridge packed with dried gel (500 μ g of antibody) was used to test the binding of four phenoxyalkyl acids (2,4-D, 2,4-DB, 2,4,5-T, and 2,4-DPh), three phenoxyalkyl methyl esters (2,4-D ester, 2,4-DB ester, and 2,4,5-T ester) and a structurally related phenol (2,4-DPh). Each solute dissolved in PBS with the appropriate AcCN content was individually tested. Analysis of the eluates, and in some cases of the flow through loading solution, demonstrated that the phenoxy acids and the phenol were not retained at all. Only 2,4-D ester was significantly bound to the antibody and although the two other esters were also extracted, their specific binding was much lower, as shown in Table 3. It is possible that the higher AcCN content in the percolated samples of these esters provoked a weaker binding to the antibody; however, in the absence of organic solvent these hydrophobic esters are excessively adsorbed in a nonspecific manner to the silica matrix (Table 1). Cicina et al.²⁰ used a surfactant to decrease the nonspecific adsorption of polyaromatic hydrocarbons in an anti-pyrene sol-gel cartridge; by adjusting the surfactant concentration, they arrived at a compromise between the extent of specific binding and the extent of hydrophobic adsorption.

The null retention of the target antigen 2,4-D was surprising; therefore, additional extraction experiments were carried out with more acidic solutions of this

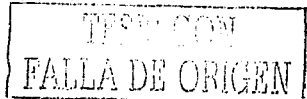


Table 4. Binding of 2,4-D and 2,4-D Methyl Ester to a Fixed Dose of Free Antibody

compound	added amount (ng)	complexed amount (ng)	binding capacity (ng/mg) ^a
2,4-D	60	0	0
2,4-D	120	0	0
2,4-D ester	60	15	300
2,4-D ester	120	15.2	304

^ang of complexed solute per mg of antibody. 50 µg of the purchased IgG fraction and the indicated solute in 1 mL of 0.02 M PBS containing 1% (v/v) of acetonitrile were incubated at room temperature for 15 min in Centricon tubes. The solution was separated from the solute-antibody complex by centrifugation and the unbound compound was determined in the flowthrough by HPLC.

analyte (pH 4.7, 3.8, and 1.5) but the initial result was confirmed: the entrapped antibody did not recognize 2,4-D. To know whether the encapsulation of the antibody or the antibody itself were responsible for the nonretention of the nominal antigen, the binding of 2,4-D and 2,4-D ester to the free antibody (in solution) was studied. A small amount of acetonitrile (1%, v/v) was added to the PBS solution to prevent adsorption of the studied solutes on the walls or the membrane of the Centricon tubes. The results presented in Table 4 confirm that there is absolutely no binding of the acid herbicide to the antibody. It must be remarked that in the conditions used for these experiments (pH 7.2), 2,4-D was totally ionized (pK_a ≈ 2.6). As the antibodies were commercially obtained, it was not possible to know how they were produced, but from the observed behavior it can be speculated that the hapten was conjugated to the carrier protein by its carboxylic moiety. In that case, the antibodies generated by the immunized animal would not be capable of recognizing an ionized antigen. Indeed, the good complexation of the 2,4-D methyl ester supports the hypothesis of an antibody raised against a non ionized and esterified 2,4-D molecule.

Comparison of the experimentally determined activities for the native protein (~302 ng of bound 2,4-D ester per mg of IgG; Table 4) and the dried sol-gel doped with 500 µg of IgG (~128 ng of bound ester per mg of IgG; Table 2) leads to the conclusion that an activity loss of about 58% occurred upon encapsulation. This indicates that the hindrance of some active sites and/or the permanent denaturation of some antibody molecules could not be avoided during the sol-gel process. However, the remaining antibody activity still is quite interesting for the preparation of selective and reusable immunoextraction cartridges with application to the analysis of trace compounds in aqueous matrices.

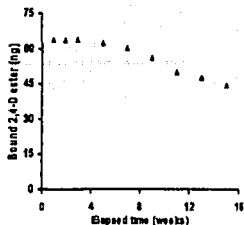


Figure 4. Stability of the immunosorbent. Modification of the binding capacity of a sol-gel cartridge (500 µg of anti 2,4-D, dried gel) during a 14 week period. Sample volume 10 mL, flow rate 1 mL min⁻¹, loaded 2,4-D ester 120 ng.

Stability and Reusability of the Immunosorbent.

Most of the optimization and characterization work previously described was carried out in the same cartridge (wet hydrogel) which was thus used in about 50-60 SPE experiments. Finally, it was discarded because the excessive pressure drop rendered it impossible to percolate samples at reasonable flow rates. However, until the last use, the encapsulated antibody was still capable of binding the same amount of 2,4-D ester. Another cartridge packed with dried gel was kept in refrigeration under buffer for several weeks in order to test the long-term stability of the encapsulated antibodies. Figure 4 shows the evolution of the cartridge capacity. For at least 8 weeks, the entrapped antibody retained more than 90% of its initial activity and after 14 weeks the remaining activity still was about 47% of the initial one.

These results confirm the good stability of sensitive biomolecules encapsulated in sol-gel matrices, which has been previously observed and reported for some enzymes and other antibodies. But, from a practical point of view, the most interesting fact is the excellent reusability of the biomaterial. Although it was subjected to continuous regeneration-loading-elution cycles, implicating drastic changes and harsh environments, the entrapped antibody maintained the same activity during the repeated uses of the cartridge.

Acknowledgment. Financial support for this work was provided by grants from Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología de México (project 34827-E).

CM020715W

