



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Facultad de Química

Preparación de inmunoabsorbentes sol-gel a partir de  
diferentes anticuerpos monoclonales anti-carbofurano y su  
evaluación por cromatografía de líquidos.

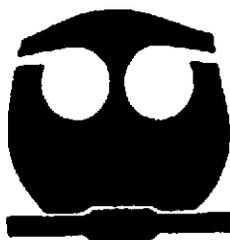
**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

**Q U I M I C O**

P R E S E N T A :

**GUSTAVO ADOLFO ZELADA GUILLÉN**



EXAMENES PROFESIONALES  
FACULTAD DE QUÍMICA

MÉXICO, D.F.

2005

m 351966



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**

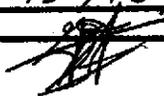
Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

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.

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.

NOMBRE: Gustavo Adolfo Zerada Guillén

FECHA: 15/12/2005

FIRMA: 

Jurado asignado:

Presidente: Profa. Luz Elena Vera Ávila  
Vocal: Prof. Francisco Rojo Callejas  
Secretario: Prof. Adolfo García Osuna  
1er. Suplente: Profa. María del Rosario Covarrubias Herrera  
2do. Suplente: Profa. Araceli Patricia Peña Álvarez

Sitio donde se desarrolló el tema:

Laboratorio 115, Departamento de Química Analítica, División de Estudios de Posgrado, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México.

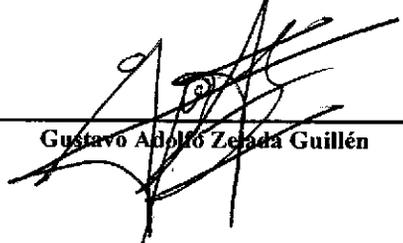
Asesor del tema:

  
Dra. Luz Elena Vera Ávila

Supervisor Técnico:

  
M. en C. María del Rosario Covarrubias Herrera

Sustentante:

  
Gustavo Adolfo Zerada Guillén

## **Agradecimientos y dedicatorias**

A la UNAM, por haberme brindado el Orgullo Universitario necesario para sacar adelante a este país.

A la Facultad de Química, que me permitió ser parte de su comunidad académica durante el periodo más productivo de mi carrera.

A todos los profesores de la Facultad de Química que lograron sembrar en mí parte de su visión del mundo.

A la Dra. Luz Elena, por la excelente dirección de tesis recibida a lo largo de todo este tiempo, y por haber sido quien inició mi gusto por la Química Analítica.

A la Mtra. Rosario, por brindarme todo su apoyo durante mi estancia en el Laboratorio y por sus atinados consejos y observaciones hechas en la escritura de este trabajo.

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

A la Mtra. Carmen Sansón y el Dr. Queré por haberme dado asilo en el Servicio Social y por todos los consejos dados y el conocimiento transmitido en ese periodo.

Al Comité de las Becas de Alimentos de la Facultad de Química, por haberme brindado su apoyo durante los 9 semestres de la carrera.

Al Programa de Alta Exigencia Académica por la beca otorgada durante mis años de estudio.

A Bob y todas aquellas personas involucradas en su proyecto de ayuda económica, por el corto, pero útil apoyo recibido a principios de la carrera.

A mis Padres, por el increíble apoyo recibido en todos los sentidos para culminar esta etapa de mi vida, así como también a mis hermanos, por brindarme su cariño incondicional.

A mis Tíos Nelson, Jaime, Ovidio, Edgardo y a mis Abuelos Lupe y Carlos, por su total apoyo a lo largo de la carrera y sobre todo, en la etapa final de la realización de este trabajo.

A mi Tía Carmen, por acogerme en su hogar durante mis primeros pasos en la Universidad.

A mi Padrino, por ser mi guía y apoyarme, aun en nuestros breves encuentros.

A México, por haberme recibido con los brazos abiertos en tiempos difíciles.

A la Dirección Adjunta de la Investigación Científica del CONACYT, por el apoyo financiero concedido a través del Proyecto 46558: *Desarrollo de nuevos materiales con sitios de reconocimiento específico para la separación de compuestos de interés ambiental o farmacéutico de matrices complejas.*

A Martha, por haber hecho tan excelente equipo en la carrera, por los logros obtenidos gracias a ello y por su apoyo y consejos en todos los aspectos.

A Angélica y Landy, por ser mis grandes amigas y por hacerme sonreír en los momentos tristes.

Al Dr. Eduardo Medina, por ser un gran amigo como pocos.

A la Dra. Erika Martín, por el apoyo brindado en la edificación de mi patrimonio.

A toda la banda de la Tepetlapa por las prolongadas disertaciones nocturnas en el comedor que hicieron mi estancia tan amena.

A Yurita López, Sergio Gil, Paola Campos y Alfredo Meoño, por las excelentes personas que son y por la amistad de años, pese a las distancias.

Al C.P. Chamé, en honor a todos los años de conocernos.

A Diana Pérez Trejo, y Juan Carlos por haber favorecido en mi decisión de estudiar en la UNAM.

A los buenos colegas del Laboratorio I15, por todos los consejos y ratos amenos que vivimos ahí dentro.

A todos aquellos que de alguna forma me ayudaron para completar esta etapa de mi vida.

**Los resultados de este trabajo fueron presentados en:**

XXXIX Congreso Mexicano de Química, Mérida, Yucatán, 2004.

XIX Congreso Nacional de Química Analítica, Guadalajara, Jalisco, 2005.

## Contenido

Contenido	i
Índice de figuras	iv
Índice de tablas	vi
Abreviaturas usadas	viii
Introducción	1
Capítulo 1. Generalidades	3
1.1 Pesticidas	3
1.1.1 Carbofurano	4
1.1.2 Problemática ecológico-social	5
1.1.3 Métodos de determinación de carbofurano	6
1.2 Extracción en fase sólida	7
1.2.1 Generalidades	7
1.2.2 Cromatografía de Afinidad	10
1.2.2.1 Polímeros impresos molecularmente	12
1.2.2.2 Inmunoadsorbentes	13
1.3 Técnica sol-gel	15
1.3.1 Conceptos básicos	15
1.3.2 Hidrólisis y condensación	16
1.3.3 Gelificación	16
1.3.4 Maduración y secado	17
1.4 Anticuerpos	18
1.4.1 Generalidades sobre los anticuerpos	18
1.4.2 Preparación de anticuerpos monoclonales	21
1.4.3 Anticuerpos monoclonales anti-carbofurano	23
1.5 Hipótesis y objetivos	24
Capítulo 2. Desarrollo experimental	26
2.1 Material y equipo	26
2.2 Disoluciones, reactivos y disolventes	30
2.3 Metodología	31
2.3.1 Condiciones cromatográficas	31
2.3.1.1 Detección	31
2.3.1.2 Elución	32



	<b>Contenido</b>
2.3.2 Validación del método	32
2.3.2.1 Incertidumbre en la determinación cromatográfica	33
2.3.2.2 Incertidumbre en el método	33
2.3.3 Actividad nativa de los anticuerpos	33
2.3.4 Preparación de los inmunoadsorbentes	34
2.3.5 Proceso de extracción en fase sólida	35
2.3.5.1 Inmunoextracción	36
2.3.5.2 Preconcentración en precolumnas	38
2.3.5.3 Estudio de retención no específica	38
<b>Capítulo 3. Resultados y discusión</b>	<b>39</b>
<b>3.1 Condiciones cromatográficas</b>	<b>39</b>
3.1.1 Detección	39
3.1.2 Elución	40
<b>3.2 Validación del método</b>	<b>41</b>
3.2.1 Incertidumbre en la determinación cromatográfica	42
3.2.2 Incertidumbre en el método	47
<b>3.3 Actividad nativa de los anticuerpos y preparación de los inmunoadsorbentes</b>	<b>53</b>
<b>3.4 Evaluación de los inmunoadsorbentes</b>	<b>56</b>
3.4.1 Estudio de retención no específica	56
3.4.2 Estudio de las condiciones de elución	56
3.4.3 Efecto del tiempo y el uso sobre la capacidad de retención de los inmunoadsorbentes	59
3.4.4 Inmunoadsorbente BFNB-52	62
3.4.4.1 Efecto de la velocidad de flujo en la etapa de carga	62
3.4.4.2 Efecto de la masa de analito y del volumen de carga	63
3.4.4.3 Isotermas de adsorción y estado de equilibrio	64
3.4.4.4 Interpretación de resultados para el <i>IS</i> dopado con el <i>MAb</i> BFNB-52.	67
3.4.5 Inmunoadsorbente BFNB-67	68
3.4.5.1 Efecto del flujo de carga	68
3.4.5.2 Efecto de la masa de analito en la carga	69
3.4.5.3 Efecto del volumen de carga	70
3.4.6 Inmunoadsorbente BFNB-62	71
3.4.6.1 Efecto de la velocidad de flujo durante la carga	71
3.4.6.2 Efecto de la masa de analito y el volumen de carga	71
3.4.7 Inmunoadsorbente BFNP-21	73
<b>Conclusiones</b>	<b>75</b>



---

	<b>Contenido</b>
<b>Anexo</b>	<b>77</b>
<b>A. Listado de ecuaciones estadísticas</b>	<b>77</b>
<b>B. Listado de ecuaciones cromatográficas</b>	<b>80</b>
<b>C. Cromatogramas</b>	<b>81</b>
<b>Referencias bibliográficas</b>	<b>89</b>



## Índice de figuras

<i>Figura 1.1</i>	Algunos compuestos de la familia de los N-metilcarbamatos con sus respectivos nombres comunes.	4
<i>Figura 1.2</i>	Mapa de los distintos usos de suelo en México.	5
<i>Figura 1.3</i>	Pasos de la extracción en fase sólida.	8
<i>Figura 1.4</i>	Curvas de análisis frontal.	9
<i>Figura 1.5</i>	Polímero impreso molecularmente.	13
<i>Figura 1.6</i>	Diferentes formas de inmovilizar anticuerpos.	14
<i>Figura 1.7</i>	Etapas de hidrólisis y condensación en sol-gel para un precursor tetraalcoxilano.	16
<i>Figura 1.8</i>	Etapas del proceso sol-gel.	17
<i>Figura 1.9</i>	Representación esquemática de un anticuerpo.	18
<i>Figura 1.10</i>	Interacciones posibles entre los aminoácidos del sitio de unión en el anticuerpo y tres moléculas distintas.	20
<i>Figura 1.11</i>	Diagrama simplificado del proceso de generación de anticuerpos dentro de un organismo.	21
<i>Figura 1.12</i>	Etapas en la preparación de anticuerpos monoclonales.	22
<i>Figura 1.13</i>	Preparación de los haptenos utilizados con mejores resultados en la producción de <i>MAbs</i> .	23
<i>Figura 1.14</i>	Haptenos utilizados con mejores resultados en la producción de <i>MAbs</i> e inmunógeno inyectado al animal productor.	24
<i>Figura 2.1</i>	Diagrama del sistema cromatográfico.	27
<i>Figura 2.2</i>	Columna analítica y precolumna utilizadas.	28
<i>Figura 2.3</i>	Diagrama de sección de registro de resultados y sistema eléctrico.	29
<i>Figura 2.4</i>	Bombas empleadas.	29
<i>Figura 2.5</i>	Optimización de condiciones cromatográficas.	32
<i>Figura 2.6</i>	Proceso de encapsulamiento sol-gel aplicado a anticuerpos monoclonales.	35
<i>Figura 2.7</i>	Esquema simplificado del proceso de extracción en fase sólida mediante el uso de los inmunoabsorbentes preparados.	36
<i>Figura 2.8</i>	Esquematación del sistema completo para llevar a cabo ensayos de inmunoextracción.	37
<i>Figura 2.9</i>	Esquematación del sistema para preconcentrar las disoluciones en las precolumnas.	38
<i>Figura 3.1</i>	Optimización de condiciones cromatográficas.	39



<i>Figura 3.2</i>	Gráfico de área de pico en función de la masa de carbofurano estándar inyectada.	44
<i>Figura 3.3</i>	Gráfico de área de pico en función de la masa de carbofurano estándar cargada en precolumna.	49
<i>Figura 3.4</i>	Gráfico de pérdida de masa en función del tiempo de secado durante la etapa de maduración de un "gel blanco" preparado usando agitación mecánica por 3.5 h.	55
<i>Figura 3.5</i>	Recuperación en eluatos con respecto a la fase de elución utilizada.	58
<i>Figura 3.6</i>	Evolución de la capacidad de retención de los cartuchos de inmunoextracción en función del tiempo.	60
<i>Figura 3.7</i>	Evolución de la capacidad de retención de los cartuchos de inmunoextracción en función del número de usos.	61
<i>Figura 3.8</i>	Efecto de la velocidad de flujo en la etapa de carga sobre la retención del <i>Cb</i> en el <i>IS</i> dopado con el <i>MAb</i> BFNB-52.	62
<i>Figura 3.9</i>	Efecto del volumen y la masa en la disolución de carga sobre la retención del <i>Cb</i> en el <i>IS</i> dopado con el <i>MAb</i> BFNB-52.	63
<i>Figura 3.10</i>	Isotermas de adsorción de un analito en un inmunoadsorbente.	66
<i>Figura 3.11</i>	Efecto del flujo de carga sobre la retención de <i>Cb</i> en el <i>IS</i> BFNB-67.	69
<i>Figura 3.12</i>	Efecto de la masa de analito en la carga sobre la retención de <i>Cb</i> en el <i>IS</i> BFNB-67.	69
<i>Figura 3.13</i>	Efecto del volumen de carga sobre la retención de <i>Cb</i> en el <i>IS</i> BFNB-67.	70
<i>Figura 3.14</i>	Efecto del flujo de carga sobre la retención de <i>Cb</i> en el <i>IS</i> BFNB-62.	71
<i>Figura 3.15</i>	Retención de <i>Cb</i> en el <i>IS</i> BFNB-62 en función de la concentración a masa cargada variable y volumen constante.	72
<i>Figura 3.16</i>	Retención de <i>Cb</i> en el <i>IS</i> BFNB-62 en función de la concentración a masa cargada constante y volumen variable.	72
<i>Figura 3.17</i>	Retención de <i>Cb</i> en el <i>IS</i> BFNP-21 en función de la concentración a masa cargada variable y volumen constante.	73
<i>Figura 3.18</i>	Retención de <i>Cb</i> en el <i>IS</i> BFNP-21 en función de la concentración a masa cargada constante y volumen variable.	74



**Índice de tablas**

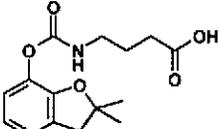
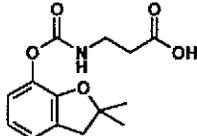
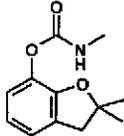
Tabla 1.1	Algunas fases estacionarias utilizadas en <i>EFS</i> y sus aplicaciones.	8
Tabla 1.2	Propiedades físicas de las principales inmunoglobulinas humanas.	19
Tabla 1.3	Ubicación y funciones de las 5 subclases de inmunoglobulinas en el ser humano.	19
Tabla 2.1	Fases móviles probadas durante la búsqueda de una elución óptima.	32
Tabla 3.1	Valores de tiempo muerto, factor de capacidad del analito y resolución del pico de interés con respecto a los picos interferentes a menor y mayor tiempo de retención para cada fase móvil probada.	41
Tabla 3.2	Precisión en el área de pico con respecto a las distintas formas de elución ensayadas.	42
Tabla 3.3	Análisis estadístico de los resultados contenidos en la Tabla 3.2. Comparación de varianzas y medias experimentales.	43
Tabla 3.4	Linealidad de respuesta en función de la cantidad de analito estándar inyectado.	44
Tabla 3.5	Análisis estadístico de los resultados contenidos en la Tabla 3.4. Comparación entre sí de las varianzas de los términos de regresión lineal $m$ y $b$ para las 4 curvas ( $S_{em}$ y $S_{eb}$ ).	45
Tabla 3.6	Análisis estadístico de los resultados contenidos en la Tabla 3.4. Comparación entre sí del término de regresión lineal $m$ para las 4 curvas.	45
Tabla 3.7	Análisis estadístico de los resultados contenidos en la Tabla 3.4. Comparación entre sí del término de regresión lineal $b$ para las 4 curvas.	46
Tabla 3.8	Incertidumbre total asociada a la determinación cromatográfica.	47
Tabla 3.9	Linealidad de área de pico en función de la cantidad de analito estándar cargada en precolumna.	48
Tabla 3.10	Análisis estadístico de los resultados contenidos en la Tabla 3.9. Comparación entre sí de las varianzas de los términos de regresión lineal $m$ y $b$ para las 4 curvas ( $S_{em}$ y $S_{eb}$ ).	49
Tabla 3.11	Análisis estadístico de los resultados contenidos en la Tabla 3.9. Comparación entre sí del término de regresión lineal $m$ para las 4 curvas.	50
Tabla 3.12	Análisis estadístico de los resultados contenidos en la Tabla 3.9. Comparación entre sí del término de regresión lineal $b$ para las 4 curvas.	50
Tabla 3.13	Evaluación de la incertidumbre asociada al método.	52



Tabla 3.14	Estimación del grado de hidrólisis de carbofurano en disolución de carga y en disolución de elución, tras 24 horas de incubación a temperatura ambiente.	52
Tabla 3.15	Determinación de la actividad nativa de los 4 distintos anticuerpos utilizados. Valores de alícuotas encapsuladas en sol-gel, actividad esperada al 100 % de actividad y pérdida de actividad debida al proceso de encapsulamiento.	54
Tabla 3.16	Geles preparados. Masa de gel obtenida, forma y tiempo de agitación durante su preparación.	55
Tabla 3.17	Eluyentes probados y sus correspondientes volúmenes mínimos necesarios.	58
Tabla 3.18	Disminución de la capacidad de enlazamiento de <i>Cb</i> para los cuatro inmunoabsorbentes en función del uso y el tiempo.	59
Tabla 3.19	Retención del <i>Cb</i> en el <i>IS</i> dopado con el <i>MAb</i> BFNB-52 bajo condiciones de masa cargada constante y volumen de carga variable.	63
Tabla 3.20	Retención del <i>Cb</i> en el <i>IS</i> dopado con el <i>MAb</i> BFNB-52 bajo condiciones de volumen de carga constante y masa cargada variable.	63
Tabla 3.21	Concentración de saturación aproximada para los inmunoabsorbentes BFNB-52, BFNB-67 y BFNB-62.	73



## Abreviaturas usadas

Abreviaturas		Significado
Singular	Plural	
<i>Ab</i>	<i>Abs</i>	Anticuerpo
<i>Ag</i>	<i>Ags</i>	Antígeno
BFNB		Ácido 4-[[[(2,3-dihidro-2,2-dimetil-7-benzofuraniloxi) carbonil]amino] butanoico
		
BFNP		Ácido 3-[[[(2,3-dihidro-2,2-dimetil-7-benzofuraniloxi) carbonil] amino] propanoico
		
<i>BSA</i>		Albúmina de Suero Bovino
<i>Cb</i>		Carbofurano, (N-metilcarbamato de 2,3-dihidro-2,2-dimetil-7-benzofuranilo)
		
<i>CLAR</i>		Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución
<i>C<sub>r</sub></i>		Concentración conocida de volumen percolado
<i>DDT</i>		1,1,1-tricloro-2,2-bis-( <i>p</i> -clorofenil)etano, ( <i>p</i> -ClC <sub>6</sub> H <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> CHCCl <sub>3</sub>
<i>DMF</i>		N,N-Dimetilformamida, (CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> NCH <sub>2</sub> O
<i>DNA</i>		Ácido desoxirribonucleico
<i>DVB</i>		Divinilbenceno
<i>ec.</i>	<i>ecs.</i>	Ecuación
<i>EFS</i>		Extracción en Fase Sólida
<i>ELISA</i>	<i>ELISAs</i>	Ensayo de Inmunoadsorción con Enzimas Ligadas
<i>ELL</i>		Extracción Líquido-Líquido
<i>EPA</i>		Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos
<i>EiOH</i>		Etanol, CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> OH
<i>F</i>		Velocidad de flujo
<i>F<sub>m</sub></i>		Fase móvil
<i>F<sub>s</sub></i>		Fase estacionaria
<i>h</i>		Horas
<i>H<sub>3</sub>Cit</i>		Ácido cítrico, HO <sub>2</sub> CCH <sub>2</sub> C(CO <sub>2</sub> H)(OH)CH <sub>2</sub> CO <sub>2</sub> H
<i>HPLC</i>		High Proficiency Liquid Chromatography ( <i>CLAR</i> )
<i>IE</i>		Inmunoextracción
<i>Ig</i>	<i>Igs</i>	Inmunoglobulina
<i>IgX</i>	<i>IgXs</i>	Inmunoglobulina X (donde X = A, D, E, G o M)



---

i-Pr		Radical isopropilo, $(\text{CH}_3)_2\text{CH}-$
IS	ISs	Inmunoadsorbente
$\lambda$	$\lambda_s$	Lambda, Longitud de onda
LD <sub>50</sub>		Dosis Letal 50
MAB	MAbs	Anticuerpo monoclonal
MeCN		Acetonitrilo, $\text{CH}_3\text{CN}$
MeOH		Metanol, $\text{CH}_3\text{OH}$
min		Minutos
MS		Espectrometría de Masas
n-Bu		Radical n-butilo, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$
ODS		Octadecilsilano, $\text{R}_3\text{Si}-(\text{CH}_2)_{17}\text{CH}_3$
PBS		Disolución buffer de fosfatos
PIM	PIMs	Polímero Impreso Molecularmente
Ref.	Refs.	Referencia bibliográfica
RNA		Ácido ribonucleico
RP-LC		Cromatografía de Líquidos de Fase Reversa
t-Bu		Radical terbutilo, $(\text{CH}_3)_3\text{C}-$
UV		Ultravioleta
VIS		Visible
V <sub>0</sub>		Volumen muerto
V <sub>b</sub>		Volumen de fuga (breakthrough volume)
V <sub>e</sub>		Volumen de equilibrio o de saturación
V <sub>n</sub>		Volumen percolado
V <sub>s</sub>		Volumen estequiométrico (stoichiometric volume)

---



## Introducción

Actualmente, el desarrollo tecnológico alcanzado por el ser humano ha permitido que existan soluciones prácticas para casi todo tipo de problemas. Uno de ellos es, sin duda, la producción alimentaria, vinculada de manera inevitable al crecimiento demográfico. Para satisfacer la demanda de productos agrícolas es necesario mantener un crecimiento anual en su producción con la misma rapidez de aumento que la población. No obstante, existen ciertos problemas que requieren ser solucionados para lograr dicha meta, entre ellos, el control de plagas perjudiciales. Para ello se ha recurrido de manera sistemática al uso de plaguicidas y por esa razón, el sector industrial dedicado a su producción invierte año con año cantidades importantes de dinero en el desarrollo de nuevas formulaciones.

Sin embargo, el uso indiscriminado de esas sustancias ha alterado de manera significativa la composición de las aguas en los mantos freáticos, los suelos, el aire y por tanto, el frágil equilibrio de los ecosistemas existentes en todo el planeta. Por esa razón es necesario mantener un monitoreo constante de pesticidas en muestras ambientales, con tal de poder emitir alertas antes de que se presenten eventos trágicos a escala global. En la actualidad, los métodos de determinación de pesticidas en muestras ambientales involucran en su mayoría, complicados pasos de pretratamiento de muestras y la utilización de instrumental químico no siempre de fácil disponibilidad. Es por ello que algunos grupos de investigación han optado por aprovechar las interacciones específicas existentes entre el analito y anticuerpos generados contra él, mediante el uso de inmunoabsorbentes, con tal de contar con herramientas de fácil aplicación en la limpieza y/o enriquecimiento de muestras ambientales. [1]

En nuestro país, dada la extensión de tierras dedicadas a la agricultura en todas sus variantes, existe un gran uso de pesticidas. Uno de los más utilizados es el carbofurano (comercializado bajo los nombres de "Furadan", "Curaterr", entre otros), para el control de lombrices de tierra, ácaros, chinches, etc. principalmente debido a que no se ha demostrado bioacumulación asociada a su uso. Sin embargo en años recientes, casos emergentes de cáncer cérvico-uterino en jóvenes de comunidades esencialmente agrícolas han llamado la atención tanto de médicos rurales como de trabajadores comunitarios en distintas partes del país, sobre todo porque en dichos casos, el carbofurano es uno de los pesticidas más utilizados. [2,3]

El presente trabajo fue realizado en la búsqueda de obtener inmunoabsorbentes aplicables en el pretratamiento de muestras ambientales de forma efectiva y selectiva. Los inmunoabsorbentes fueron preparados mediante el encapsulamiento de anticuerpos monoclonales anti-carbofurano utilizando la técnica sol-gel [4]. Así también, se evaluaron la estabilidad de los inmunoabsorbentes en función del tiempo y la capacidad de retención en función de la variación de los parámetros de carga (velocidad de flujo, volumen de disolución y masa de analito) en cada cartucho de inmunoabsorción.

Este escrito, además de esta sección, contiene una tabla de contenido general, un índice de todas las figuras y otro que señala todas las tablas presentes, tres capítulos (Generalidades, Desarrollo experimental y



Resultados y discusión), sección de conclusiones, un anexo dividido en tres secciones (de ecuaciones estadísticas, de ecuaciones cromatográficas y de cromatogramas) y finalmente, las referencias bibliográficas consultadas. En el primer capítulo (**Generalidades**) está incluida toda la información relativa al carbofurano, la extracción en fase sólida, la técnica de encapsulamiento sof-gel aplicada a biomoléculas y los anticuerpos, así como también el planteamiento de hipótesis y objetivos. En el segundo capítulo (**Desarrollo experimental**) se describe de manera detallada todo lo relacionado al material, equipo, disoluciones, reactivos, disolventes y la metodología seguida para alcanzar los objetivos. En el tercer capítulo (**Resultados y discusión**) se incluyen los resultados de los experimentos descritos en el segundo capítulo, junto con el análisis de los mismos. El **Anexo** contiene todas las ecuaciones tanto estadísticas (sección **A**) como cromatográficas (sección **B**), así como también 15 cromatogramas (sección **C**) que ilustran algunos de los resultados más significativos.

## Capítulo 1. Generalidades

### 1.1 Pesticidas

Se define como *pesticida* a toda aquella sustancia o mezcla de sustancias que produce la muerte o controla la existencia de organismos vivos perjudiciales para el ser humano, generalmente, dentro del rubro agropecuario. Los pesticidas se pueden clasificar en función del tipo de plaga a la cual afecta, ya sean gusanos (*vermicidas*), ácaros (*acaricidas*), lombrices (*nematicidas*), insectos (*insecticidas*), hongos (*fungicidas*), roedores (*rodenticidas*), microorganismos (*antibióticos de uso agropecuario*) o caracoles (*moluscocidas*). También pueden ser clasificados en distintas familias de acuerdo con su estructura química. Como ejemplos de esto último tenemos a las familias de los *ácidos fenoxiacéticos*, de las *triazinas*, de los *carbamatos*, de los *organofosforados*, de los *organoclorados*, entre otras más. Otra clasificación es en función de su modo de acción sobre el organismo objetivo, pudiendo ser de dos tipos, *sistémico* o *no sistémico*. Si el pesticida es absorbido por el organismo de manera directa vía contacto o por ingestión, se le considera como un pesticida no sistémico. Por otro lado, si es absorbido por las plantas y de éstas pasan a las plagas que de ellas se alimentan, se trata de un pesticida sistémico.[5]

Los pesticidas actúan sobre el metabolismo de los organismos blanco o bien sobre su proceso de reproducción, pero en general no son específicos. Un ejemplo bien conocido es el del *DDT*, un pesticida organoclorado originalmente utilizado para controlar, entre otras plagas, las poblaciones de mosquitos en el siglo pasado. Este pesticida afecta el sistema nervioso de los insectos, sin embargo los efectos causados sobre los seres vivos ubicados en esferas superiores dentro de la cadena alimenticia quedó al descubierto varios años después. Dada la bioacumulación que presenta esa sustancia, al subir cada vez más de nivel trófico –de los consumidores primarios hasta los consumidores terciarios–, las concentraciones en tejido se disparan exponencialmente. Si además se considera el hecho de que muchos insectos presentan adaptabilidad y tolerancia gradual a la presencia de la sustancia en cuestión, se puede fácilmente concluir que un grave problema surge con ello. Esto conlleva un problema ecológico severo al afectar de manera indirecta a todos los seres vivos dentro de un ecosistema, incluyendo al ser humano. Como ejemplo se plantea el caso de algunas aves que, debido a los efectos del *DDT*, han mermado en su capacidad para generar el material del cual se hallan compuestos los cascarones de sus huevos. No obstante la prohibición sobre el uso de *DDT* en 1972, éste se ha propagado a todos los rincones del planeta, encontrándose incluso en el tejido graso de los pingüinos de la Antártica, lugar en el cual el pesticida nunca antes había sido utilizado [6]. Por tal razón, la industria química ha ido buscando a lo largo del tiempo, pesticidas con una mayor efectividad y una baja bioacumulación.



1.1.1 Carbofurano

Una familia de pesticidas de uso muy común es la de los *N*-metilcarbamatos (Figura 1.1). Esta familia se caracteriza por poseer dentro de su estructura química al grupo carbamato unido por el nitrógeno a un grupo metilo [7 y 8]. Entre la gran variedad de sustancias que comprende la familia se encuentra al carbofurano. En cuanto al comportamiento ambiental de los compuestos incluidos dentro de esta familia es importante hacer mención de su persistencia. En general, la permanencia de los carbamatos en suelos no es mayor a 3 meses [8], un tiempo corto si se compara con los 20 meses o más que persisten los insecticidas de hidrocarburos clorados [9]. Además, los carbamatos son metabolizados en los vegetales de manera completa sin presentar bioacumulación [10].

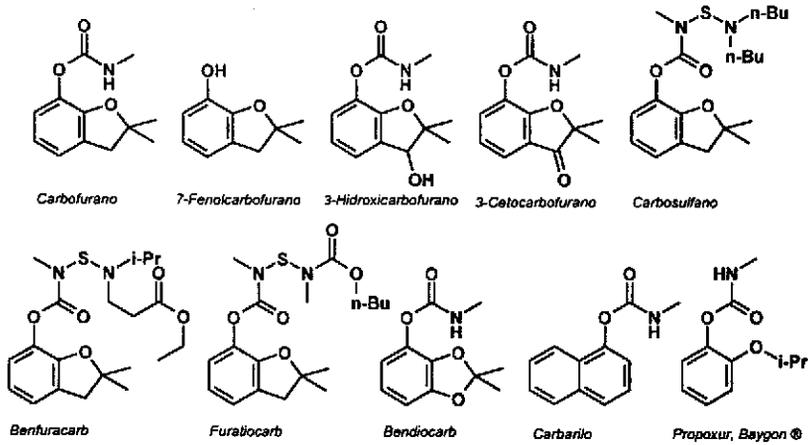


Figura 1.1 Algunos compuestos de la familia de los *N*-metilcarbamatos con sus respectivos nombres comunes. Los primeros cuatro compuestos corresponden al carbofurano y sus principales metabolitos. [7]

El *carbofurano* (*N*-metilcarbamato de 2,3-dihidro-2,2-dimetil-7-benzofuranilo), *Cb*, es un pesticida de uso agrícola, como insecticida, nematocida y acaricida, siendo efectivo tanto de manera sistémica como por contacto. En su estado puro es un sólido blanco soluble en agua ( $0.7 \text{ g L}^{-1}$  a  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ ) y algunos disolventes orgánicos (acetona, benceno, EtOH, DMF, MeCN) con un punto de fusión de  $150\text{-}152 \text{ }^\circ\text{C}$ , gravedad específica de 1.180 ( $20 \text{ }^\circ\text{C}$ ), de fórmula molecular  $\text{C}_{12}\text{H}_{15}\text{NO}_3$  y una masa molar de  $221.26 \text{ g mol}^{-1}$  [11 y 12]. Se vende comercialmente bajo los nombres de “*Furadan*”, “*Curaterr*”, “*Cristuran*”, “*Yaltox*” y “*Niagara 10242*” [11 y 13]. En el caso particular de México es vendido en toda la república y se le conoce por su alta efectividad en la eliminación de lombrices de tierra. Los agricultores lo aplican en general durante la etapa de barbechado del suelo, previa a la siembra de maíz, papa, frijol, jitomate, alfalfa, entre otros.

Dentro de los organismos actúa como inhibidor de la *acetilcolinesterasa*, por lo cual también posee un gran efecto tóxico sobre animales superiores. La acetilcolinesterasa es la enzima encargada de destruir a la acetilcolina una vez que ésta ha dejado de actuar sobre los receptores colinérgicos. La acumulación de acetilcolina produce severos efectos sobre el sistema nervioso [14 y 15].



Es necesario por ello hacer estudios serios para averiguar si existe relación alguna entre el uso agrícola de carbofurano y la alta incidencia de cáncer mencionada. Para efectuar un estudio de tal magnitud, es imperativo contar con métodos analíticos relativamente rápidos y sencillos, pero también altamente sensibles y confiables. En el siguiente apartado se describirán brevemente algunas metodologías recientes para la determinación de trazas de carbofurano en matrices biológicas o ambientales.

### 1.1.3 Métodos de determinación de carbofurano

Desde hace más de 30 años [10 y 11], en distintas partes del mundo se ha invertido esfuerzo y dinero para desarrollar métodos sensibles y selectivos que permitan cuantificar tanto carbofurano como sus metabolitos y otras sustancias de la familia de los N-metilcarbamatos al nivel de trazas en muestras ambientales. Entre las técnicas de importancia se pueden encontrar variados ejemplos (Cromatografía de fluidos supercríticos, Cromatografía electrocinética capilar, *CG-MS*, *CLAR-MS*, etc. [17]). Uno de ellos hace uso de un detector específico para nitrógeno acoplado a cromatografía de gases [11]. Sin embargo, tanto el carbofurano como la mayor parte de los compuestos de la familia de los N-metilcarbamatos son inestables a altas temperaturas, lo cual los hace inapropiados para su análisis directo vía cromatografía de gases [18]. Es por ello que la técnica preferida para tal efecto es la *CLAR* con derivatización post-columna y detección por fluorescencia (*método EPA 531.1*) [8 y 17]. Sin embargo, el método es bastante largo, complicado y costoso. La reacción post-columna consta de dos pasos; primero, los N-metilcarbamatos son hidrolizados para formar metilamina y después ésta última se derivatiza en presencia de o-ftalaldehído y mercaptoetanol dando lugar a un compuesto altamente fluorescente. Aunque la fluorescencia es un método de detección muy sensible y selectivo, cuando los compuestos de interés se encuentran a niveles de trazas en una matriz muy compleja (p.ej. material biológico, extractos de suelos, etc.) es indispensable una limpieza previa de la muestra para evitar interferencias en el análisis. Por otra parte, el procedimiento descrito requiere de instrumentación especializada que no está disponible comúnmente en los laboratorios de análisis (reactor post-columna de dos pasos).

Recientemente, algunos grupos de investigación han optado por aprovechar la interacción antígeno-anticuerpo como una opción novedosa para la extracción y preconcentración selectiva de pesticidas a partir de matrices ambientales [7, 19, 20 y 21]. Entre los pesticidas considerados en estos estudios se encuentra el carbofurano. G. S. Rule et al. [20], utilizaron cromatografía de inmunoafinidad en línea con cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas para la determinación de trazas de carbofurano en extractos de papa. La preparación de las columnas de inmunoafinidad se hizo por inmovilización química de anticuerpos policlonales anti-carbofurano. Por otro lado, el grupo del Dr. A. Montoya [7, 21], ha desarrollado diversos anticuerpos monoclonales contra carbofurano, para su uso en inmunoensayos (técnica *ELISA*). Esta técnica ha sido aplicada para la determinación de carbofurano en diversos frutos y legumbres con muy buenos resultados. El procedimiento de validación del método desarrollado consistió en comparar los resultados obtenidos por *ELISA* con los obtenidos por el método *EPA*, quedando demostrada la buena precisión y exactitud de los inmunoensayos, con la ventaja adicional de una mayor rapidez y sencillez [8, 17, y 21].

## 1.2 Extracción en fase sólida

### 1.2.1 Generalidades

La aplicación de la cromatografía de líquidos para el monitoreo de contaminantes ambientales se ha utilizado de manera preferencial durante años debido a que permite la determinación de compuestos polares y/o termodegradables sin necesidad de pasos de derivatización. Un gran número de compuestos con un intervalo amplio de polaridad pueden ser cuantificados mediante *CLAR* de fase reversa y detección *UV-VIS*. Sin embargo, la determinación de compuestos orgánicos a niveles traza requiere de complicados pasos de preconcentración y/o purificación, previo al análisis mediante *CLAR*. Muchos de los métodos de preconcentración utilizados de manera generalizada involucran el uso de extracciones líquido-líquido (*ELL*) muy laboriosas y largas. Por ello, la extracción en fase sólida (*EFS*) ha ganado interés como técnica de preparación de muestras, debido a que los tiempos de pretratamiento y las cantidades de disolventes utilizados se reducen considerablemente respecto a la *ELL*. [8, 18]

Actualmente, la *EFS* es utilizada dentro de la etapa de preparación de muestras con dos distintos fines: purificación de la muestra por una parte y preconcentración de la misma por otra. En el primer caso se busca eliminar aquellos componentes de la matriz que podrían interferir en la determinación del analito. Por otro lado, la aplicación de la *EFS* para preconcentrar uno o más analitos en las muestras cobra especial importancia en la determinación de compuestos a niveles traza, tal y como sucede en los casos de pesticidas en muestras ambientales. [22, 23].

El fundamento teórico de la extracción en fase sólida es el mismo que en la cromatografía de líquidos. Se basa en el equilibrio de reparto de solutos disueltos en una fase dispersante (fase móvil,  $F_m$ ) con una fase fija (fase estacionaria,  $F_s$ ). Las interacciones intermoleculares entre los componentes de la muestra, la fase estacionaria y la fase móvil son aprovechadas de forma que los analitos sean extraídos de la muestra por la  $F_s$  durante su percolado, para posteriormente ser eluidos en un volumen mínimo de solvente. Para que ocurra la extracción, el analito debe ser atraído con mayor fuerza por la fase estacionaria que por la fase móvil en la que inicialmente se halla disuelto. Por otro lado, para que la elución ocurra, la fase móvil de elución debe atraer con más fuerza al analito que aquella con la que éste es atraído por la fase estacionaria. No obstante, el éxito de cualquier protocolo de *EFS* requiere de la selección de una fase estacionaria adecuada (Tabla 1.1) así como también de la optimización de los pasos descritos a continuación (Figura 1.3):

Paso 1; Acondicionamiento. – El cartucho de *EFS* es activado por una fase móvil de composición adecuada.

Paso 2; Aplicación de la muestra. – En este paso, la muestra es percolada a través del cartucho a una velocidad de flujo adecuada y utilizando un disolvente que permita que la extracción por parte de la  $F_s$  sea llevada a cabo. Los distintos compuestos presentes en la muestra son retenidos en función de la magnitud de las fuerzas de interacción con la  $F_s$ .

Paso 3; Lavado. – Mediante un lavado selectivo son eliminados algunos de los compuestos interferentes residuales.

Paso 4; Elución. – Se utiliza un eluyente fuerte para debilitar la interacción entre los compuestos de interés y la  $F_s$  de tal forma que sean recuperados con una mayor pureza y/o con una mayor concentración.

Tabla 1.1 Algunas fases estacionarias utilizadas en EFS y sus aplicaciones.

Fase estacionaria	Aplicaciones
Octadecilo ( $C_{18}$ )	Extracción en fase reversa de compuestos no polares.
Compólimero estireno-DVB*	Extracción en fase reversa de compuestos moderadamente polares.
Fenilo ( $C_6H_5$ )	Extracción en fase reversa de compuestos no polares.
Ciano (CN)	Extracción en fase normal de compuestos polares.
Gel de sílice	Adsorción de compuestos polares.
Diol (COHCOH)	Extracción en fase normal de compuestos polares.
Amino ( $NH_2$ )	Extracción por intercambio iónico de aniones débiles.
Diamino	Extracción por intercambio iónico de aniones débiles.
Ácido sulfónico aromático ( $C_6H_5SO_3H$ )	Extracción por intercambio iónico de cationes fuertes.
Amina cuaternaria	Extracción por intercambio iónico de aniones fuertes.

\*DVB - Divinilbenceno

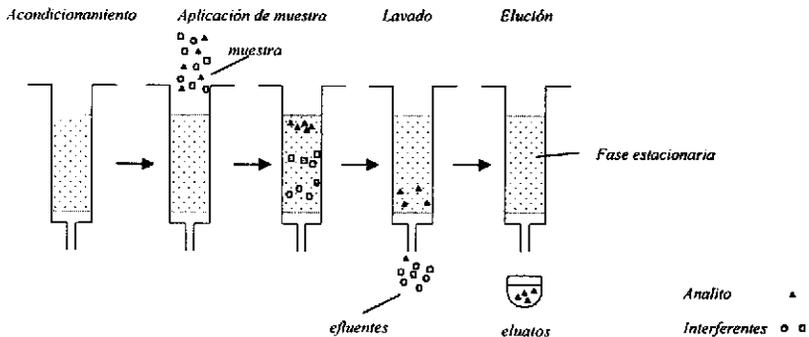
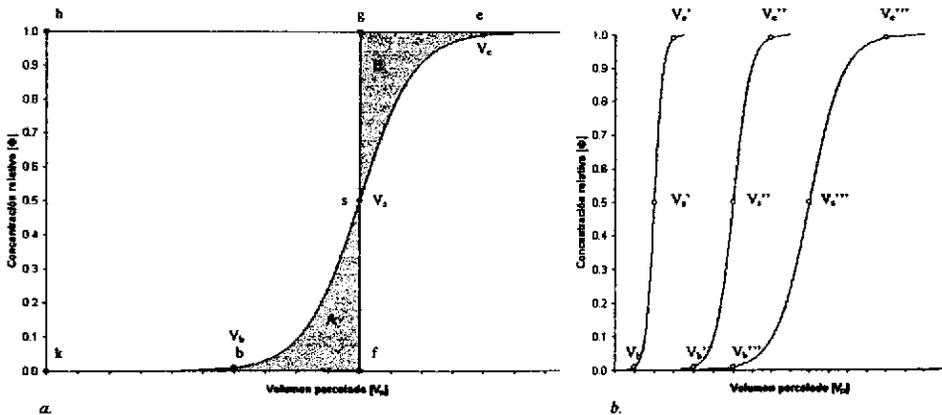


Figura 1.3 Pasos de la extracción en fase sólida. *Acondicionamiento*, preparación de la columna para recibir la muestra; *Aplicación de muestra*, percolado de la muestra por la columna para la extracción del compuesto de interés; *Lavado*, eliminación selectiva de impurezas o interferentes; *Elución*, recuperación del analito usando un solvente fuerte.

Un parámetro de gran importancia en la extracción en fase sólida es el volumen de muestra que puede ser manejado sin que se presente fuga del analito de interés. Para ello se requiere conocer el volumen de fuga ( $V_f$ ) de dicho compuesto para el cartucho utilizado. Dicho volumen corresponde al volumen máximo de muestra que puede utilizarse y, por tanto, la cantidad de analito que puede ser preconcentrado y determinado ya sea mediante *CLAR* o *CG*. Si se realiza el monitoreo en línea de un efluente percolado por el cartucho de *EFS* de forma que pueda determinarse el grado de fuga en función del volumen percolado, se obtiene una

curva conocida como cromatograma de análisis frontal (ver *Figura 1.4*). La diferencial de un cromatograma de análisis frontal es una curva de tipo Gaussiana como las curvas resultantes en los análisis comunes de elución. En la curva de la *Figura 1.4 a* se señalan los tres puntos de mayor importancia, el punto de fuga (*b*), el punto estequiométrico (*s*) y el punto de saturación o equilibrio (*e*). El primero corresponde al volumen de fuga y puede ser definido en términos del ensanchamiento de la banda ( $\sigma_v$ ) de acuerdo con la *ecuación B.2 del Anexo*. El segundo punto da origen al volumen estequiométrico,  $V_s$ , y la línea vertical que pasa por él, *f-g*, es conocida como el frente estequiométrico.  $V_s$  equivale al volumen de retención y representa al volumen de disolución percolada que saturaría la columna si la cinética de adsorción del analito fuera infinitamente rápida. Por último, el volumen de equilibrio o de saturación,  $V_e$ , definido por el punto *e*, corresponde a la saturación real del adsorbente. A partir de este punto, la concentración del analito en el efluente es la misma que en la disolución percolada y por tanto, toda la fase estacionaria se halla en equilibrio con la disolución de carga. El área del rectángulo formado al trazar una línea vertical en cualquier punto *i*, como en el caso *fhkf* de la *Figura 1.4 a*, para el punto *s*, es proporcional a la cantidad de soluto contenido en un volumen  $V_i$  de disolución percolada (para el punto *s* correspondería a  $V_s$ ). Dentro de este rectángulo, el área sobre la curva, *kbsghk*, es proporcional a la cantidad de analito adsorbido y el área bajo la curva, *bsfb*, es proporcional a la cantidad no retenida de soluto. De ahí se obtiene que la cantidad de soluto remanente dentro del adsorbente cuando el punto *i* del frente sale de la columna ( $q_i$ ) pueda calcularse mediante la *ecuación B.3*. Es necesario mencionar que en el punto de fuga, todo el soluto contenido en el volumen  $V_b$  percolado a través de la columna ha sido adsorbido, por tanto, puesto que en ese punto,  $A'_{(i)} = A_{(i)}$ , la *ecuación B.3* queda reducida a la *ecuación B.4*, y



*Figura 1.4* Curvas de análisis frontal.  $\Phi$ , concentración de soluto en el efluente respecto a la concentración en la disolución percolada (ver *ecuación B.1*);  $V_p$ , volumen percolado por el cartucho de EFS;  $V_b$ , volumen de fuga;  $V_e$ , volumen de saturación o equilibrio;  $V_s$ , volumen estequiométrico. *a*, *b*, punto de fuga; *s*, punto estequiométrico; *e*, punto de saturación o equilibrio; *f-g*, frente estequiométrico. *b*, magnitudes relativas entre los volúmenes estequiométricos de las tres curvas:  $V_s''=3V_s'$ ,  $V_s'''=5V_s'$ ; magnitudes relativas entre los anchos de banda de las tres curvas:  $\sigma_v''=2\sigma_v'$ ;  $\sigma_v'''=4\sigma_v'$ .

la cantidad de soluto dentro del adsorbente,  $q_s$ , puede calcularse mediante esta última ecuación. Por otro lado, la cantidad de analito dentro del adsorbente en el punto de equilibrio o saturación ( $q_e$ ) puede calcularse mediante la ecuación B.5 si se considera que el frente estequiométrico divide la curva de tal forma que el área bajo la curva antes del punto  $s$  ( $V_s$ ) equivale al área sobre la curva después de dicho punto (áreas A y B, respectivamente en la *Figura 1.4 a*). Por tanto la cantidad de analito presente en el volumen  $V_s - V_0$  es la misma que la cantidad de analito adsorbida en la fase estacionaria. Sin importar la forma o la simetría de un frente, el punto estequiométrico se encuentra ubicado de tal forma que las áreas de las figuras correspondientes a A y B en la *Figura 1.4 a*, separadas por la línea recta correspondiente al frente estequiométrico, sean iguales. De esta forma, cuando se tiene un frente perfectamente simétrico, el punto estequiométrico corresponde a un valor de  $\Phi = 0.5$ . [24, 25]

## 1.2.2 Cromatografía de Afinidad

La Cromatografía de Afinidad o Bioafinidad es una técnica que se utiliza para aislar un compuesto único, o un grupo de compuestos estructuralmente similares, a partir de una matriz compleja. El origen de esta técnica se remonta a los últimos años de la década 1960 con los trabajos de Porath et al. [26, 27] y muchos otros investigadores, quienes desarrollaron una nueva forma de cromatografía basada en el reconocimiento biológico. Así, la retención en esta técnica cromatográfica está basada en la característica particular que presentan algunas macromoléculas biológicas de poder unirse específica y reversiblemente a otras moléculas. Ejemplos de estas interacciones específicas son las uniones que se dan en los pares enzima-sustrato, receptor-hormona, polinucleótido-polinucleótido complementario y antígeno-anticuerpo. Dada su naturaleza, el uso de la Cromatografía de Bioafinidad estuvo restringido por muchos años al aislamiento y purificación de proteínas, ácidos nucleicos y en general grandes biomoléculas, o sus correspondientes sustratos, a partir de extractos de tejido o fluidos biológicos. Por ello, su aplicación principal fue en los campos de la Medicina y la Biología. Los grandes progresos realizados en el área de Inmunología durante la década pasada hicieron posible, al menos teóricamente, la generación de anticuerpos casi contra cualquier sustancia. Esto ha permitido extender la aplicación de la Cromatografía de Afinidad a otros campos como el Ambiental.

La fase estacionaria en Cromatografía de Afinidad está constituida por un soporte poroso en el cual se han inmovilizado, física o químicamente, moléculas llamadas ligandos de afinidad. Estos ligandos son capaces de reconocer y enlazar reversiblemente a un soluto particular o a una familia de solutos. En su versión más común, el ligando de afinidad es una biomolécula mientras que él o los solutos a enlazar pueden o no ser moléculas biológicas. Cuando la biomolécula es un anticuerpo que ha sido generado contra el soluto de interés (antígeno), la técnica recibe el nombre de Cromatografía de Inmunofinidad y la fase estacionaria se denomina Inmunoadsorbente (IS). [1]

Puesto que la Cromatografía de Afinidad, en general, no tiene como función la separación de los componentes de una muestra, sino el aislamiento de uno o unos cuantos compuestos presentes en ella, su aplicación analítica primordial se da en la etapa de preparación de muestra. Así, los cartuchos o columnas empacados con adsorbentes de afinidad se utilizan en la modalidad de Extracción en Fase Sólida, para la recuperación selectiva y, eventualmente, para la preconcentración de analitos a partir de matrices complejas.

La extracción por inmunoadfinidad se aplica únicamente a muestras acuosas, a las cuales se añade previamente un buffer salino para fijar el pH (generalmente en valores cercanos a 7) y la fuerza iónica (en el intervalo 0.01-0.15 M). Estas condiciones son necesarias para preservar la actividad y funcionalidad del anticuerpo inmovilizado en el soporte, de modo que, al encontrarse en su configuración nativa, pueda reconocer y enlazar al compuesto de interés. El protocolo de inmunoeextracción es similar al de la *EFS* convencional, como se describe a continuación para el caso de un sistema fuera de línea.

Protocolo de inmunoeextracción:

Paso 1; Activación del adsorbente. – El cartucho de inmunoeextracción se activa por el paso de un buffer salino a pH y fuerza iónica adecuados.

Paso 2; Carga de la muestra. – La muestra acuosa (pH y fuerza iónica fijados adecuadamente) se percola a través del cartucho empacado con el *IS*. A diferencia de la *EFS* convencional de fase reversa, en este paso sólo el analito-antígeno (y en algunos casos compuestos muy similares) queda retenido en los sitios activos del anticuerpo.

Paso 3; Lavado. – El disolvente de lavado es, en general, el mismo buffer salino antes mencionado, al cual se le añade, en algunos casos, una pequeña proporción de un disolvente orgánico polar (MeCN, MeOH). La función del lavado es desalojar residuos de muestra del volumen intersticial del cartucho y eluir compuestos débilmente retenidos, por adsorción no específica, sobre la matriz del soporte.

Paso 4; Elución. – Este paso es probablemente el más delicado pues se requiere de un disolvente capaz de disociar el complejo antígeno-anticuerpo, pero que no provoque una desnaturalización irreversible del anticuerpo. Con este fin se han ensayado disoluciones acuosas ligeramente ácidas o básicas, así como mezclas de disolvente orgánico-agua.

Paso 5; Regeneración del adsorbente. – Generalmente se realiza con el mismo buffer salino utilizado en el paso de activación.

Aunque el proceso de inmunoeextracción parece bastante simple, la optimización de condiciones experimentales es un trabajo delicado por el riesgo que se corre de afectar irreversiblemente a la biomolécula. Sin embargo, los puntos críticos que realmente han limitado el desarrollo y expansión de esta técnica son la falta de anticuerpos contra analitos variados y la dificultad de preparación de los inmunoadsorbentes. En efecto, hasta ahora la variedad de anticuerpos generados contra, por ejemplo, contaminantes orgánicos es muy escasa. Aunque se han reportado trabajos que utilizan anticuerpos contra algunas fenilureas, triazinas, hidrocarburos poliaromáticos, carbamatos y otros contaminantes aislados (malatión, 2,4-D), estos anticuerpos son experimentales (producidos en laboratorios de investigación) y, salvo raras excepciones, no están disponibles comercialmente [4, 28 y 29]. Los pocos anticuerpos que pueden adquirirse con algunos proveedores muy especializados son muy costosos y no siempre resultan satisfactorios (moléculas excesivamente delicadas y/o de muy baja actividad). Obviamente, el problema es aun mayor en lo que respecta a los inmunoadsorbentes ya preparados (es decir, con el anticuerpo inmovilizado en un soporte), cuya disponibilidad comercial es prácticamente inexistente.

A pesar de los problemas mencionados, muchos grupos de investigación continúan trabajando en esta área, ya sea para generar nuevos anticuerpos o para desarrollar métodos más eficaces para su inmovilización.



La razón de ello es el alto potencial que se vislumbra en estos materiales para aplicaciones no sólo en Química Analítica Ambiental sino en muchas otras áreas de la Ciencia.

Una alternativa en la Cromatografía de Afinidad que ha despertado un gran interés en los últimos años son los Polímeros Impresos Molecularmente (*PIMs*). En principio, los *PIMs* pueden ser tan selectivos como los *ISs*, con la ventaja de no requerir la presencia de una biomolécula inmovilizada en el soporte para proporcionar los sitios de reconocimiento específico. Esto se traduce en una gran flexibilidad para la preparación de adsorbentes variados capaces de reconocer muy diversas moléculas, cuyo bajo costo, gran estabilidad y facilidad de síntesis los hacen sumamente atractivos. Sin embargo el desarrollo de los *PIMs* se encuentra todavía en una fase muy incipiente, comparado con el de los *ISs*, y son relativamente escasos los ejemplos exitosos de aplicación de estos materiales en la *EFS* de muestras reales.

Entre los principales problemas de los *PIMs* que no han sido resueltos satisfactoriamente se encuentran los siguientes:

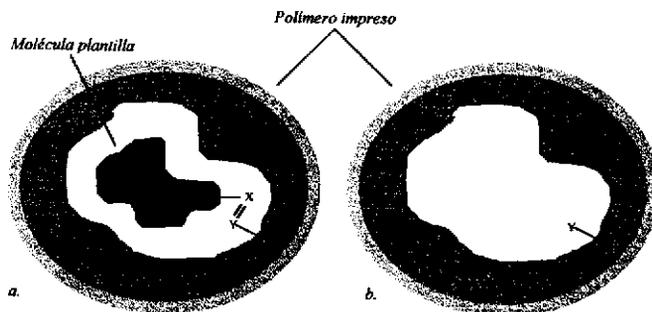
- Dificultad para imprimir moléculas pequeñas o aún moléculas medianas que carecen de grupos funcionales polares.
- Falta de homogeneidad en la actividad de los sitios impresos.
- Fuertes cambios en el grado de hinchamiento del polímero al cambiar el disolvente percolado. En particular, fuerte contracción y cierre de poros en presencia de agua o disolventes muy polares.
- Dificultad para remover completamente la molécula plantilla utilizada en la síntesis.
- Fuerte adsorción no específica de compuestos no deseados sobre la matriz polimérica.

Al igual que en el caso de los inmunoadsorbentes, un gran número de grupos de investigación trabajan activamente en el estudio y desarrollo de *PIMs* buscando soluciones a los problemas mencionados. Por ello se esperan importantes avances en esta área en los próximos años.

### 1.2.2.1 Polímeros impresos molecularmente

Un polímero impreso molecularmente es un material que contiene en su estructura cavidades o sitios cuyo tamaño, forma y grupos funcionales de superficie son complementarios a los de la molécula que les dio origen. Estos sitios receptores son por lo tanto capaces de unirse a dicha molécula con una afinidad y especificidad semejante a la de un anticuerpo por su antígeno. Por esta razón los *PIMs* han sido llamados "anticuerpos plásticos".

Los *PIMs* se preparan mediante la copolimerización de un monómero funcional y un entrecruzador en presencia del analito de interés (llamado en este caso "plantilla") y de un disolvente que actúa como diluyente de la mezcla inicial y como porógeno durante la formación del polímero. Inicialmente, el monómero funcional forma un complejo con la plantilla; al producirse la polimerización, los grupos funcionales de la molécula plantilla quedan inmovilizados espacialmente en la estructura polimérica altamente entrecruzada. Cuando se remueve la plantilla, ésta deja impresa una cavidad que le es física y químicamente complementaria. De esta manera, se introduce una memoria molecular en el polímero, el cual es ahora capaz de reenlazar selectivamente al analito o a compuestos de estructura muy semejante (*Figura 1.5 b.*).



**Figura 1.5** Polímero impreso molecularmente. *a.* Interacción de molécula plantilla con el polímero formado. *b.* Polímero impreso.

El complejo entre la molécula de impresión y el monómero funcional se puede formar vía enlaces covalentes reversibles o interacciones no covalentes, tales como puentes de hidrógeno, interacciones iónicas, hidrofóbicas, etc. En la impresión covalente se forman derivados plantilla-monómero, por lo que al concluir el proceso de polimerización es necesario romper los enlaces para liberar los sitios de unión. Posteriormente, durante el uso del PIM, estos enlaces covalentes entre el analito y los grupos funcionales de la cavidad impresa volverán a ser formados. Evidentemente, no es fácil encontrar monómeros funcionales que puedan formar enlaces covalentes reversibles con la molécula plantilla de interés. Por esta razón, generalmente se prefiere la vía de impresión no covalente que es más flexible en cuanto a la elección de los monómeros funcionales. Estos se eligen de manera que faciliten interacciones específicas con los grupos funcionales del analito. Por ejemplo, uno de los monómeros funcionales más usados es el ácido metacrílico, que puede establecer interacciones iónicas con aminas protonadas o formar puentes de hidrógeno con las mismas aminas no protonadas o con amidas, carboxilos, alcoholes, fenoles, sulfuros, etc. [30, 31 y 32].

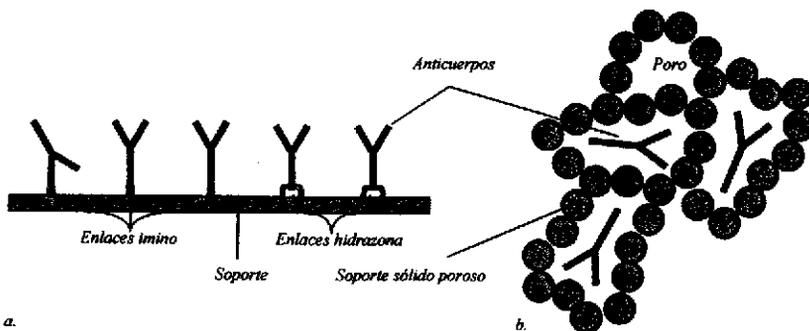
### 1.2.2.2 Inmunoadsorbentes

Los inmunoadsorbentes constan básicamente de dos partes, el soporte y el anticuerpo. La forma en la cual el anticuerpo se encuentra inmovilizado en el soporte es lo que marca la diferencia entre inmunoadsorbentes. En la mayoría de los trabajos reportados, los anticuerpos son unidos covalentemente al soporte de forma que sus sitios activos quedan libres para interactuar con el analito (*Figura 1.6 a*) [19]. Por lo general, los soportes comúnmente utilizados son sílice modificada (sílice-aldehído o sílice hidrazida), agarosa, celulosa o polímeros derivados de polimetacrilato [33]. El enlazamiento químico de los anticuerpos al soporte se realiza por dos diferentes vías, una de ellas es la formación de enlaces imino con los grupos amino residuales de los anticuerpos, la otra es a través de la formación de enlaces hidrazona con los grupos hidroxilo residuales de las porciones carbohidrato oxidadas en la molécula de anticuerpo. Sin embargo, los rendimientos en la cantidad de anticuerpo funcional inmovilizado por cualquiera de estas vías no son muy altos, ya sea por desnaturalización de la biomolécula durante las reacciones involucradas, o bien por mala orientación de la molécula ligada (caso del enlazamiento vía grupos amino) [19, 33, 34, 35 y 36]. Por esta razón, usualmente se trabaja con un exceso de anticuerpo durante el proceso de inmovilización (del orden de 15-20 mg por gramo

de adsorbente). Considerando el alto costo de los anticuerpos, es indispensable optimizar la eficiencia del proceso de inmovilización para lograr producir inmunoabsorbentes comercialmente viables.

Una alternativa interesante para la inmovilización de moléculas delicadas como los anticuerpos es por encapsulamiento en los poros de un soporte sólido mediante la técnica sol-gel (*Figura 1.6 b.*). Esta vía ha sido explorada desde los inicios de la década pasada para la inmovilización de otras biomoléculas (enzimas, ácidos nucleicos e incluso células vivas) con resultados satisfactorios [37, 38 y 39]. Así mismo, algunos grupos han reportado el encapsulamiento de anticuerpos contra algunos contaminantes y la aplicación de los ISs, así obtenidos, en el análisis de muestras ambientales [4, 29]. De acuerdo con estos reportes, la técnica sol-gel tiene la ventaja sobre el anclaje químico de preservar en mayor medida la actividad del anticuerpo inmovilizado. Esto se debe, por una parte, a que el anticuerpo no está ligado al soporte sino sólo físicamente atrapado en los poros de la matriz sólida; por lo tanto, los problemas asociados con mala orientación del anticuerpo y bloqueo de sus sitios activos quedan eliminados. Por otra parte, a diferencia de lo que sucede en una reacción química, las condiciones del proceso sol-gel son relativamente suaves y la manipulación del anticuerpo es mínima por lo que el riesgo de desnaturalización disminuye notablemente. Finalmente, cabe mencionar que en muchos trabajos se ha demostrado que las biomoléculas encapsuladas quedan permanentemente atrapadas en los poros del gel, sin posibilidad de fuga. No obstante, la estructura porosa del gel permite la libre difusión de sustratos pequeños que pueden así penetrar a los poros que contienen la biomolécula atrapada e interactuar con ella.

Una desventaja de los inmunoabsorbentes sol-gel es que no pueden ser fácilmente adaptados para la EFS en línea con la cromatografía de líquidos, ya que las propiedades mecánicas del gel no son adecuadas para resistir altas presiones. En efecto, una vez preparado el adsorbente con la biomolécula encapsulada, no es posible someterlo a las altas temperaturas que se requieren para fortificar y consolidar totalmente al esqueleto sólido. En este aspecto, los ISs preparados por vía química tienen la ventaja de que el soporte ya ha sido consolidado antes de inmovilizar al anticuerpo.



**Figura 1.6** Diferentes formas de inmovilizar anticuerpos. *a.* Enlace covalente. *b.* Encapsulamiento en fase sólida porosa.

### 1.3 Técnica sol-gel

En forma resumida, la técnica sol-gel se lleva a cabo mediante la hidrólisis y condensación de sustancias precursoras (tales como tetra-alcoxisilanos, tri-alcoxisilanos organometálicos y otros alcoximetallatos [37 y 40]) a temperatura ambiente, formándose en primera instancia un suspensoide [41] o sol. A medida que la polimerización progresa, los oligómeros se agregan formando largas cadenas que al unirse entre sí dan lugar a la formación de un gel. El gel a su vez, sometido a secado intensivo, da lugar a una matriz sólida parecida a un vidrio [37 y 40]. Cuando una molécula dopante es agregada tras la etapa de hidrólisis, ésta puede quedar atrapada en la matriz polimérica al momento de la gelación [37]. La utilidad de la técnica para la síntesis de materiales con propiedades especiales se ha demostrado en innumerables ocasiones. Estos materiales han tenido aplicaciones como sensores ópticos, electroquímicos, biológicos y bioquímicos, en aparatos de diagnóstico, y como catalizadores, entre otros [37, 38, 42, 43, 44 y 45]. En los siguientes apartados se dará una explicación más detallada de los conceptos particulares relacionados con la técnica y de los procesos químicos involucrados en la reacción de síntesis.

#### 1.3.1 Conceptos básicos

Previo a la descripción detallada de la técnica sol-gel, se definirán algunos conceptos importantes [37, 40 y 41]:

*Coloide.* Sistema formado por partículas dispersas que miden desde aproximadamente 1 nm hasta 10 nm. Las moléculas de la fase dispersa están integradas por  $10^3$  a  $10^9$  átomos. Por tanto, por el tamaño corpuscular de la fase dispersa, un coloide queda ubicado entre las soluciones (partículas de 1 Å a 1 nm) y las mezclas (partículas de varios  $\mu\text{m}$  en adelante). Los coloides se han clasificado dentro de tres grupos generales en función del tamaño de la partícula dispersa. En el primer grupo se encuentran las dispersiones coloidales, en segundo lugar están las soluciones de macromoléculas y por último los coloides de asociación. Como ejemplos se pueden considerar a las emulsiones de aceite en agua, las soluciones acuosas de proteínas y las soluciones micelares de jabón en agua, respectivamente.

*Sol.* Un sol es un coloide en el que la fase dispersante es un líquido y la fase dispersa es un sólido.

*Gel.* Se trata de un gel si, al contrario del sol, la fase dispersa es un líquido y el medio dispersor un sólido. Pueden ser de dos tipos, elásticos, como la gelatina comestible, y no elásticos, como el gel de sílice. Un gel elástico puede deshidratarse y rehidratarse sin problema alguno. En cambio un gel no elástico, al deshidratarse, no puede ser regenerado de manera absoluta al estado previo por simple adición de agua.

*Hidrogel.* Estado de un gel con poros relativamente grandes, del orden de 4 nm a 130 nm.

*Xerogel.* Un xerogel es un gel en el que el tamaño de los poros ha decrecido significativamente hasta alcanzar magnitudes de 0.5 nm a 20 nm.

*Micela.* Una micela es una partícula de tamaño coloidal formada por asociación de moléculas de menor tamaño.

*Oligómero.* Polímero compuesto por pocos monómeros. En algunos casos, se incluyen en la definición partículas hasta con 8 unidades monoméricas.

*Gelificación.* Es el acto de transición desde el estado de sol al estado de gel. Este fenómeno es ocasionado por coalescencia entre las partículas inicialmente dispersas en el sol.

### 1.3.2 Hidrólisis y condensación

Independientemente del tipo de precursor utilizado, los procesos de hidrólisis y condensación se producen casi simultáneamente y de manera similar en todos los casos. En la primera etapa, la hidrólisis parcial del precursor (generalmente catalizada por ácidos o bases) origina tanto el alcohol correspondiente al alcóxido, como oligómeros disueltos en la fase dispersante a manera de micelas (ver Figuras 1.7 a. y 1.8 a.). Conforme transcurre el proceso de hidrólisis, los oligómeros continúan condensando, permitiendo el crecimiento de la cadena y la formación del sol (ver Figuras 1.7 b. y 1.8 b.). No obstante es importante mencionar que, en el caso de la catálisis ácida, el proceso de condensación es lento, mientras que la velocidad de hidrólisis se ve tanto más favorecida cuanto mayor es la concentración de iones  $H^+$ . Por otro lado, las reacciones de condensación son favorecidas en medios básicos. Tomando esto en cuenta, es posible controlar el proceso completo e inducir la gelificación en el momento que se considere apropiado. [40]

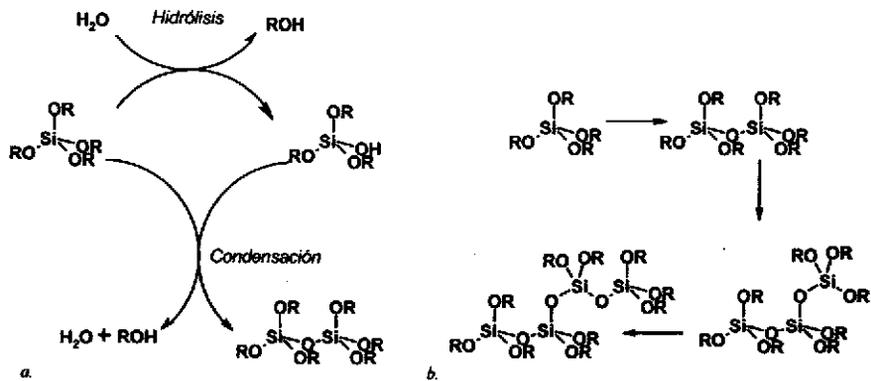


Figura 1.7 Etapa de hidrólisis y condensación en sol-gel para un precursor tetra-alcóxido de silicio. a. Ejemplo de hidrólisis del precursor seguida de condensación. b. Condensación consecutiva provocando el crecimiento de la cadena oligomérica.

### 1.3.3 Gelificación

Como ya se ha mencionado, el pH tiene una gran influencia en la rapidez de hidrólisis y condensación, y por lo tanto, en la gelificación. Esto es de importancia fundamental cuando la técnica se utiliza para la preparación de biogeles, ya que las moléculas biológicas son muy sensibles al medio que las rodea; por ello, el control del tiempo de gelificación es crítico para su preservación.

En el caso de la catálisis ácida, una vez que las reacciones de hidrólisis y condensación han progresado suficientemente, el medio dispersante estará constituido por un poco de agua, una fuerte proporción de alcohol (proveniente de la hidrólisis del precursor) y una alta concentración de iones  $H^+$ . Evidentemente, estas condiciones no son apropiadas para las biomoléculas. Sin embargo, si se agrega un buffer de pH ligeramente mayor o igual a 7 antes de adicionar la biomolécula, es posible evitar su desnaturalización, al menos hasta cierto grado. Por una parte, el buffer neutraliza el medio ácido y diluye el alcohol; además, la adición de sales

aunada al cambio de pH acelera fuertemente las reacciones de condensación, favoreciendo la formación de macrómeros que se agregan y finalmente coalescen dando lugar a la formación del hidrogel (Figura 1.8 pasos "b" a "c"). Durante este proceso, la molécula biológica adicionada es rápidamente rodeada por la red polimérica en crecimiento, quedando encapsulada en un poro al momento de la gelificación. Aunque el medio alcohólico, aún diluido, induce la agregación y el desplegamiento de las proteínas provocando su desnaturalización, estos efectos no se producen una vez que la molécula dopante queda atrapada en el poro, puesto que éste restringe su movimiento. Así, entre más rápido se produzca la gelificación, una vez adicionada la biomolécula, mayor es la probabilidad de preservar su conformación nativa y por lo tanto su actividad. Por otra parte, si la molécula se agrega en una etapa muy avanzada del proceso (cuando la viscosidad del sol ha aumentado considerablemente y la gelificación es inminente), no será posible lograr su adecuado encapsulamiento. [37 y 40]

Finalmente, es importante señalar que el tiempo de obtención del gel depende de muchos factores, desde la proporción inicial de los reactivos, el tipo de agitación en el proceso, la presencia de sales, el tipo de ácido utilizado, el pH, e incluso, la forma y tamaño del vaso de reacción. [46]

### 1.3.4 Maduración y secado

El proceso de maduración involucra la compresión progresiva de los poros, de manera que el tamaño de éstos se reduce irreversiblemente. En esta etapa, el esqueleto sólido se fortifica por reacciones de policondensación entre oligómeros residuales, no unidos a la red, y silanoles de superficie. Al mismo tiempo, la condensación de silanoles cercanos en las paredes de los poros produce sinéresis y expulsión de la fase líquida. La maduración se puede llevar a cabo manteniendo al hidrogel en contacto con la fase líquida en un recipiente cerrado por varios días; posteriormente, el recipiente se abre para permitir la evaporación del líquido y el secado del material. Otra alternativa consiste en dejar el recipiente abierto desde un inicio, pero a baja temperatura, para que el gel madure mientras el líquido se evapora lentamente. En ambos casos, a medida que el hidrogel se seca pasando al estado de xerogel, se produce una mayor compresión de los poros y un notable encogimiento del material.

En el caso de los biogeles, la contracción de poros durante el secado no es homogénea ya que el tamaño de los poros que contienen la molécula dopante se reduce en menor medida, adaptándose a las dimensiones de ésta. Sin embargo, para evitar un fuerte colapso de poros que pueda dañar a la biomolécula, impedir su funcionamiento correcto o limitar la difusión de los sustratos o analitos dentro del material, se recomienda realizar sólo un secado parcial del gel cuidando que la evaporación del líquido se haga muy lentamente. [37]

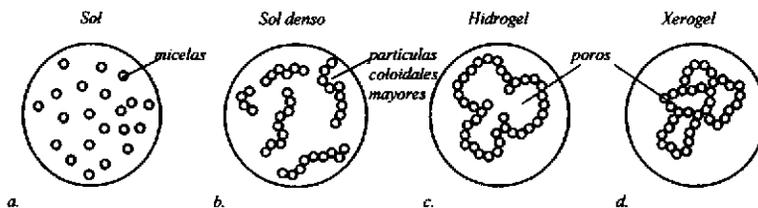


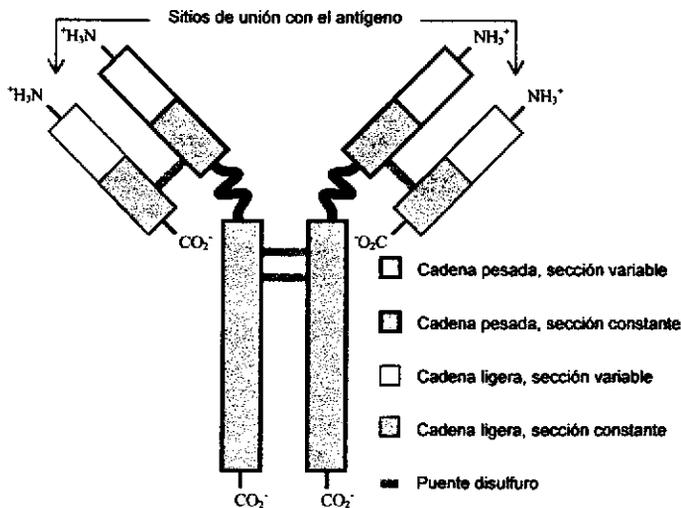
Figura 1.8 Etapas del proceso sol-gel. a. Hidrólisis y precondensación. b. Condensación. c. Gelificación. d. Maduración.

## 1.4 Anticuerpos

En esta sección se presenta un panorama global del mundo de los anticuerpos, su estructura, sus clasificaciones, la manera en que interactúan con los antígenos y su forma de producción dentro los organismos vivos. Así mismo, se describirá una de las técnicas más comunes para la preparación de anticuerpos monoclonales y se detallará el proceso seguido por un grupo de investigación europeo [7] para preparar anticuerpos monoclonales anti-carbofurano. Cabe señalar que los anticuerpos utilizados en la parte experimental del presente proyecto son los mismos que se mencionan en Refs. [7] y [21], y fueron preparados por dicho grupo.

### 1.4.1 Generalidades sobre los anticuerpos

Un anticuerpo (*Ab*) es, concretamente, una molécula proteínica altamente compleja y de gran tamaño, capaz de interaccionar de manera sumamente específica con otras moléculas denominadas *antígenos* (*Ag*). Los *Ab* forman parte de las globulinas, una clase de proteínas plasmáticas, relacionadas con el sistema inmune de los organismos, por lo que de manera genérica se les nombra como *inmunoglobulinas* (*Ig*) o  $\gamma$ -globulinas [15]. La molécula de *Ab* más simple está compuesta por cuatro cadenas polipeptídicas conectadas entre sí por enlaces disulfuro ( $-S-S-$ ), tal que en conjunto dan en apariencia la forma de la letra Y (ver *Figura 1.9*). De estas cuatro porciones, dos de ellas son más largas que las restantes. A las cadenas de mayor tamaño se les conoce como *cadenas pesadas*, mientras que a las cadenas más pequeñas se les llama comúnmente *cadenas ligeras*. La parte inferior de la molécula (base de la "Y") está constituida por una secuencia de aminoácidos que tiende a ser la misma o casi la misma en la mayoría de las inmunoglobulinas, por tanto se le conoce como *sección constante*. La secuencia de aminoácidos en la porción superior de la cadena polipeptídica puede en



*Figura 1.9* Representación esquemática de un anticuerpo. Los segmentos más importantes son las secciones variables, tanto de las cadenas pesadas como de las cadenas ligeras.

cambio, variar enormemente entre una molécula de *Ig* y otra, por lo que es conocida como *sección variable*. Es en esta sección en la cual se da la interacción específica con la molécula antigénica. Consecuentemente, una inmunoglobulina está integrada por dos cadenas pesadas que poseen tanto una sección constante como una variable, y por dos cadenas ligeras, compuestas también por sendas secciones constante y variable. [6, 14]

Dentro de la especie humana, han sido encontrados cinco tipos de cadenas pesadas ( $\gamma$ ,  $\alpha$ ,  $\mu$ ,  $\delta$  y  $\epsilon$ ) y dos tipos de cadenas ligeras ( $\kappa$  y  $\lambda$ ). Existen cinco subclases de *Ig*, que se diferencian por el tipo de cadena pesada de la cual se componen. A estas cinco subclases se les conoce como *IgG*, *IgA*, *IgM*, *IgD* e *IgE*. Sus principales características físicas se resumen en la **Tabla 1.2**.

**Tabla 1.2** Propiedades físicas de las principales inmunoglobulinas humanas.

	IgG	IgA	IgM	IgD	IgE
Peso molecular [g mol <sup>-1</sup> ]	150 000	160 000 y polímeros	900 000	185 000	200 000
Número de 4 subunidades peptídicas básicas	1	1, 2 ó 3	5	1	1
Cadenas pesadas	$\gamma$	$\alpha$	$\mu$	$\delta$	$\epsilon$
Cadenas ligeras	$\kappa + \lambda$	$\kappa + \lambda$	$\kappa + \lambda$	$\kappa + \lambda$	$\kappa + \lambda$
Valencia para unirse a los antígenos	2	2, 4 ó 6	10	2	2

Fuente: Ref. [15].

Los anticuerpos de tipo *IgA* e *IgM* están compuestos por varias moléculas de 4 subunidades peptídicas básicas (una unidad inmunoglobulínica equivale a 4 subunidades peptídicas) y se unen entre sí por péptidos de corto tamaño llamados cadenas J (de "unión", en inglés). Las *IgA* se encuentran en varias secreciones y están compuestas por una a tres unidades. Las *IgM*, secretadas al torrente sanguíneo durante una respuesta inmune primaria, están integradas por 5 unidades distribuidas en forma de anillo. Las *IgG*, *IgD* e *IgE* cada una consiste de sólo una unidad molecular de 4 polipéptidos. En cuanto a sus funciones y la ubicación dentro del ser humano, se incluye una breve descripción en la **Tabla 1.3**.

**Tabla 1.3** Ubicación y funciones de las 5 subclases de inmunoglobulinas en el ser humano.

Tipo	Ubicación	Funciones
IgA	Leche, saliva, lágrimas, secreciones digestivas y respiratorias	Proteger contra microorganismos en las partes de entrada al organismo
IgD	Linfocitos B en la sangre	Estimular a los linfocitos B para producir otros anticuerpos.
IgE	Células alérgicas en los tejidos	Sirven de receptores para los antígenos que originan el proceso de secreción de histamina y otras sustancias involucradas en procesos alérgicos
IgG	Leucocitos y macrófagos en la sangre y en el calostro materno	Se unen a las bacterias (u otras clases de antígenos) y los macrófagos simultáneamente, para ayudar a éstos en el proceso de fagocitosis; activan el complemento <sup>a</sup> ; son abundantes en la respuesta inmune secundaria; pasan de la madre al feto a través de la placenta y de la madre al recién nacido durante la lactancia primaria
IgM	Linfocitos B en la sangre	Activan el complemento en la respuesta inmune primaria

<sup>a</sup>El *complemento* es un sistema multimolecular de 11 proteínas en la sangre, de auto ensamblaje, que constituye el mediador humoral primario de la reacción antígeno-anticuerpo. El mecanismo se dispara con la presencia del complejo antígeno-anticuerpo. Fuente: Ref. [6].

La forma en la cual se unen las moléculas antigénicas con los Abs involucra interacciones de diferentes tipos. Estos pueden ser de puente de hidrógeno, de dipolo-dipolo, de tipo hidrofóbico o de enlace iónico. Ejemplos de lo anterior se pueden apreciar mejor en la

Figura 1.10. Es importante señalar que las moléculas ahí utilizadas son simples ejemplos para ilustrar

los tipos de interacción antígeno-anticuerpo posibles, ya que compuestos de semejante tamaño no son lo suficientemente grandes como para desencadenar respuesta inmune y por tanto, el proceso de generación de anticuerpos. No obstante, más adelante en el apartado 1.4.3 se hará referencia a una de las técnicas de laboratorio existentes para la producción de anticuerpos contra moléculas pequeñas.

Hasta el momento solamente se han descrito los anticuerpos desde el aspecto físico y químico, y explicado las funciones de los distintos tipos de Ig dentro de los organismos. Para completar el presente apartado será necesario dar una explicación breve sobre la forma de producción de anticuerpos en los seres vivos. Para ello se tomará como ejemplo al ser humano, sin embargo, lo que será dicho puede aplicarse también a otros mamíferos (p. ej. conejos, ratones, monos y perros).

El sistema inmune está integrado por un grupo de componentes del sistema linfático y del sistema circulatorio sanguíneo. De manera específica, la protección inmunológica está dada por los glóbulos blancos de la sangre (*linfocitos*). Los linfocitos son generados a partir de células madre presentes en la médula ósea y enviados desde ahí hacia los nódulos linfáticos, las amígdalas, el timo y el bazo, además de hallarse presentes en circulación por el torrente sanguíneo. Existen dos tipos de linfocitos, los de tipo B y los de tipo T, sin embargo, para los fines que persigue este escrito, únicamente es de interés conocer la forma de acción por parte de los del primer tipo. Los *linfocitos B* se encargan de la destrucción de las sustancias antigénicas al secretar anticuerpos contra ellas. A la liberación de anticuerpos se le llama respuesta inmune humoral y en este proceso están involucradas varias clases de células. Un antígeno es primeramente detectado por un macrófago, el cual reconoce a la molécula como extraña. Entonces el macrófago activa los *linfocitos T* los cuales a su vez estimulan a los linfocitos B para producir anticuerpos específicos contra ese antígeno. Los linfocitos B se dividen repetidamente (formación de clonas) para dar lugar a *linfocitos B plasmáticos* y *linfocitos B de*

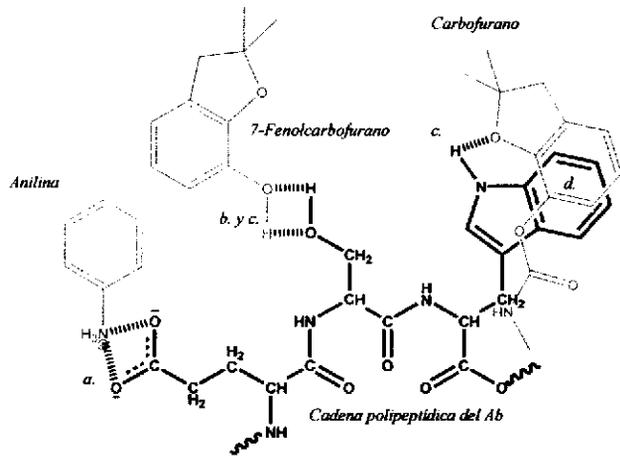
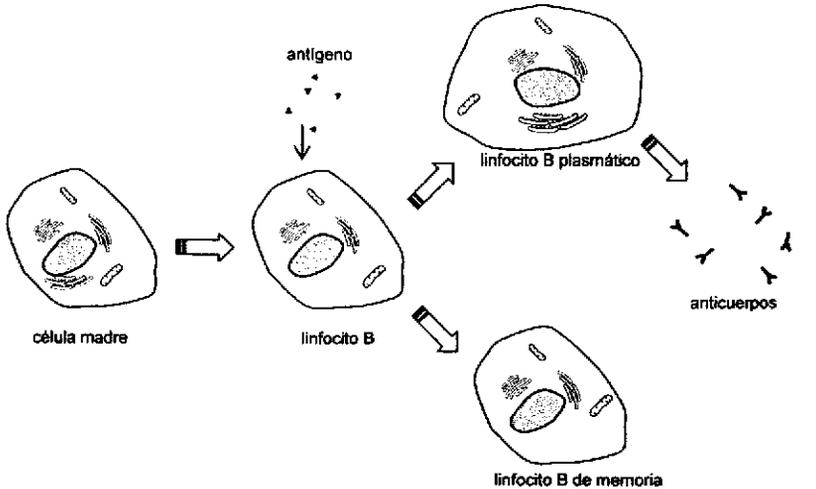


Figura 1.10 Interacciones posibles entre los aminoácidos del sitio de unión en el anticuerpo (negro-grueso) y tres moléculas distintas (gris-delgado). a. Interacción iónica, b. Enlace dipolo-dipolo, c. Puente de hidrógeno y d. Interacciones hidrofóbicas tipo  $\pi$ - $\pi$ .

*memoria* (ver *Figura 1.11*). Los primeros serán las fábricas de anticuerpos, cada célula plasmática genera anticuerpos idénticos con una rapidez de 2000 unidades por segundo durante sus 4 a 5 días de vida. Los linfocitos B de memoria permanecen alerta, preparados para apariciones futuras del mismo antígeno. Esta primera respuesta del organismo es denominada como respuesta inmune primaria. A la reacción que tiene el organismo al encontrarse nuevamente en otras ocasiones con el antígeno se le llama respuesta inmune secundaria, y en ella entran en acción directa los linfocitos B de memoria, producidos en la primera etapa. [6, 14 y 47]



*Figura 1.11* Diagrama simplificado del proceso de generación de anticuerpos dentro de un organismo.

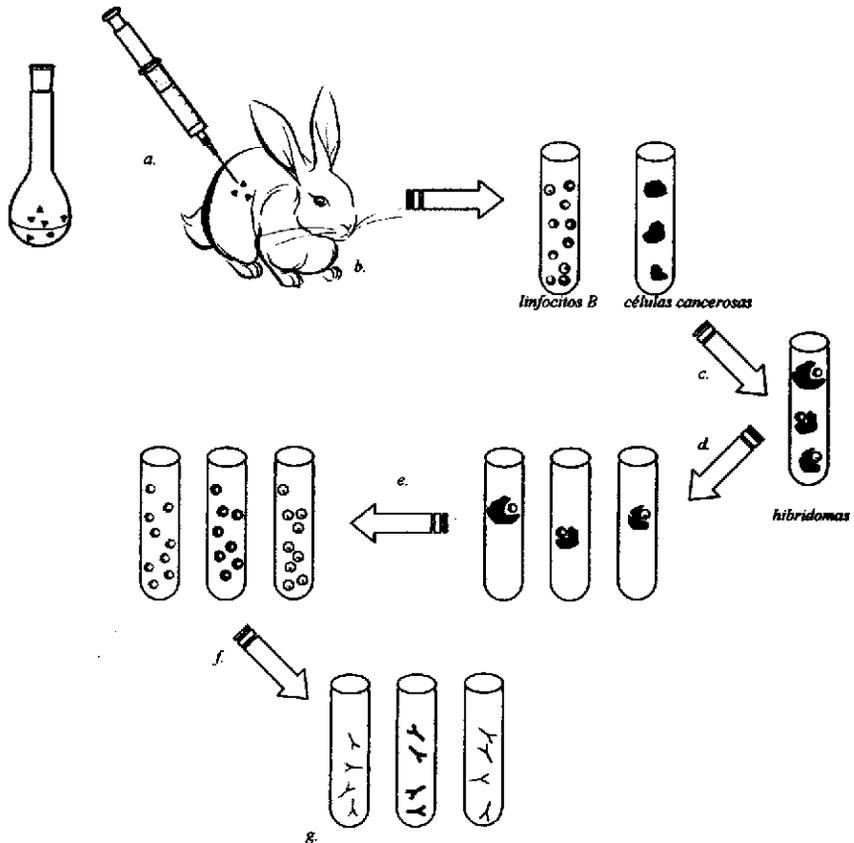
No obstante la alta especificidad de los anticuerpos contra un antígeno dado, entre ellos existirá siempre una gran heterogeneidad. Tal fenómeno se da porque en el proceso de fabricación de los anticuerpos, éstos son producidos para reconocer una parte específica del antígeno, la cual no siempre es la misma. Además, un solo tipo de anticuerpo es generado por un tipo específico de linfocito B plasmático, con lo cual se tiene una enorme variedad de anticuerpos en el organismo provenientes de un igual número de distintas células B plasmáticas. A estos anticuerpos, por provenir de distintas clonas (las células B plasmáticas) se les conoce como *anticuerpos policlonales*. [14]

#### 1.4.2 Preparación de anticuerpos monoclonales

Como se hizo mención en el apartado anterior, una sola célula linfocítica B plasmática secreta alrededor de 2000 unidades moleculares de anticuerpos idénticos. Aislar una sola célula de ese tipo significaría contar con una fábrica muy eficiente de anticuerpos puros. Sin embargo, aislar un solo linfocito B plasmático conlleva el problema de que esta clase de células no vive lo suficiente en medios de cultivo como para producir una cantidad adecuada de anticuerpos. Este problema fue resuelto de manera ingeniosa en 1975 por los investigadores británicos Cesar Milstein y Georges Köhler al desarrollar la tecnología de producción de *anticuerpos monoclonales*, razón por la que se hicieron merecedores del Premio Nobel de Medicina en 1984.

[6]

Un anticuerpo monoclonal (*MAb*) es un anticuerpo proveniente de las clonas de un solo linfocito B plasmático. La técnica en su versión más general consiste en primero inyectar al animal productor la sustancia antigénica. Seguido de ello se aíslan linfocitos B del bazo, para luego fusionarlos con células cancerígenas. Al producto de la fusión de estos dos tipos de células se le conoce como *hibridoma*. Esta nueva célula posee las ventajas de sus predecesoras, la síntesis continua de anticuerpos de los linfocitos y la reproducción prácticamente ilimitada de las células cancerígenas. La parte restante del trabajo consiste en separar los diferentes hibridomas y a partir de cada uno de ellos producir anticuerpos distintos entre sí, pero de una alta pureza (ver *Figura 1.12*). Los anticuerpos monoclonales provenientes de las distintas clonas cultivadas *in vitro* pueden ser probados de tal forma que se obtenga información con respecto a la *afinidad* individual. Ello permite evaluar la calidad de cada uno de los distintos tipos de *MAbs* producidos. La afinidad de un anticuerpo por un antígeno es la suma de todas las fuerzas involucradas en el proceso de formación del complejo *Ab-Ag*. [6, 14]



*Figura 1.12* Etapas en la preparación de anticuerpos monoclonales. *a.* Antígenos inyectados al animal productor. *b.* Producción de células B dentro del animal. *c.* Fusión de células cancerosas con células B aisladas del bazo del mismo animal. *d.* Separación. *e.* Clonación *in vitro*. *f.* Producción de anticuerpos. *g.* Anticuerpos monoclonales.

La técnica de producción de anticuerpos monoclonales ha revolucionado por completo muchos campos de la ciencia. Entre las aplicaciones actuales se cuentan desde pruebas bioquímicas y clínicas (pruebas de embarazo, enfermedades infecciosas y cáncer) hasta tratamientos inmunológicos contra el cáncer.

Actualmente se encuentra en desarrollo otra técnica más rápida para la producción de anticuerpos. Esta técnica involucra ingeniería genética. Consiste en insertar los genes codificadores para un anticuerpo de un organismo superior (ratón, mono, ser humano o cualquier otro) dentro de la secuencia genética de una bacteria. Esta novedosa técnica promete muchas ventajas sobre la técnica de *MAbs*. [6]

### 1.4.3 Anticuerpos monoclonales anti-carbofurano

Como se mencionó en el apartado 1.4.1, un organismo es incapaz de producir *Abs* contra una molécula pequeña, mientras que lo hace fácilmente si la molécula posee un tamaño del orden de una proteína. Por esta razón, al aplicar la técnica de producción de *MAbs* contra moléculas simples, es necesario introducir una pequeña variante. La molécula de menor tamaño, llamada *hapteno*, es unida químicamente a una *proteína acarreadora*, que puede ser albúmina de suero bovino (*BSA*) o cualquier otra. El conjunto hapteno-proteína acarreadora es inyectado en el animal productor para generar respuesta inmune, por lo cual se le conoce como *inmunógeno* (Figura 1.14 b). La parte restante del trabajo es la misma que la señalada en el apartado anterior e ilustrada en la Figura 1.12.

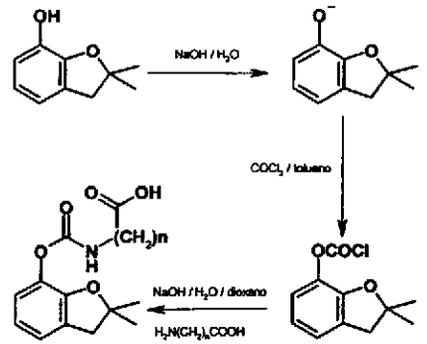


Figura 1.13 Preparación de los haptenos utilizados con mejores resultados en la producción de *MAbs*. Para el caso de los haptenos BFNP y BFNB, n vale respectivamente 2 y 3. Fuente: Ref. [7]

En años recientes, un grupo de investigación español de la Universidad Politécnica de Valencia, a cargo del Dr. Ángel Montoya Viades, ha estado trabajando en el desarrollo de *MAbs* contra diversos contaminantes, particularmente de la familia de los carbamatos. Este grupo logró producir *MAbs* anti-carbofurano usando como haptenos distintas moléculas parecidas en estructura al carbofurano (ver Figuras 1.13 y 1.14 a). Como proteína acarreadora utilizaron *BSA*, la cual unieron químicamente a los distintos haptenos por esterificación del grupo ácido. Los inmunógenos así sintetizados fueron inyectados en ratones (ver Figura 1.14 b). Los linfocitos aislados del bazo fueron fusionados con células de mieloma murino (células cancerosas) para luego seleccionar de los platos de cultivo (usando pruebas *ELISA*) aquellos hibridomas que produjeran anticuerpos anti-carbofurano. De la selección de los hibridomas apropiados, siguió el proceso de clonación de células para finalmente obtener las células productoras de *MAbs* anti-carbofurano. [7]

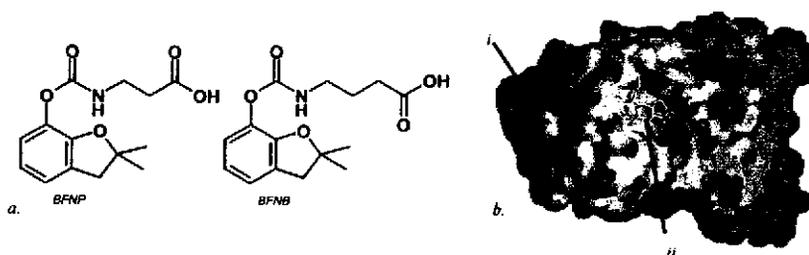


Figura 1.14 a. Haptenos utilizados con mejores resultados en la producción de *MAbs* [7]. b. Inmunógeno inyectado al animal productor –*i* proteína acarreadora, *ii* hapteno–.

El grupo mencionado, después de probar mediante *ELISAs* la capacidad de las clonas cultivadas como productoras de *MAbs* anti-*Cb* de alta afinidad, seleccionó los cuatro hibridomas con resultados más prometedores. Los 4 tipos de *MAbs* producidos por las correspondientes clonas fueron nombrados: BFNB-52, BFNB-62, BFNB-67 y BFNP-21 [7]. Estos anticuerpos son justamente la materia prima utilizada en el presente proyecto para la síntesis de inmunoabsorbentes sol-gel.

## 1.5 Hipótesis y objetivos

En las secciones 1.1 y 1.2 se ha mencionado que el principal problema en la cuantificación a niveles traza de carbofurano a partir de muestras ambientales (además también de otros pesticidas) radica en la etapa de preparación, previa al análisis vía *CLAR*, *CG*, etc. Los métodos de determinación de carbofurano involucran largas y laboriosas técnicas de preparación de muestras (apartado 1.2.1), y éstas a su vez, no son lo suficientemente selectivas. Se mencionan también en el apartado 1.2.2 los resultados de algunos grupos de trabajo que utilizaron como técnica preparativa en el análisis de muestras ambientales la extracción en fase sólida mediante inmunoabsorbentes preparados por inmovilización física de anticuerpos (técnica sol-gel), dada la mayor facilidad de preparación con respecto a la inmovilización química tradicional. Tomando esto en mente, el objetivo general del presente trabajo es preparar distintos inmunoabsorbentes utilizando los cuatro diferentes anticuerpos monoclonales anti-carbofurano señalados en la sección 1.4.3, usando la técnica de encapsulamiento sol-gel, así como la evaluación de su capacidad de retención y estabilidad en ciclos de extracción en fase sólida, con tal de ver cuál de los cuatro anticuerpos encapsulados posee las características necesarias para obtener los mejores resultados en su aplicación como inmunoabsorbente. De ello se espera que el mejor inmunoabsorbente sea altamente estable y con una baja influencia de los parámetros de carga (concentración de analito, volumen y velocidad de flujo de carga) sobre la capacidad de retención del mismo. Un inmunoabsorbente estable sería aquel que mantenga la mayor capacidad de retención (relativa) a lo largo del tiempo de uso. La influencia de la velocidad de flujo en la etapa de carga sobre la capacidad de retención permitiría demostrar diferencias en la rapidez de formación del complejo pesticida-anticuerpo: si existe menor retención a mayor flujo significa una baja rapidez de complejación y viceversa. Así también, la estabilidad del

complejo formado puede evaluarse estudiando el efecto sobre la capacidad de retención de los cartuchos a partir de la variación en la cantidad de masa de pesticida presente en la disolución de carga y/o el volumen de dicha disolución. Para comprobar tales hipótesis, así como para el cumplimiento del objetivo general se tienen los objetivos particulares indicados a continuación:

- Optimización de las condiciones cromatográficas de detección y elución requeridas para determinar el pesticida con una buena resolución tanto en disoluciones estándar como en muestras complejas.
- Evaluar la incertidumbre presente tanto en el proceso de cuantificación por *CLAR* como en el método de preconcentración de muestras acuosas en precolumnas de fase reversa.
- Determinar la actividad nativa de cada uno de los cuatro anticuerpos monoclonales suministrados para poder tener un parámetro de comparación en la afinidad inicial y además poder evaluar la pérdida de actividad en los inmunoabsorbentes debida al proceso de encapsulamiento.
- Realizar el encapsulamiento sol-gel de cada anticuerpo con tal de preparar los inmunoabsorbentes de acuerdo con protocolos ya establecidos.
- Optimizar el proceso de inmunoextracción, buscando reducir la retención no específica, así como también un eluyente que disocie por completo el complejo antígeno-anticuerpo sin causar daño irreversible sobre los anticuerpos encapsulados.
- Estudiar el efecto del tiempo y el número de veces de uso sobre la capacidad de retención de los cuatro inmunoabsorbentes preparados.
- Para cada inmunoabsorbente, evaluar el efecto de la velocidad de flujo en la etapa de carga, así como también, el efecto de la masa de pesticida y del volumen de disolución de carga (por tanto de la concentración de pesticida), esto con el objeto de tener un parámetro de comparación de la cinética y de la capacidad de enlazamiento de los cuatro anticuerpos encapsulados.

## Capítulo 2. Desarrollo experimental

### 2.1 Material y equipo

A continuación se incluye todo el material y el equipo utilizado durante la realización de la parte experimental del proyecto.

#### Equipo:

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

Bomba maestra, modelo 305.

Bomba esclava, modelo 306.

Mezclador dinámico, modelo 811B.

Módulo manométrico, modelo 805.

Inyector de rizo, Rheodyne 7125, con rizo de 25  $\mu\text{L}$ .

Válvula de conmutación de 6 puertos, Rheodyne 7000.

Columna cromatográfica (150 mm x 4.6 mm d.i.) empacada con fase reversa Hypersil ODS de 5  $\mu\text{m}$ , Thermo Hypersil-Keystone.

Precolumnas de acero (20 mm x 2 mm d.i.) empacadas con fase reversa PLRP-S (copolímero de estireno/divinilbenceno) de 10-15  $\mu\text{m}$ .

Detector espectrofotométrico UV-VIS, Shimadzu, modelo SPD-10 AV VP.

Integrador Hewlett Packard, modelo HP 3396 Series II.

Bomba isocrática Beckman, modelo 110B, con capacidad de flujo de 0.1 a 9.9  $\text{mL min}^{-1}$ .

Bomba isocrática Eldex, modelo CC-30-S, con capacidad de flujo de 0.05 a 1.50  $\text{mL min}^{-1}$ .

Purificador y desionizador de agua NANOpure, Barnstead, modelo 04747.

Baños de ultrasonido, Sonicator, modelos SC-100 y SC-50.

Potenciómetro, Corning, modelo 220.

Balanza analítica, Ohaus, modelo AP2105.

Centrífuga con capacidad de control térmico, Heraeus, modelo Biofuge PrimoR.

Sistema de empacado de columnas y precolumnas a alta presión, Haskel, modelo 3200.

Agitador mecánico, Burrell, modelo 75.

#### Material:

Cartuchos para extracción en fase sólida de 8 mL, Analytichem International.

Discos de acero inoxidable poroso, 1 cm de diámetro, 1 mm de espesor, 2  $\mu\text{m}$  de diámetro de poro.

Tubería de acero inoxidable con diámetro interno de 0.25 mm.

Jeringa de vidrio para cromatografía de 100  $\mu\text{L}$ , Microliter TM #710.

Sistema de filtración de vidrio con capacidad para 250 mL, Millipore, modelo OM027.

Tubos Centricon YM-30, Amicon Bioseparations, Millipore.

Membranas de nylon, 47 mm de diámetro con poro de 0.45  $\mu\text{m}$ , Chromatography Research Supplies.

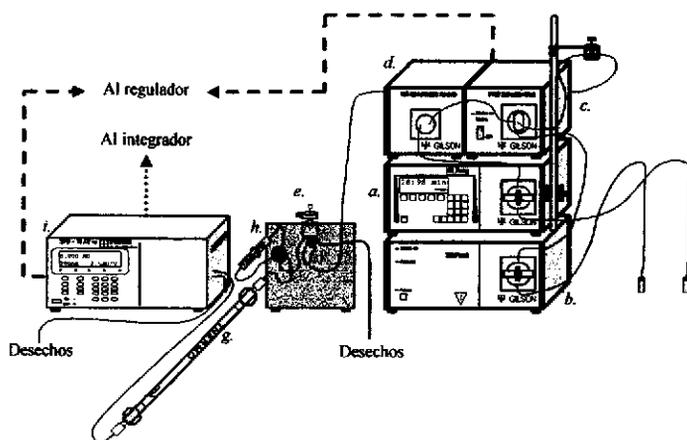
Electrodo combinado para la determinación de pH, Corning.

Micropipetas de 300  $\mu\text{L}$  y 1000  $\mu\text{L}$ , Hamilton SoftGrip TM.

Material común de laboratorio:

Pipetas volumétricas, graduadas y Pasteur, matraces volumétricos y Erlenmeyer, probetas, buretas, vasos de precipitado, tubos de ensaye, embudos de vidrio, naves de pesada, soportes, pinzas, pisetas, propipetas, jeringas de plástico, puntas para micropipeta y frascos diversos.

A continuación se presentan varias figuras que servirán de apoyo para una descripción breve de las operaciones realizadas con el equipo durante este proyecto.



**Figura 2.1** Diagrama del sistema cromatográfico. a. Bomba maestra. b. Bomba esclava. c. Mezclador dinámico. d. Módulo manométrico. e. Inyector de rizo. f. Rizo (loop). g. Columna cromatográfica. h. Válvula de conmutación con precolumna conectada. i. Detector espectrofotométrico UV-VIS.

La Figura 2.1 muestra un diagrama del sistema cromatográfico con la adaptación realizada para la elución en línea de las precolumnas de preconcentración de la muestra. La precolumna, previamente cargada con la muestra a analizar, se inserta entre dos puertos de una válvula de conmutación (puertos 1 y 4). A su vez, la válvula de conmutación está conectada al inyector (por el puerto 2) y a la columna analítica (por el puerto 3). En la posición "Carga" de la válvula, la fase móvil enviada por las bombas del cromatógrafo atraviesa el canal interno que une los puertos 2-3 sin pasar por la precolumna. Al rotar la válvula a la posición "Elución", las conexiones internas cambian quedando ahora unidos los puertos 2-1 y 4-3; de esta manera, la fase móvil entra a la precolumna (puerto 1), eluye los compuestos atrapados en ella y los transfiere en línea (puerto 4) a la columna analítica para su separación y cuantificación. Cabe mencionar que el análisis de estándares inyectados

también se realiza con la precolumna acoplada en línea a la columna analítica (e.d. posición "Elución" de la válvula de conmutación) con el objeto de que el compuesto de interés esté en contacto con ambas fases estacionarias (PLRP-S y ODS, respectivamente) y tenga el mismo comportamiento cromatográfico que en el caso del análisis de las muestras. La posición de "Carga" se utiliza para limpiar y/o equilibrar la columna analítica al finalizar una corrida; en esta etapa, se retira la precolumna anterior y se conecta una nueva precolumna cargada con muestra para el siguiente análisis. En la Figura 2.2 se presenta una ampliación de la columna analítica y de la precolumna, así como también un esquema de la válvula de conmutación en las dos posiciones señaladas anteriormente.

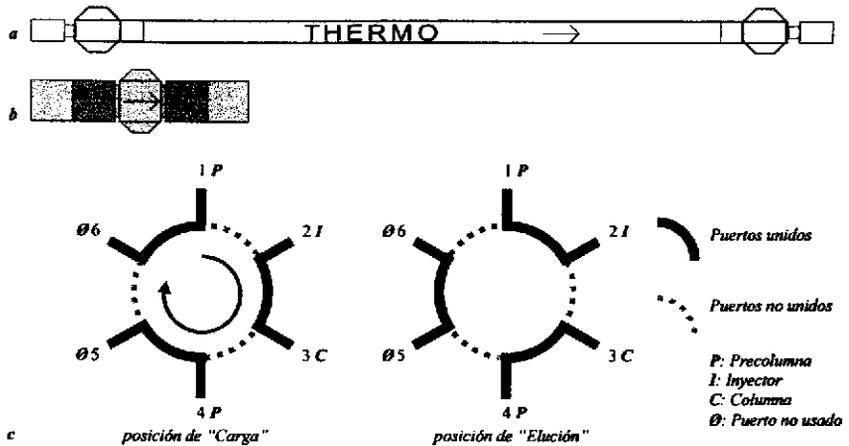


Figura 2.2 Columna analítica (a) y precolumna (b) utilizadas. Abajo (c), esquema simple de la válvula de conmutación para ambas posiciones, "Carga" y "Elución" –se incluye la numeración de los 6 puertos–.

Con respecto al integrador (Figura 2.3), es de importancia mencionar que los resultados reportados para cada pico del cromatograma registrado son los siguientes: tiempo de retención, área de pico, altura de señal, relación área/altura (estimación aproximada de la anchura del pico a la mitad de la altura), tipo de integración, % del área total (área del pico/suma de áreas de todos los picos integrados) y % de la altura total. El tipo de integración que realiza el aparato para cada pico, de acuerdo con su programa interno, está íntimamente relacionado con los picos adyacentes, el ruido de la línea base, las desviaciones positivas o negativas de ésta y los parámetros establecidos por el usuario, tales como ancho de picos y umbral de detección. Se obtienen así integraciones del tipo: base-base, base-valle, valle-valle, etc. El usuario puede modificar este parámetro para optimizar la integración de los picos de interés.

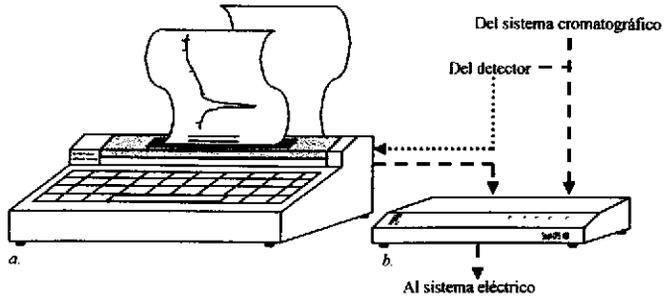


Figura 2.3 Diagrama de sección de registro de resultados y sistema eléctrico. a. Integrador. b. Regulador.

En cuanto a las dos bombas isocráticas utilizadas para los ensayos de extracción en fase sólida, los correspondientes esquemas se muestran en la Figura 2.4. La bomba Beckman modelo 110B, fue empleada para los ensayos de inmunoextracción. La bomba Eldex, modelo CC-30-S fue utilizada para la preconcentración de las disoluciones en las precolumnas.

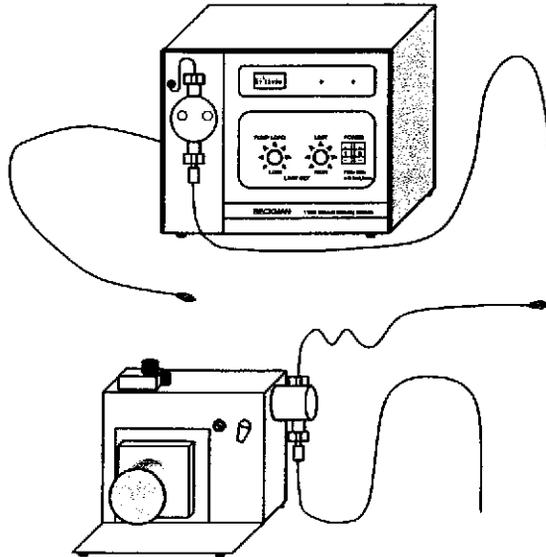


Figura 2.4 Bombas empleadas: Beckman, modelo 110B –arriba–; Eldex, modelo CC-30-S –abajo–.

## 2.2 Disoluciones, reactivos y disolventes

En esta sección se describen las características de los reactivos y disolventes utilizados, así como también se explicará brevemente la forma de preparación de todas las disoluciones que fueron requeridas.

### Reactivos:

Anticuerpos monoclonales anti-carbofurano, preparados con dos distintos haptenos, amablemente proporcionados por el Dr. Ángel Montoya Viades, de la Universidad Politécnica de Valencia.

Carbofurano, pureza del 99 %, de Chem Service.

Ácido cítrico, grado reactivo, de J.T. Baker.

Ácido clorhídrico, grado reactivo, de J.T. Baker.

Ácido perclórico, grado HPLC, de Fluka.

Ácido fosfórico, pureza del 85 %, de J.T. Baker.

Hidróxido de sodio, grado reactivo, de J.T. Baker.

Cloruro de sodio, grado reactivo, de J.T. Baker.

Cloruro de potasio, grado reactivo, de Mallinckrodt.

Fosfato monobásico de sodio, grado reactivo, de J.T. Baker.

Fosfato dibásico de sodio dodecahidratado, grado reactivo, de J.T. Baker.

Azida de sodio, grado reactivo, de Sigma-Aldrich.

Tetraetoxisilano, grado reactivo, de Fluka.

### Disolventes:

Agua destilada en el Laboratorio de Ingeniería de la Facultad de Química y desionizada mediante el purificador y desionizador de agua Nanopure.

Acetonitrilo, grado HPLC, de J.T. Baker.

Metanol, grado HPLC, de J.T. Baker.

Etanol, grado HPLC, de J.T. Baker.

### Disoluciones:

PBS 0.2 M. Cantidades apropiadas de NaCl, KCl,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  y  $\text{NaN}_3$  fueron pesadas de tal manera que la disolución resultante tuviera como composición 1.37 M, 0.027 M, 0.1 M, 0.1 M y 0.1 %m/v, respectivamente. Las disoluciones de PBS 0.1 M se prepararon por dilución 1:1 de la de PBS 0.2 M.

PBS 0.02 M pH 7. Preparada por dilución 1:10 a partir de la disolución de PBS 0.2 M, y ajustado a pH 7 con gotas de hidróxido de sodio acuoso saturado.

Disoluciones de carga para inmunoestracción. Se agregaron volúmenes por separado de la disolución de carbofurano estándar de trabajo y del recipiente con metanol puro para llevar a la marca de aforo con PBS 0.02 M tal que la concentración de carbofurano fuera la deseada y la de metanol fuera de 2 % v/v.

Disolución de lavado para inmunoestracción. Preparada de manera similar a la de carga, pero sin carbofurano y con una concentración de metanol de 4 % v/v.

Acetonitrilo 65 % v/v. Volúmenes adecuados de acetonitrilo y agua fueron medidos cada uno por separado y mezclados vigorosamente.

Metanol 65 % v/v. Volúmenes convenientes de metanol y agua fueron medidos por separado y mezclados entre sí.

Ácido cítrico 0.01 M, pH 2. Se prepararon por pesada disoluciones acuosas con una concentración de ácido cítrico de 0.01 M y el pH fue ajustado con gotas de  $\text{HClO}_4$  diluido 1:1.

Ácido cítrico 0.01 M, pH 2 (90 % v/v) con MeOH (10 % v/v). Se mezclaron volúmenes apropiados de metanol puro y de la disolución de ácido cítrico 0.01 M, pH 2.

Fase móvil A, gradiente. Preparada de forma similar a la disolución de acetonitrilo 65 % v/v, pero en este caso, con acetonitrilo al 10 % v/v en agua.

Fase móvil B, gradiente. Preparada de manera análoga a la Fase móvil A, pero con agua al 10 % v/v en acetonitrilo.

Fase móvil, isocrático 1. Composición de acetonitrilo al 23 % v/v en agua.

Fase móvil, isocrático 2. Composición de acetonitrilo al 20 % v/v en agua.

Disolución de reserva de carbofurano. Se pesó una masa adecuada de carbofurano, y se diluyó en acetonitrilo tal que la concentración fuera de 10 ppm.

Disolución estándar de trabajo de carbofurano. Preparada a partir de la disolución de reserva de carbofurano, pero diluida con agua, tal que la concentración fuera de 2 ppm en acetonitrilo al 20 %.

## 2.3 Metodología

La metodología de todo el procedimiento experimental seguido para la realización del presente proyecto se encuentra descrita de manera resumida a continuación. En primer lugar se optimizaron las condiciones cromatográficas de elución y detección. Como siguiente etapa se llevó a cabo la validación del método completo. Posteriormente se determinó la actividad nativa de los 4 distintos *MAbs*. Después se dio lugar a la preparación de los inmunoadsorbentes mediante la técnica sol-gel. Por último se efectuaron todos los ensayos de extracción en fase sólida –inmunoextracción– pertinentes variando los parámetros de carga –masa de carbofurano, volumen y flujo de carga–, optimizando sobre la marcha las condiciones de elución –eluyente y volumen de elución–.

### 2.3.1 Condiciones cromatográficas

En lo que respecta a la optimización de las condiciones cromatográficas, es necesario hacer notar que la mayor parte de la misma se llevó a cabo antes de efectuar cualquier ensayo de inmunoextracción. Este estudio incluyó la determinación de la longitud de onda de trabajo con el detector *UV-VIS* y el diseño del gradiente de elución cromatográfico. Sin embargo, durante el desarrollo del proyecto se fueron cambiando las condiciones de elución en la búsqueda constante de una mayor resolución de la señal debida al analito de interés y una mayor estabilidad en la línea base.

#### 2.3.1.1 Detección

Para establecer la longitud de onda de trabajo óptima se buscó aquella en la cual la relación  $R_{Cb}/R_{ruido}$  fuera la mayor posible, donde  $R_{Cb}$  corresponde a la respuesta del carbofurano y  $R_{ruido}$  a la respuesta ocasionada por el ruido, medidas ambas con el detector *UV-VIS* a una sensibilidad de 2.5 unidades de absorbancia  $V^{-1}$ . Para tal efecto, se hicieron mediciones de respuesta en función de longitud de onda ( $\lambda$ ), para la misma cantidad

de carbofurano estándar inyectado mediante el rizo (49.6 ng de carbofurano). Las longitudes de onda trabajadas fueron: 210 nm, 230 nm, 247 nm, 280 nm y 300 nm. No se ensayaron valores de  $\lambda$  menores debido a que la selectividad de detección disminuye y el ruido aumenta en la región de bajas longitudes de onda.

### 2.3.1.2 Elución

Durante la optimización de las condiciones de elución cromatográfica se diseñaron 2 eluciones en gradiente y 2 eluciones isocráticas. La descripción de las fases móviles ( $F_m$ ) finalmente adoptadas puede verse de manera completa en la Tabla 2.1, mientras que una apreciación gráfica de los dos distintos gradientes se muestra en la Figura 2.5.

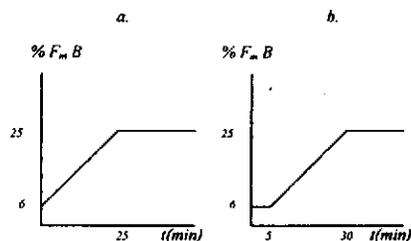


Figura 2.5 Optimización de condiciones cromatográficas.

a. Diagrama de elución gradiente 1, porcentaje de fase móvil B en función del tiempo. b. Diagrama de elución gradiente 2, porcentaje de fase móvil B en función del tiempo.

Tabla 2.1 Fases móviles probadas durante la búsqueda de una elución óptima.

Fase móvil	Gradiente		Isocrática	
	Gradiente 1:	Gradiente 2:	Isocrática 1:	Isocrática 2:
	$F_m$ A	$F_m$ A		
	MeCN 10%	MeCN 10%	MeCN 23%	MeCN 20%
	H <sub>2</sub> O 90%	H <sub>2</sub> O 90%	H <sub>2</sub> O 77%	H <sub>2</sub> O 80%
	$F_m$ B	$F_m$ B		
	MeCN 90%	MeCN 90%		
	H <sub>2</sub> O 10%	H <sub>2</sub> O 10%		
Descripción	t	%B	t	%B
	0	6	0	6
	25	25	5	6
	60	25	30	25
			60	25

### 2.3.2 Validación del método

Esta etapa consistió en evaluar la incertidumbre presente tanto en el proceso de cuantificación por cromatografía líquida de alta resolución, como aquella debida al método de preconcentración de muestras en precolumnas. También se cuantificó el grado de hidrólisis del pesticida tras 24 h en disoluciones similares a las de carga y de elución en EFS con ISs.

### 2.3.2.1 Incertidumbre en la determinación cromatográfica

Esta incertidumbre es debida básicamente a la variabilidad en la respuesta del detector y en la integración del pico del analito. Su evaluación se realizó considerando 3 distintos factores: a) la variación de área entre distintos días, b) la variación de área dentro del mismo día y c) la variación de área en función de la cantidad de analito inyectado el mismo día. En lo que respecta al caso a, se tomaron los resultados de integración de los cromatogramas obtenidos en distintos días a partir del análisis de una cantidad fija (49.6 ng) de carbofurano estándar inyectado. Ésto fue efectuado con cada una de las cuatro condiciones de elución. Para el caso b, se hicieron inyecciones consecutivas de 49.6 ng del estándar de carbofurano empleando las dos eluciones isocráticas descritas en la **Tabla 2.1**. Por último, en cuanto al caso c, se inyectaron y analizaron consecutivamente el mismo día cuatro distintas masas de carbofurano, 4.96 ng, 24.8 ng, 49.6 ng y 248 ng, en este orden, de tal forma que se tuviera una curva de área de pico en función de la masa inyectada de carbofurano. Esto se realizó empleando las dos condiciones de elución isocrática y repitiendo la obtención de la curva en cuatro ocasiones distintas (2 curvas con cada condición).

### 2.3.2.2 Incertidumbre en el método

Para evaluar la incertidumbre asociada al método se preconcentraron en distintas precolumnas cuatro diferentes cantidades de carbofurano. Las cantidades de carbofurano preconcentradas fueron 6 ng, 10 ng, 20 ng y 50 ng, que a su vez se hallaban previamente disueltas en 50 mL de ácido cítrico 0.01 M pH 2. El proceso de carga en precolumna seguido fue el mismo que se encuentra descrito más adelante en el inciso 2.3.5.2. Posteriormente a la preconcentración de las disoluciones en las precolumnas, éstas se eluyeron en línea con la columna analítica, para obtener una curva de área de pico en función de la cantidad de carbofurano cargado en precolumna. Tal proceso se realizó por cuadruplicado, utilizando en las dos primeras ocasiones la Elución Isocrática 1 y en las dos restantes la Elución Isocrática 2 (ver **Tabla 2.1**).

### 2.3.3 Actividad nativa de los anticuerpos

Los anticuerpos monoclonales (1 mg de cada uno) fueron suministrados en la forma de una suspensión de la biomolécula precipitada en sulfato amónico al 50 % de saturación (~2 M) en agua. Estas condiciones permiten mantener estable al anticuerpo por largos periodos de tiempo. Sin embargo, para su utilización es necesario eliminar previamente el sulfato amónico y redissolver el anticuerpo en PBS.

Los diferentes pasos del procedimiento abajo descrito se realizaron utilizando los tubos *Centricon* YM-30. Estos consisten de dos secciones ensambladas; la primera contiene en su extremo inferior interno una membrana de poro finísimo y termina por un vástago al cual se adapta la segunda sección, que es simplemente un tubo de polipropileno cerrado en su extremo inferior. Cuando una solución se vierte en el tubo de arriba, permanece ahí a menos que se aplique una fuerza, como la centrifugación. En dicho caso, la solución atraviesa la membrana y es colectada en el tubo inferior; sin embargo, cualquier soluto de masa superior a 30,000 Dalton es retenido por la membrana.

La primera parte del procedimiento consistió, de hecho en la preparación del anticuerpo (eliminación del sulfato amónico). Para ello, se vertió la suspensión en el tubo *Centricon* y se sometió a centrifugación a temperatura controlada (4 °C) hasta que la mayor parte del líquido atravesó la membrana. El retenido se lavó por duplicado con agua destilada y desionizada centrifugando entre cada lavado. Finalmente, se agregó 1 mL

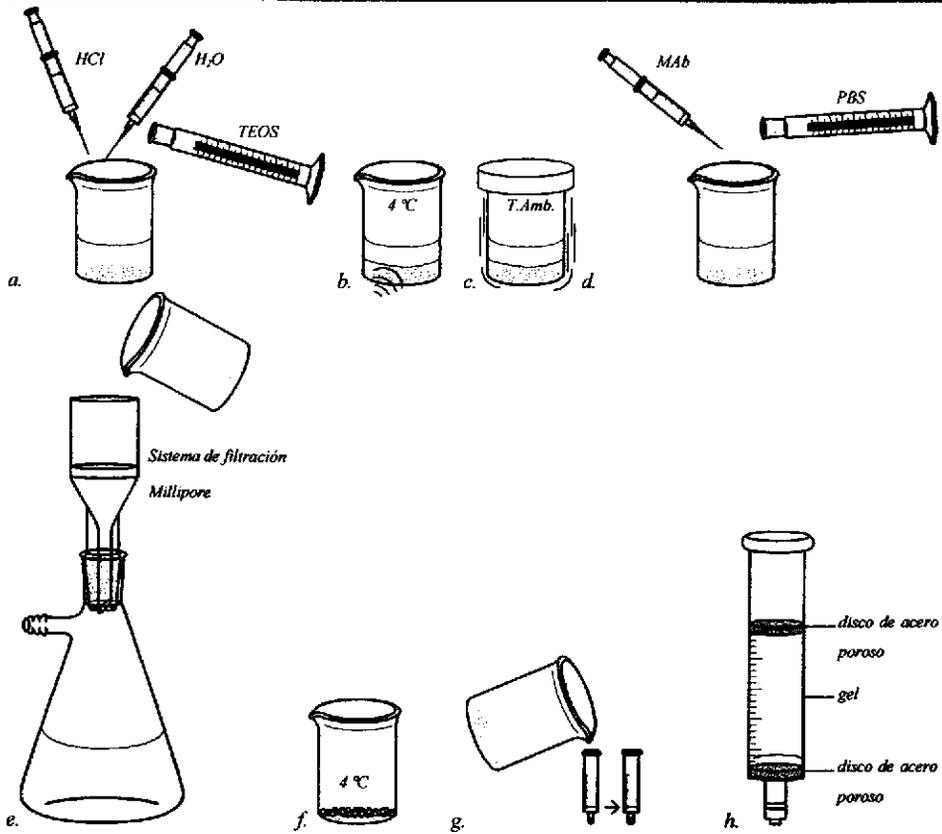
de PBS 0.02 M al tubo, resuspendiendo cuidadosamente el anticuerpo retenido con ayuda de una pipeta Pasteur. Con esta misma pipeta se retiró la solución de anticuerpo del tubo *Centricon* y se transfirió a un vial. La concentración del *MAb* en la disolución final fue de  $\sim 1 \text{ mg mL}^{-1}$ .

La segunda parte del procedimiento es propiamente la referida a la estimación de actividad nativa del anticuerpo. En un nuevo tubo *Centricon* se colocó una alícuota de 50  $\mu\text{L}$  de la disolución de anticuerpo ( $\sim 50 \mu\text{g}$ ), una alícuota de 140  $\mu\text{L}$  de disolución estándar de carbofurano de concentración 1 ppm (140 ng) y 1 mL de una mezcla MeCN-PBS 0.02 M 2:98 (v/v) y se dejó incubar a temperatura ambiente por 30 min. Posteriormente, se centrifugó a temperatura controlada de 4 °C hasta que la mayor parte del sobrenadante pasó a la sección inferior del tubo. En seguida el retenido se lavó con 2 x 350  $\mu\text{L}$  de la mezcla MeCN-PBS, centrifugando entre cada lavado. Los efluentes recuperados (incluyendo los del lavado) se mezclaron y se cargaron en una precolumna, la cual fue después conectada al sistema cromatográfico y eluida en línea. De esta manera se determinó la cantidad de carbofurano en los efluentes colectados y por diferencia con la cantidad adicionada se pudo estimar la cantidad de carbofurano complejado con el anticuerpo y, por tanto, la actividad de este último.

### 2.3.4 Preparación de los inmunoabsorbentes

La preparación de los inmunoabsorbentes se llevó a cabo por la técnica sol-gel (descrita en el capítulo 1), adaptada para el encapsulamiento de biomoléculas de acuerdo con los resultados de trabajos previos (Refs. [4], [39] y [46]).

El proceso de encapsulamiento de los anticuerpos puede ser dividido en cuatro distintas etapas: *a*) preparación del sol, *b*) gelificación y encapsulamiento del *MAb*, *c*) maduración y secado del inmunoabsorbente y *d*) empaçado. La etapa *a* consistió primero en mezclar 2.5 mL de TEOS, 0.1 mL de HCl 0.1 M y 0.4 mL de H<sub>2</sub>O (ver *Figura 2.6 a.*). La mezcla se sometió a sonificado por 30 minutos en baño de hielo, para luego, dejarla en agitación por varias horas a temperatura ambiente (ver *Figura 2.6 b. y c.*). La etapa *b* dio inicio al observar la homogeneización de las dos fases presentes inicialmente (fase orgánica y fase acuosa). En este momento se suspendió la agitación de la mezcla y le fueron agregados, bajo agitación manual vigorosa, 2 mL de PBS 0.1 M e inmediatamente después la cantidad deseada de anticuerpo a encapsular (ver *Figura 2.6 d.*). La gelificación ocurrió en  $\sim 5$  min. Posteriormente se dejó en reposo el gel formado por 10 minutos, se fragmentó con una espátula y se lavó, consecutivamente, con MeCN-H<sub>2</sub>O 65:35 v/v, PBS 0.01 M, agua abundante y por último nuevamente PBS 0.01 M, utilizando para ello el sistema de filtración al vacío *Millipore* (ver *Figura 2.6 e.*). En la etapa *c*, el gel previamente pesado se sometió a un secado lento en refrigeración hasta pérdida del 50 % de su peso inicial, permitiéndose así la maduración del mismo (ver *Figura 2.6 f.*). Como última etapa (*d*), el xerogel obtenido se molió en mortero, se resuspendió en PBS 0.02 M y se empaçado en un cartucho para extracción en fase sólida de 8 mL, colocando dos discos de acero poroso en ambos extremos del cartucho para retener el empaçado (ver *Figura 2.6 g. y h.*). Una vez empaçado, el inmunoabsorbente se mantuvo siempre inmerso en PBS y en refrigeración cuando no estaba en uso.



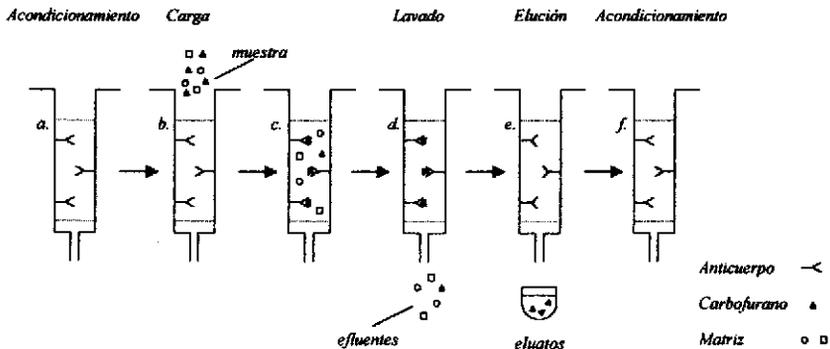
**Figura 2.6** Proceso de encapsulamiento sol-gel aplicado a anticuerpos monoclonales. *a.* Mezcla de TEOS, HCl y H<sub>2</sub>O. *b.* Sonicación a baja temperatura. *c.* Agitación constante. *d.* Encapsulamiento del anticuerpo. *e.* Filtrado del gel. *f.* Maduración y secado a baja temperatura (4 °C). *g.* Empacado. *h.* Cartucho de inmunoadsorbente listo.

### 2.3.5 Proceso de extracción en fase sólida

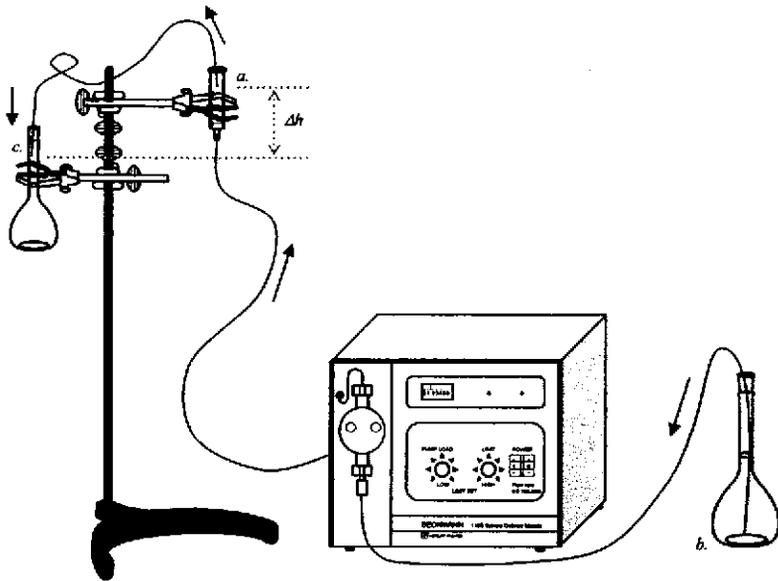
El proceso de extracción en fase sólida utilizado en este trabajo consistió de dos etapas. En la primera etapa se efectuó la inmunoestracción de carbofurano utilizando los cartuchos de inmunoadsorbente. En la segunda, las disoluciones pasadas a través del cartucho de inmunoadsorbente fueron preconcentradas en precolumnas, para su posterior elución en línea con la columna analítica, permitiendo esto último la cuantificación del pesticida.

2.3.5.1 Inmunoextracción

Con respecto a la etapa de inmunoextracción, ésta puede dividirse en 5 pasos, independientemente de la composición de las disoluciones a trabajar (ver *Figura 2.7*). En primer lugar se tiene el paso de  *acondicionamiento*, que consistió en hacer pasar por el cartucho 10 mL de una disolución de PBS 0.02 M pH 7 a un flujo de 1 mL min<sup>-1</sup>. El segundo paso es el de *carga*, en el cual se hicieron pasar disoluciones de PBS 0.02 M pH 7 con MeOH al 2 %, v/v, dopadas con carbofurano. La disolución de carga fue preparada de distintas maneras en función del factor a analizar ya sea el efecto de la masa de carbofurano, o bien, el efecto del volumen de carga sobre la retención. Para el estudio del primer efecto, las disoluciones de carga preparadas contuvieron distintas cantidades del pesticida, disuelto en un mismo volumen. En el caso del estudio del segundo efecto, se prepararon diferentes volúmenes de disoluciones de carga con una misma masa de pesticida disuelta en cada una de ellas. También se hicieron ensayos variando la velocidad de flujo durante la carga para evaluar el efecto de este parámetro sobre la retención. En el paso de *lavado*, el tercero en el orden seguido, se pasaron 5 mL de PBS 0.02 M pH 7 con MeOH al 4 % v/v a un flujo de 1 mL min<sup>-1</sup>, esto con el objetivo de eliminar el pesticida retenido de manera no-específica. En el siguiente paso, de *elución*, se ensayaron distintas fases de elución con tal de encontrar aquella que tuviera un mínimo efecto desnaturalizante sobre el anticuerpo y fuera capaz de eluir al pesticida del inmunoadsorbente. Las disoluciones ensayadas fueron 6 a 8 mL de MeCN-H<sub>2</sub>O 65:35 v/v para los primeros ensayos, posteriormente se probaron distintos volúmenes de una disolución de ácido cítrico 0.01 M pH 2, finalmente se experimentó con 25, 40 y 50 mL de una mezcla de MeOH-ácido cítrico 0.01 M pH 2, 10:90 v/v. En todos los casos la velocidad de flujo durante la elución fue de 1 mL min<sup>-1</sup>. Posteriormente a la elución se aplicó un segundo lavado con 2 mL de agua con tal de disminuir la concentración del eluyente dentro del gel. El último paso de  *acondicionamiento* con PBS 0.02 M permitió dar inicio al proceso de regeneración de los inmunoadsorbentes para que pudieran estar en condiciones de ser utilizados nuevamente en otro ciclo de *EFS*.



*Figura 2.7* Esquema simplificado del proceso de extracción en fase sólida mediante el uso de los inmunoadsorbentes preparados. *a.* Acondicionamiento inicial del IS (PBS). *b.* y *c.* Carga con analito (PBS, *Cb*, MeOH 2 %). *d.* Lavado (PBS, MeOH 4 %). *e.* Elución (distintos eluyentes utilizados). *f.* Acondicionamiento final del IS (PBS).



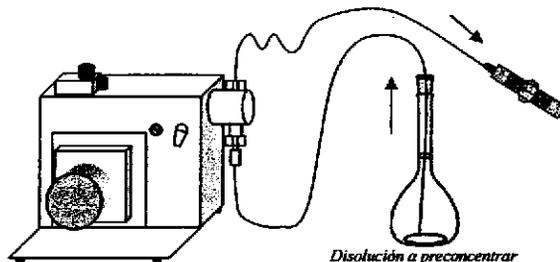
**Figura 2.8** Esquemización del sistema completo para llevar a cabo ensayos de inmunoeextracción. *a.* Cartucho de IS. Etapa de carga; *b.* Disolución de carga; *c.* Efluentes. Etapa de elución: *b.* Eluyente; *c.* Eluatos. La dirección del flujo está señalada por las flechas.  $\Delta h$  corresponde a la diferencia de alturas que controla el flujo de salida de los efluentes.

En el proceso de inmunoeextracción se utilizó el sistema mostrado en la *Figura 2.8*. El flujo de las disoluciones percoladas a través de los cartuchos fue controlado mediante la bomba Beckman 110 B señalada en la misma figura. La recuperación de los efluentes del cartucho fue realizada aplicando el principio físico del “efecto sifón” con una manguera colocada en la parte superior del cartucho. Primero se adaptó una jeringa a la salida de la manguera de recuperación para inducir por vacío el inicio del desplazamiento del líquido a lo largo del tubo. Después la manguera se transfirió a un matraz aforado, cuya altura se ajustó con respecto al cartucho para controlar la velocidad de trasvasado del efluente, ajustándola al flujo particular empleado en el ensayo. Esto permitió semi-automatizar el proceso de recuperación de disoluciones, lo que resultó muy conveniente en el caso de experimentos con grandes volúmenes (hasta 200 mL a 1 mL min<sup>-1</sup>) o volúmenes pequeños a bajos flujos (como 50 mL a 0.5 mL min<sup>-1</sup>).

Todos los experimentos de inmunoeextracción se realizaron haciendo fluir las distintas disoluciones de abajo hacia arriba del cartucho. De esta manera todo el adsorbente entra en contacto con el líquido percolado, evitando la formación de canales de flujo preferentes. Además, también se evita la compactación del empaque, y su consecuente pérdida de permeabilidad, la cual ocurre comúnmente cuando el líquido es percolado de arriba hacia abajo con aplicación de una fuerza (p.ej. mediante un pistón).

### 2.3.5.2 Preconcentración en precolumnas

Después de la etapa de inmunoeextracción, las disoluciones recuperadas se preconcentraron en pequeñas precolumnas de acero inoxidable empacadas con fase reversa polimérica. Las disoluciones a preconcentrar se hicieron pasar por las precolumnas con la ayuda de la bomba CC-30-S, a un flujo de  $1.5 \text{ mL min}^{-1}$ . Después de esto, salvo en el caso de determinación de actividad nativa, se prosiguió con dos lavados consecutivos. El primer lavado fue con 6 mL de MeOH-H<sub>2</sub>O en proporción 10:90 v/v, mientras que el segundo lavado consistió de 4 mL de agua desionizada. El sistema utilizado puede apreciarse de manera detallada en la *Figura 2.9*.



*Figura 2.9* Esquematación del sistema para preconcentrar las disoluciones en las precolumnas. La dirección del flujo está señalada por las flechas.

### 2.3.5.3 Estudio de retención no específica

Este estudio se realizó previo a los ensayos de inmunoeextracción para determinar la composición adecuada de las disoluciones de carga y lavado de modo a evitar la retención no específica del compuesto de interés. Para ello se utilizó un cartucho empacado con un "gel blanco", el cual fue preparado de la misma manera que el inmunoadsorbente pero sin anticuerpo. A través de este cartucho se percolaron diferentes volúmenes (5 a 25 mL) de disoluciones de carbofurano en PBS 0.02 M con distintos contenidos de metanol (0 a 5 % v/v). Después de cada experimento el cartucho se eluyó con 3 mL de una fase fuerte (mezcla MeCN-H<sub>2</sub>O 65:35 v/v) y el eluato se diluyó a 50 mL con agua. Finalmente, el eluato diluido se preconcentró en una precolumna y se analizó en línea por cromatografía de líquidos.

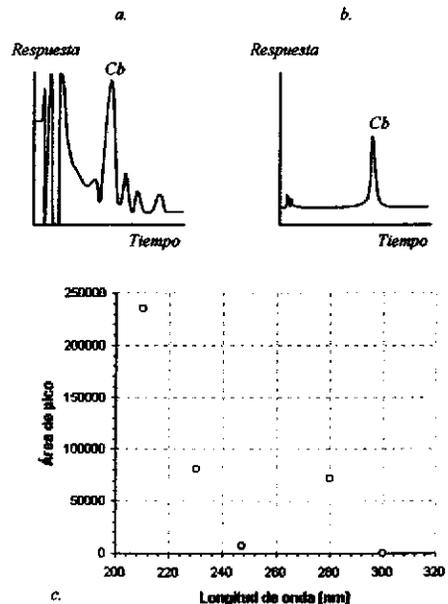
## Capítulo 3. Resultados y discusión

### 3.1 Condiciones cromatográficas

En este subcapítulo se mencionan los resultados obtenidos a partir de los experimentos realizados durante la búsqueda de las condiciones de elución y detección óptimas. En el primer apartado se señala el valor de longitud de onda y sensibilidad del detector que, en conjunto, demostraron permitir una mejor resolución del pico de carbofurano con respecto al ruido de la línea base. En el siguiente y último apartado se describe el diseño de las eluciones en gradiente y la composición de las eluciones isocráticas. Cabe señalar que tales condiciones fueron ensayadas buscando obtener tanto una estabilidad adecuada de la línea base como también una buena resolución del pico del analito con respecto a los picos interferentes.

#### 3.1.1 Detección

De acuerdo con los resultados obtenidos, el valor de longitud de onda que permitió obtener simultáneamente una línea base estable y ausencia de interferencias sobre el pico correspondiente al carbofurano por parte del ruido fue 280 nm. La sensibilidad del detector requerida para obtener una señal capaz de ser medida correctamente fue de  $2.5 \text{ AU V}^{-1}$ . Es importante destacar que con valores de  $\lambda$  de 210 y 230 nm se presentó una mayor área de pico del carbofurano, sin embargo, las fluctuaciones de la línea base en esas condiciones no permitieron obtener una resolución apropiada. Esto último se debe a que el ruido aumenta en la región de bajas longitudes de onda, aunado también a una merma en la selectividad de detección. En la *Figura 3.1* se incluyen dos ejemplos ilustrativos de los cromatogramas obtenidos a dos valores de  $\lambda$ , 210 y 280 nm, en los cuales queda evidenciado lo anteriormente mencionado. También se incluye en dicha figura el gráfico de área



*Figura 3.1* Optimización de condiciones cromatográficas.

- Respuesta en función del tiempo a 210 nm.
- Respuesta en función del tiempo a 280 nm.
- Gráfico de área de pico en función de  $\lambda$ .

que queda evidenciado lo anteriormente mencionado. También se incluye en dicha figura el gráfico de área

de pico en función del valor de  $\lambda$  de detección probado. Con el objeto de tener poca contribución sobre las fluctuaciones de la línea base por parte de la fase móvil, se optó por emplear elución isocrática de acetonitrilo/agua/HClO<sub>4</sub>. La proporción MeCN-H<sub>2</sub>O fue de 18:82 v/v con HClO<sub>4</sub> 0.01 M, composición determinada gracias a ensayos hechos tiempo atrás por parte del equipo de trabajo de la Dra. Vera. Sin embargo, tras el establecimiento de la  $\lambda$  de trabajo, se pudo apreciar que la ausencia de HClO<sub>4</sub> en esas nuevas condiciones no ocasionaba cambios sobre el comportamiento cromatográfico del pesticida.

### 3.1.2 Elución

La primera fase móvil ensayada fue de tipo gradiente. Se eligió dar inicio con tal forma de elución debido a que los cromatogramas de las disoluciones de trabajo (preconcentradas en precolumnas y eluidas en línea con la columna analítica) presentan un mayor número de picos interferentes en comparación con las muestras inyectadas<sup>a</sup>. Por tanto, dado que cualquier elución en gradiente permite obtener mejores resoluciones en menores tiempos de análisis con respecto a eluciones isocráticas, se diseñó el Gradiente 1 como primera opción<sup>b</sup>. En ensayos posteriores con disoluciones de trabajo pudo observarse que en ocasiones no era posible obtener resoluciones adecuadas<sup>c</sup>. Esta razón fue suficiente para que se decidiera rediseñar el gradiente de elución y utilizar como nueva opción el Gradiente 2<sup>d</sup>. En este caso, el factor de capacidad del C<sub>b</sub> mostró un aumento de casi 5 unidades respecto al valor correspondiente en el primer gradiente. Por otro lado, la resolución del pico de interés con respecto a los picos interferentes no aumentó en grado notable<sup>e</sup>. Tras estos resultados poco favorables, se decidió utilizar como eluyente una fase móvil de composición isocrática. La fase móvil Isocrática 1<sup>f</sup> permitió obtener cromatogramas con mayor grado de reproducibilidad y estabilidad en la línea base dentro del intervalo de tiempo correspondiente al t<sub>r</sub>' del pico de C<sub>b</sub>. Además, el factor de capacidad del analito disminuyó en casi 10 unidades respecto al valor correspondiente obtenido en las eluciones en Gradiente 2<sup>g</sup>, lo cual también permitió disminuir el tiempo de análisis cromatográfico. Sin embargo, los valores de resolución del pico de interés ( $R_{x1/Cb}$  y  $R_{Cb/x2}$ ) disminuyeron respecto a los valores que se obtuvieron con el Gradiente 2<sup>h</sup>. Como solución al problema anterior se propuso disminuir la proporción de acetonitrilo-agua de 23:77 v/v a 20:80 v/v (fase móvil Isocrática 2<sup>i</sup>), con el objeto de que la fuerza de elución de la fase móvil fuera menor y, con ello, aumentar la separación de todos los picos cromatográficos. Tal cambio repercutió en un aumento del valor de k' de C<sub>b</sub> en más de 10 unidades con respecto al valor de k' en Isocrático 1. De la misma forma, el tiempo de análisis se extendió por 14 minutos más<sup>j</sup>. En cuanto a la resolución obtenida con la elución Isocrática 2 puede apreciarse que, de acuerdo con los resultados expuestos en la Tabla 3.1, es la única forma de elución que permite obtener ambos valores de resolución ( $R_{x1/Cb}$  y  $R_{Cb/x2}$ ) mayores que 1.5<sup>k</sup>. Además de las ventajas señaladas (excepto el mayor tiempo de análisis), la línea base es sorprendentemente estable y repetible, no solamente dentro del intervalo de tiempo de elución para el C<sub>b</sub>, sino

<sup>a</sup> Compárense cromatogramas C.1 y C.2 en el Anexo.

<sup>b</sup> Ver Tabla 2.1 y Figura 2.5 a.

<sup>c</sup> Ver cromatograma C.3 y en Tabla 3.1, valor de  $R_{x1/Cb}$  para Gradiente 1.

<sup>d</sup> Ver descripción completa en Tabla 2.1 y Figura 2.5 b.

<sup>e</sup> Comparar en Tabla 3.1 valores de k',  $R_{x1/Cb}$  y  $R_{Cb/x2}$  para gradientes 1 y 2. Ver cromatogramas C.6 y C.7.

<sup>f</sup> Ver composición en Tabla 2.1.

<sup>g</sup> Ver cromatogramas C.10 y C.11 y comparar valores de k' para Gradiente 2 e Isocrático 1 en Tabla 3.1.

<sup>h</sup> Comparar valores de  $R_{x1/Cb}$  y  $R_{Cb/x2}$  para Gradiente 2 e Isocrático 1 en Tabla 3.1.

<sup>i</sup> Ver Tabla 3.1, valores de k' en isocráticos 1 y 2. Ver cromatogramas C.14 y C.15.

<sup>j</sup> Valor conveniente para análisis cromatográfico cuantitativo.

en todo el tiempo de análisis cromatográfico<sup>a</sup>, sobre todo después de que ha salido el frente de disolvente (esto sucede a un  $t_r'$  menor que 10 minutos, aproximadamente).

El valor de tiempo muerto observado para cada cromatograma permitió calcular los valores de factor de capacidad para el analito,  $k'_{Cb}$ <sup>b</sup>. Estos valores se determinaron tanto para los casos de inyección de carbofurano estándar con elución en línea precolumna–columna analítica ( $k'_{Cb\ s/inj}$ ), como para aquellos casos de elución de precolumnas con muestras previamente preconcentradas ( $k'_{Cb\ PLRP}$ )<sup>c</sup>. Esto último permitió llevar a cabo la identificación del pico de carbofurano en los cromatogramas de las muestras. Pese a que se observó una pequeña diferencia entre  $k'_{Cb\ s/inj}$  y  $k'_{Cb\ PLRP}$  dentro de cada forma de elución particular, tal discrepancia se mantuvo constante para cada uno de los 4 casos señalados en la **Tabla 3.1**. Como ejemplo ilustrativo se tiene el caso de los cromatogramas C.3 y C.8. En tales cromatogramas, la identificación de los picos correspondientes al pesticida se realizó tomando como referencia los valores de  $k'_{Cb\ s/inj}$  correspondientes a los cromatogramas C.1 y C.4, respectivamente.

**Tabla 3.1** Valores de tiempo muerto, factor de capacidad del analito y resolución del pico de interés con respecto a los picos interferentes a menor y mayor tiempo de retención para cada fase móvil probada.

Fase móvil	Gradiente 1	Gradiente 2	Isocrática 1	Isocrática 2
$k'_{Cb\ s/inj}$	20.4 (0.14)	25.7 (0.11)	17.4 (0.29)	28.9 (0.26)
$k'_{Cb\ PLRP}$	19.8 (0.09)	25.3 (0.08)	16.9 (0.21)	28.4 (0.32)
$R_{r1/Cb}$ *	0.63	0.93	0.69	2.10
$R_{Cb/2}$ *	2.57	2.63	2.08	2.28
$t_m\ global$ [min]	1.24 (0.212)			

*Notas:*  $t_m\ global$ , tiempo muerto promedio con precolumna en línea ( $\alpha = 0.05$ ,  $n = 20$ );  $k'_{Cb\ s/inj}$ , factor de capacidad de *Cb* estándar inyectado con precolumna en línea ( $\alpha = 0.05$ ,  $n = 17, 49, 9, 26$ , respectivamente para cada columna);  $k'_{Cb\ PLRP}$ , factor de capacidad de *Cb* eluido de precolumna ( $\alpha = 0.05$ ,  $n = 41, 70, 2, 24$ , respectivamente para cada columna), ver **ec. B.7**;  $R_{r1/Cb}$ , resolución entre *Cb* y el pico anterior;  $R_{Cb/2}$ , resolución entre *Cb* y el pico posterior (ver **ec. B.8**).

\* Los valores de R fueron calculados a partir de cromatogramas de eluatos de *EFS* con *ISS*.

### 3.2 Validación del método

Para estimar el grado de confiabilidad de los resultados se realizaron los experimentos expuestos en este subcapítulo. La validación del método incluye dos secciones, como se describió brevemente en el apartado 2.3.2. La primera sección se destinó a la evaluación de la incertidumbre en la determinación cromatográfica. Por otro lado, la segunda sección se realizó para estimar la incertidumbre asociada al método. Los resultados numéricos obtenidos se trataron estadísticamente con tal de poder tener finalmente una correcta valoración del grado de incertidumbre total asociado a los resultados observados en *EFS* con los *ISS* preparados.

<sup>a</sup> Ver y comparar cromatogramas C.14 y C.15 en el Anexo.

<sup>b</sup> Ver ecuación B.7 en el Anexo.

<sup>c</sup> Ver **Tabla 3.1**.

3.2.1 Incertidumbre en la determinación cromatográfica

En la **Tabla 3.2** se incluyen los resultados estadísticos de integración de cromatogramas obtenidos en distintos días (sección superior) y en el mismo día (sección inferior) a partir del análisis de una cantidad fija (49.6 ng) de carbofurano estándar inyectado, con cada una de las cuatro condiciones de elución. La sección de resultados de variación del área entre distintos días muestra la dispersión de las áreas de los picos de inyecciones hechas en días distintos, para cada una de las condiciones de elución utilizadas. Los resultados de variación del área del pico de pesticida inyectado dentro del mismo día, permiten cuantificar la precisión en el área del pico en inyecciones consecutivas, para las dos condiciones de elución isocrática. Los parámetros que permiten evaluar el grado de dispersión de los valores de área es el intervalo de confianza (expresado como IC e IC %) y el coeficiente de variación (CV %). De estos valores, el que aporta información con un mayor grado de validez es IC%, pues para el cálculo del mismo se toma en cuenta el modelo gaussiano de dispersión muestral.

**Tabla 3.2** Precisión en el área de pico con respecto a las distintas formas de elución ensayadas.

Variación estudiada en el área	Fase móvil	n	Área de integración				
			$\bar{x}$	S	$\pm$ IC <small><math>\alpha = 0.05, v = n-1, 2</math> colas</small>	IC%	CV [%]
Entre distintos días	Gradiente 1	13	133275	10573	6389	9.6	7.9
	Gradiente 2	28	135140	13208	5122	7.6	9.8
	Isocrático 1	3	139512	2687	6675	9.6	1.9
	Isocrático 2	14	138524	2912	1681	2.4	2.1
Dentro del mismo día	Isocrático 1	3	138871	1341	3330	4.8	1.0
	Isocrático 2	4	139201	489	778	1.1	0.4

*Notas:* n, número de muestras;  $\bar{x}$ , media aritmética muestral de las áreas de integración (ver ec. A.1); S, desviación estándar (ver ec. A.2); IC, intervalo de confianza (ver ec. A.5); IC%, intervalo de confianza relativo,  $IC\% = 2 \cdot IC / \bar{x} \cdot 100$ ; CV, coeficiente de variación (ver ec. A.4).

A partir de los valores de IC% puede verse que existe una mayor imprecisión en los resultados de integración entre distintos días que dentro del mismo día. En el caso del estudio de la variación en el área entre distintos días, la imprecisión alcanza valores desde 2.4 % hasta cercanos al 10 %. Por otro lado, la dispersión en el área de pico de inyecciones consecutivas de carbofurano estándar muestra valores en promedio menores, de 1.1 % y 4.8 % para las condiciones de elución isocráticas 1 y 2, respectivamente.

Dadas las diferencias obtenidas en la dispersión de los resultados de cada uno de los valores promedio señalados en la tabla anterior, es necesario hacer comparaciones estadísticas entre ellos. Para el caso del estudio de la variación de área entre días distintos, se compararon entre sí las respectivas varianzas mediante la comparación F. A partir de los resultados obtenidos de la prueba F, se compararon entre sí las medias muestrales mediante la prueba t. En la **Tabla 3.3** se incluyen los resultados de la aplicación de pruebas de hipótesis en ambas comparaciones.

Tabla 3.3 Análisis estadístico de los resultados contenidos en la Tabla 3.2. Comparación de varianzas y medias experimentales.

Parámetro analizado	Fases móviles a comparar	Varianzas experimentales			Medias experimentales		
		$F_c$	$F_{\alpha=0.05, n_1-1, n_2-1, 2 \text{ colas}}$	$H_0: \sigma_1^2 = \sigma_2^2$	$t_c$	$t_{\alpha=0.05, n_1+n_2-2, 2 \text{ colas}}$	$H_0: \mu_1 = \mu_2$
Respuesta inter-días	Gradiente 1	1.56	3.073	Verdadera	0.45	2.03	Verdadera
	Gradiente 2						
	Isocrático 1	1.17	39.42	Verdadera	0.54	2.13	Verdadera
	Isocrático 2						
	Gradiente 1	15.48	14.34	Falsa	1.88	2.36*	Verdadera
	Isocrático 1						
	Gradiente 1	13.18	3.153	Falsa	1.73	2.14*	Verdadera
	Isocrático 2						
Gradiente 2	24.16	39.45	Verdadera	0.56	3.18	Verdadera	
Isocrático 1							
Gradiente 2	20.57	2.948	Falsa	1.29	2.14*	Verdadera	
Isocrático 2							
Respuesta intra-día	Isocrático 1	7.50	16.04	Verdadera	0.47	2.57	Verdadera
	Isocrático 2						

Notas:  $F_c$ , valor de F calculado (ver ec. A.10);  $F_{\alpha=0.05, n_1-1, n_2-1, 2 \text{ colas}}$ , valor de F crítico tomado de Ref. [48];  $H_0$ , hipótesis nula;  $t_c$ , valor de t calculado (ver ecs. A.6 y \*A.8);  $t_{\alpha=0.05, n_1+n_2-2, 2 \text{ colas}}$ , valor de t crítico tomado de Ref. [48].

El análisis estadístico comparativo realizado en la Tabla 3.3 demuestra que, entre distintos días, las varianzas en las áreas de los picos de *Cb* obtenidos con las dos condiciones de elución en gradiente son estadísticamente distintas a la varianza en el área de pico correspondiente a la elución isocrática 2. Así también, existe diferencia estadística entre las varianzas en el área de pico obtenido en condiciones de elución isocrática 1 y gradiente 1. Sin embargo, todos los valores de medias muestrales de área de pico obtenidos en el estudio de variación entre distintos días son estadísticamente iguales. Por otro lado, no existe diferencia alguna entre las medias y las varianzas del área de pico del *Cb* en análisis hechos el mismo día, para las dos formas de elución isocrática.

De esto puede afirmarse que ninguna de las cuatro formas de elución probadas influye sobre el valor del área de pico del pesticida. Además, la determinación del *Cb* contenido en una muestra presentará una mayor imprecisión, si la elución de la misma se realiza en un día distinto al día de la inyección del estándar tomado como referencia para la cuantificación.

También se evaluó la linealidad de la relación de área de pico en función de la masa del pesticida inyectada el mismo día. Para tal efecto, de acuerdo con lo señalado en el apartado 2.3.2, se analizaron 4 distintos valores de masa de *Cb* inyectando las muestras con la precolumna y la columna analítica en línea. La obtención de la curva de área de pico en función de la masa inyectada se realizó por duplicado tanto con la fase móvil Isocrática 1 (curvas 1 y 2) como con la fase móvil Isocrática 2 (curvas 3 y 4). De los resultados expuestos en la Tabla 3.4 se trazaron gráficos de área de integración en función de la masa de pesticida (ver Figura 3.2). Los parámetros de regresión lineal por mínimos cuadrados se incluyen en la misma tabla.

Tabla 3.4 Linealidad de respuesta en función de la cantidad de analito estándar inyectado.

Masa de Cb inyectada [ng]	Área de integración			
	Curva 1	Curva 2	Curva 3	Curva 4
4.96	15636	14463	13331	13866
24.82	89116	86037	69116	65960
49.64	146153	138314	138920	136899
248.5	665786	683443	687650	675861
m	2660	2751	2767	2720
b	8147	69	480	169
S <sub>em</sub>	34	11	5	9
S <sub>eb</sub>	4334	1367	657	1124
r <sup>2</sup>	1.00	1.00	1.00	1.00
S <sub>ey</sub>	6633	2093	1005	1721
v	2	2	2	2
± IC [m] α = 0.05, v. 2 colas	146	46	22	38
± IC [b] α = 0.05, v. 3 colas	18649	5884	2826	4838

Notas: m, pendiente de la recta de mínimos cuadrados (ver ec. A.13); b, ordenada al origen de la recta de mínimos cuadrados (ver ec. A.14); S<sub>em</sub>, desviación estándar en la pendiente (ver ec. A.16); S<sub>eb</sub>, desviación estándar en la ordenada al origen (ver ec. A.17); r<sup>2</sup>, cuadrado del coeficiente de correlación momento-producto (ver ec. A.19); S<sub>ey</sub>, desviación estándar en la dirección y (ver ec. A.15); v, número de grados de libertad; IC [m], intervalo de confianza para la pendiente; IC [b], intervalo de confianza para la ordenada al origen (ver ec. A.20). Curvas 1 y 2: F<sub>m</sub> Isocrática 1. Curvas 3 y 4: F<sub>m</sub> Isocrática 2.

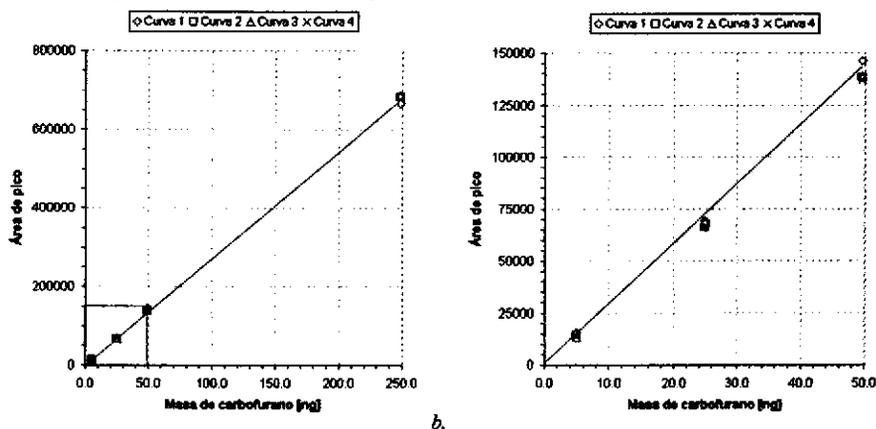


Figura 3.2 Gráfico de área de pico en función de la masa de carbofurano estándar inyectada. a. Gráfico completo. b. Ampliación de zona en recuadro.

La linealidad de los cuatro gráficos es alta, de acuerdo con los valores respectivos del cuadrado del coeficiente de correlación momento-producto (r<sup>2</sup>). La ampliación en la Figura 3.2 b. que se hace de la zona en recuadro indicada en la Figura 3.2 a, permite ver la baja dispersión entre los puntos en la dirección del eje y). Sin embargo, es necesario determinar si las 4 distintas rectas trazadas por mínimos cuadrados son iguales entre sí. Para ello se incluye en la Tabla 3.5 la comparación estadística mediante la prueba F para las varianzas tanto de la pendiente (S<sub>em</sub><sup>2</sup>) como de la ordenada al origen (S<sub>eb</sub><sup>2</sup>). A partir de los resultados de las pruebas de hipótesis de la Tabla 3.5 es posible realizar la prueba t aplicada de igual manera a los valores de la pendiente (m) y de la ordenada al origen (b) en las Tablas 3.6 y 3.7, respectivamente.

**Tabla 3.5** Análisis estadístico de los resultados contenidos en la Tabla 3.4. Comparación entre sí de las varianzas de los términos de regresión lineal m y b para las 4 curvas ( $S_{em}$  y  $S_{eb}$ ).

Ho: $\sigma_1^2 = \sigma_1^2$		$\nu_1 = 2, \nu_2 = 2, F_{0.05, \nu=2, \nu=2, 2 \text{ colas}} = 39.00$		
		Curva 2	Curva 3	Curva 4
Curva 1	$F_c = S_{em,b1}^2 / S_{em,b1}^2$	10.046	43.558	14.858
	Ho:	Verdadera	Falsa	Verdadera
	Resultado:	Las varianzas 1 y 2 son iguales	Las varianzas 1 y 3 son diferentes	Las varianzas 1 y 4 son iguales
Curva 2	$F_c = S_{em,b1}^2 / S_{em,b1}^2$		4.336	1.479
	Ho:		Verdadera	Verdadera
	Resultado:		Las varianzas 2 y 3 son iguales	Las varianzas 2 y 4 son iguales
Curva 3	$F_c = S_{em,b1}^2 / S_{em,b1}^2$			2.932
	Ho:			Verdadera
	Resultado:			Las varianzas 3 y 4 son iguales

*Notas:*  $F_c$ , valor de F calculado (ver ec. A.10);  $F_{\alpha=0.05, \nu_1=2, \nu_2=2, 2 \text{ colas}}$ , valor de F crítico tomado de Ref. [48]; Ho, hipótesis nula;  $S_{em,b}$ , Desviación estándar sobre m ó b, tomado de la Tabla 3.4.

Algo necesario de aclarar en este punto es que antes de efectuar la prueba t es imprescindible saber si las varianzas asociadas a los valores a comparar son iguales o distintas, pues las ecuaciones a utilizar en uno u otro caso no son las mismas (ver ecuaciones A.6 y A.8). Por esta razón se incluye primero la tabla de prueba F y enseguida las tablas de prueba t. Los resultados de la Tabla 3.5 permiten afirmar que las varianzas de los coeficientes de la ecuación lineal de mínimos cuadrados para cada curva son iguales entre sí, excepto al comparar los valores correspondientes a las curvas 1 y 3.

**Tabla 3.6** Análisis estadístico de los resultados contenidos en la Tabla 3.4. Comparación entre sí del término de regresión lineal m para las 4 curvas.

Ho: $m_1 = m_1$		$t_0 = t_0 = 4, t_{0.05, \nu=3, 2 \text{ colas}} = 2.45$ (excepto para 1 vs. 3) $t_{0.05, \nu=3, 2 \text{ colas}} = 3.18$ (para 1 vs. 3)*		
		Curva 2	Curva 3	Curva 4
Curva 1	$t_c (m_1, m_1)$	5.11	6.20	3.44
	Ho:	Falsa	Falsa	Falsa
	Resultado:	Las pendientes 1 y 2 son diferentes	Las pendientes 1 y 3 son diferentes	Las pendientes 1 y 4 son diferentes
Curva 2	$t_c (m_1, m_1)$		2.62	4.42
	Ho:		Falsa	Falsa
	Resultado:		Las pendientes 2 y 3 son diferentes	Las pendientes 2 y 4 son diferentes
Curva 3	$t_c (m_1, m_1)$			9.06
	Ho:			Falsa
	Resultado:			Las pendientes 3 y 4 son diferentes

*Notas:*  $t_c (m_1, m_1)$ , valor de t calculado para las pendientes  $m_1$  y  $m_1$  (ver ecs. A.6 y A.8);  $t_{\alpha=0.05, \nu, 2 \text{ colas}}$ , valor de t crítico tomado de Ref. [48]; Ho, hipótesis nula. \*Para 1 vs. 3, el valor de  $\nu$  fue calculado usando la ec. A.9.

**Tabla 3.7** Análisis estadístico de los resultados contenidos en la Tabla 3.4. Comparación entre sí del término de regresión lineal  $b$  para las 4 curvas.

Ho: $b_i = b_j$		$n_i = n_j = 4$ , $t_{0.05, n_i + n_j - 2 = 8, 2 \text{ colas}} = 2.45$ (excepto para 1 vs. 3)		
		$t_{0.05, v = 3, 2 \text{ colas}} = 3.18$ (para 1 vs. 3) *		
		Curva 2	Curva 3	Curva 4
Curva	$t_c(b_i, b_j)$	2.67	2.59	2.67
1	Ho:	Falsa	Verdadera	Falsa
	Resultado:	Las ordenadas al origen 1 y 2 son diferentes	Las ordenadas al origen 1 y 3 son iguales	Las ordenadas al origen 1 y 4 son diferentes
Curva	$t_c(b_i, b_j)$		0.54	0.11
2	Ho:		Verdadera	Verdadera
	Resultado:		Las ordenadas al origen 2 y 3 son iguales	Las ordenadas al origen 2 y 4 son iguales
Curva	$t_c(b_i, b_j)$			0.48
3	Ho:			Verdadera
	Resultado:			Las ordenadas al origen 3 y 4 son iguales

*Notas:*  $t_c(b_i, b_j)$ , valor de  $t$  calculado para las ordenadas al origen  $b_i$  y  $b_j$  (ver ecs. A.6 y A.8);  $t_{\alpha = 0.05, v, 2 \text{ colas}}$ , valor de  $t$  crítico tomado de Ref. [48]; Ho, hipótesis nula. \*Para 1 vs. 3, el valor de  $v$  fue calculado usando la ec. A.9.

De los resultados obtenidos a partir de las pruebas  $t$  aplicadas a los valores de pendiente y ordenada al origen se determinó que ninguna recta de regresión posee el mismo valor de pendiente (en términos estadísticos), es decir, todas las pendientes son distintas. Los valores de ordenada al origen para las ecuaciones de regresión lineal de las curvas 2, 3 y 4 son estadísticamente iguales entre sí. Por otro lado, los correspondientes a las curvas 1 y 3 también son iguales entre sí, sin embargo,  $b$  de 1 es completamente distinto a los valores de  $b$  para 2 y 4. Por tanto, ninguna curva es estadísticamente igual a las demás. Tales discrepancias pueden atribuirse a factores externos como la variabilidad diaria en la distribución del sistema eléctrico o al tiempo de precalentamiento en el detector, entre otros.

Con esto se demuestra que el área de pico del  $Cb$  guarda relación lineal con respecto a la masa inyectada el mismo día. También se demuestra que las rectas que describen la relación lineal del área en función de la cantidad de pesticida no son las mismas entre distintos días. Esto demuestra una vez más que la cantidad de pesticida presente en una muestra no podrá ser determinada con precisión y exactitud si ésta es analizada en días distintos al de análisis del estándar con el que fue preparado. Dada la imposibilidad de realizar curvas de calibración cada día antes de dar inicio a los análisis cromatográficos, es suficiente con inyectar una cantidad estándar de  $Cb$  que sirva de referencia en la cuantificación de la(s) muestra(s) dentro del mismo día de elución de esta(s) última(s).

Dado que se demostró mediante la prueba  $t$ , en la Tabla 3.3, que los valores de varianza del área en inyecciones consecutivas dentro del mismo día, son estadísticamente iguales para ambas condiciones de elución isocrática, puede determinarse el valor de desviación estándar combinada usando la ecuación A.21, y a partir de éste, el intervalo de confianza porcentual. En la Tabla 3.8 se incluyen los valores de desviaciones

estándar correspondientes a la **Tabla 3.2**, así como también la desviación estándar combinada y el intervalo de confianza total calculado.

**Tabla 3.8** Incertidumbre total asociada a la determinación cromatográfica.

	Forma de elución de muestras inyectadas el mismo día	
	Elución Isocrática 1	Elución Isocrática 2
Área promedio individual	138871	139201
Área promedio global	139036	
Desviación estándar	1341	489
n	3	4
$s_c$	929	
$\pm IC$	859	
IC%	1.2	

*Notas:*  $s_c$ , desviación estándar combinada (ver ec. A.21); IC, intervalo de confianza al 95 % (ver ec. A.5); IC%, intervalo de confianza relativo,  $IC\% = 2 \cdot IC / x \cdot 100$ . Los valores en cursivas fueron tomados de la **Tabla 3.2**.

Con los resultados de la tabla anterior puede demostrarse que la incertidumbre asociada a la determinación cromatográfica es del 1.2 %, con un origen puramente aleatorio. Esto permite tener un margen pequeño de incertidumbre en cualquier resultado de cuantificación cromatográfica.

### 3.2.2 Incertidumbre en el método

El procedimiento seguido para la determinación del grado de incertidumbre asociada al método se halla descrito en el inciso 2.3.2.2. La finalidad de tales ensayos es cuantificar el grado de dispersión en el área de integración de los picos para cantidades distintas de masa de *Cb* eluido de precolumnas en línea con la columna. Las disoluciones preconcentradas fueron preparadas de forma que tuvieran la misma composición matricial que la fase de elución utilizada en los últimos ensayos de *EFS* con los *ISs* ( $H_3Cit$  0.01 M, pH 2).

Con los valores de área de los picos correspondientes al pesticida y las cantidades de analito preconcentrado, se efectuó un análisis de regresión lineal por mínimos cuadrados para obtener los coeficientes de las respectivas ecuaciones de recta (ver **Tabla 3.9**). También se calcularon todos los términos de varianza necesarios para poder realizar un análisis estadístico comparativo entre las 4 rectas de regresión obtenidas. Las pruebas de hipótesis que se incluyen más adelante (**Tablas 3.10, 3.11 y 3.12**) muestran comparaciones entre las pendientes y entre las ordenadas al origen mediante pruebas F y pruebas t.

En el caso de la **Tabla 3.9**, también se incluyen los valores de masa de pesticida equivalente, determinados tomando como referencia el área de pico del estándar de carbofurano inyectado el mismo día de análisis. A partir de los valores de masa equivalente cuantificada para cada disolución preconcentrada, se calculó también el error relativo porcentual. Esto permite ver en la misma tabla, el perfil de dispersión de los resultados.

**Tabla 3.9** Linealidad de área de pico en función de la cantidad de analito estándar cargada en precolumna.

m (Cb) [ng]	Curva 1			Curva 2			Curva 3			Curva 4		
	Área	m(Cb) <sub>eq</sub> [ng]	ER [%]									
6	19288	7.1	18.7	17230	6.4	6.33	13285	4.7	-21.2	13651	4.9	-17.7
10	33699	12.4	24.5	25822	9.6	-4.30	22699	8.1	-19.0	37256	13.5	34.8
20	65362	24.1	20.7	53249	19.7	-1.35	58362	20.8	4.2	49878	18.0	-9.75
50	130124	48.1	-3.86	143124	53.0	6.06	130153	46.5	-7.08	116960	42.3	-15.4
Estándar usado:	134388	49.6		133987	49.6		139068	49.6		137196	49.6	
m		2463			2894			2658			2206	
b		9156			-2364			-1030			7007	
S <sub>em</sub>		177			69			149			217	
S <sub>ab</sub>		4883			1901			4103			5989	
r <sup>2</sup>		0.9897			0.9989			0.9938			0.9809	
S <sub>ey</sub>		6107			2377			5131			7490	
v		2			2			2			2	
± IC [m] α = 0.05, v = 2, 2 colas		763			297			641			935	
± IC [b] α = 0.05, v = 2, 2 colas		21013			8179			17852			25769	

*Notas:* m(Cb)<sub>eq</sub>, masa de carbofurano equivalente calculada tomando en cuenta como referencia el estándar usado; ER [%], Error relativo porcentual respecto a la masa preconcentrada, ER [%] = 100·[m(Cb)<sub>eq</sub> - m(Cb)]/m(Cb); m, pendiente de la recta de mínimos cuadrados (ver ec. A.13); b, ordenada al origen de la recta de mínimos cuadrados (ver ec. A.14); S<sub>em</sub>, desviación estándar en la pendiente (ver ec. A.16); S<sub>ab</sub>, desviación estándar en la ordenada al origen (ver ec. A.17); r<sup>2</sup>, cuadrado del coeficiente de correlación momento-producto (ver ec. A.19); S<sub>ey</sub>, desviación estándar en la dirección y (ver ec. A.15); v, número de grados de libertad; IC [m], intervalo de confianza para la pendiente; IC [b], intervalo de confianza para la ordenada al origen (ver ec. A.5). Curvas 1 y 2: F<sub>m</sub> Isocrática 1. Curvas 3 y 4: F<sub>m</sub> Isocrática 2.

Con los valores de r<sup>2</sup> expuestos en la tabla anterior se puede afirmar que la linealidad del área de pico en función de la masa de carbofurano preconcentrada en precolumna es aceptable. Sin embargo, tal y como permiten ver los respectivos gráficos incluidos en la *Figura 3.3 a*, la dispersión de los puntos correspondientes a una misma masa de carbofurano es alta. Asimismo, los valores de error relativo porcentual de la *Tabla 3.9* demuestran que existe una enorme dispersión de los valores de masa detectada respecto a las cantidades de masa preconcentrada. En la *Figura 3.3 b*, se incluyen las rectas de mínimos cuadrados para cada una de las 4 curvas.

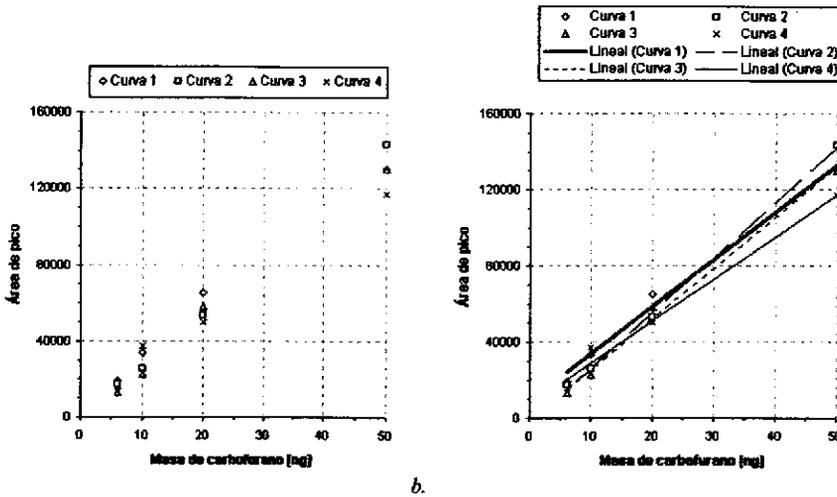


Figura 3.3 Gráfico de área de pico en función de la masa de carbófurano estándar cargada en precolumna. a. Dispersión de puntos. b. Rectas de regresión lineal incluidas.

Con los valores de desviación estándar sobre la pendiente y sobre la ordenada al origen se realizó la prueba F para comparar entre sí las varianzas en las 4 curvas (ver Tabla 3.10). De los resultados obtenidos a partir de las correspondientes pruebas de hipótesis, puede afirmarse que no existe diferencia alguna entre los 4 valores de desviación estándar, tanto para m como para b. Lo anterior permite efectuar la prueba t para comparar entre sí los cuatro valores de pendiente y de ordenada al origen.

Tabla 3.10 Análisis estadístico de los resultados contenidos en la Tabla 3.9. Comparación entre sí de las varianzas de los términos de regresión lineal m y b para las 4 curvas ( $S_{m,b}$  y  $S_{cb}$ ).

Ho: $\sigma_1^2 = \sigma_2^2$		$v_1 = 2, v_2 = 2, F_{0.05, 4-2, 4-2, 2 \text{ colas}} = 39.00$		
Curva	$F_c = S_{m,b_i}^2 / S_{m,b_j}^2$	Curva 2	Curva 3	Curva 4
1	Ho:	Verdadera	Verdadera	Verdadera
	Resultado:	Las varianzas 1 y 2 son iguales	Las varianzas 1 y 3 son iguales	Las varianzas 1 y 4 son iguales
2	$F_c = S_{m,b_i}^2 / S_{m,b_j}^2$		4.658	9.927
	Ho:		Verdadera	Verdadera
3	Resultado:		Las varianzas 2 y 3 son iguales	Las varianzas 2 y 4 son iguales
	$F_c = S_{m,b_i}^2 / S_{m,b_j}^2$			2.131
3	Ho:			Verdadera
	Resultado:			Las varianzas 3 y 4 son iguales

Notas:  $F_c$ , valor de F calculado (ver ec. A.10);  $F_{\alpha=0.05, 4-2, 4-2, 2 \text{ colas}}$ , valor de F crítico tomado de Ref. [48]; Ho, hipótesis nula;  $S_{m,b}$ , Desviación estándar sobre m ó b, tomado de la Tabla 3.9.

Como se mencionó anteriormente, las varianzas asociadas a cada uno de los valores de pendiente y ordenada al origen son iguales entre sí para las 4 curvas. Con tales resultados fue posible aplicar la prueba t

con tal de comparar entre sí los cuatro distintos valores de  $m$  y de  $b$  respectivamente. De la comparación entre los valores de pendiente (Tabla 3.11) puede demostrarse que, estadísticamente, las pendientes de todas las curvas son diferentes entre sí, exceptuando la curva 1 comparada con las curvas 3 y 4.

Tabla 3.11 Análisis estadístico de los resultados contenidos en la Tabla 3.9. Comparación entre sí del término de regresión lineal  $m$  para las 4 curvas.

Ho: $m_i = m_j$		$n_i = n_j = 4, t_{0.05, n_i + n_j - 2} = 6, 2 \text{ colas} = 2.45$		
		Curva 2	Curva 3	Curva 4
Curva 1	$t_c (m_i, m_j)$	4.53	1.68	1.83
	Ho:	Falsa	Verdadera	Verdadera
	Resultado:	Las pendientes 1 y 2 son diferentes	Las pendientes 1 y 3 son iguales	Las pendientes 1 y 4 son iguales
Curva 2	$t_c (m_i, m_j)$		2.87	6.03
	Ho:		Falsa	Falsa
	Resultado:		Las pendientes 2 y 3 son diferentes	Las pendientes 2 y 4 son diferentes
Curva 3	$t_c (m_i, m_j)$			3.43
	Ho:			Falsa
	Resultado:			Las pendientes 3 y 4 son diferentes

Notas:  $t_c (m_i, m_j)$ , valor de  $t$  calculado para las pendientes  $m_i$  y  $m_j$  (ver ec. A.6);  $t_{\alpha - 0.05, v, 2 \text{ colas}}$ , valor de  $t$  crítico tomado de Ref. [48]; Ho, hipótesis nula.

Con respecto a las comparaciones estadísticas por prueba de hipótesis entre los valores de ordenada al origen (Tabla 3.12) se tiene que el valor de  $b$  para la curva 2 es distinto a los valores de  $b$  para las curvas 1 y 4. También, el valor de  $b$  para la curva 1 es distinto al correspondiente a la curva 3. Por otro lado, se demostró igualdad estadística entre las ordenadas al origen de las curvas 1 y 4, así como también con los valores respectivos a la curva 3 con los de las curvas 2 y 4.

Tabla 3.12 Análisis estadístico de los resultados contenidos en la Tabla 3.9. Comparación entre sí del término de regresión lineal  $b$  para las 4 curvas.

Ho: $b_i = b_j$		$n_i = n_j = 4, t_{0.05, n_i + n_j - 2} = 6, 2 \text{ colas} = 2.45$		
		Curva 2	Curva 3	Curva 4
Curva 1	$t_c (b_i, b_j)$	4.40	3.19	0.56
	Ho:	Falsa	Falsa	Verdadera
	Resultado:	Las ordenadas al origen 1 y 2 son diferentes	Las ordenadas al origen 1 y 3 son diferentes	Las ordenadas al origen 1 y 4 son iguales
Curva 2	$t_c (b_i, b_j)$		0.59	2.98
	Ho:		Verdadera	Falsa
	Resultado:		Las ordenadas al origen 2 y 3 son iguales	Las ordenadas al origen 2 y 4 son diferentes
Curva 3	$t_c (b_i, b_j)$			2.21
	Ho:			Verdadera
	Resultado:			Las ordenadas al origen 3 y 4 son iguales

Notas:  $t_c (b_i, b_j)$ , valor de  $t$  calculado para las ordenadas al origen  $b_i$  y  $b_j$  (ver Ec. A.6);  $t_{\alpha - 0.05, v, 2 \text{ colas}}$ , valor de  $t$  crítico tomado de Ref. [48]; Ho, hipótesis nula.

A partir de los resultados señalados en las Tablas 3.11 y 3.12, es evidente que la única igualdad estadística entre rectas de regresión corresponde a las curvas 1 y 4. Esto era de esperarse considerando que en la sección anterior (Incertidumbre en la determinación cromatográfica) ya se había demostrado que las curvas Respuesta vs. Masa inyectada trazadas en diferentes días eran estadísticamente diferentes. La explicación más plausible es la variabilidad de respuesta del detector en diferentes días. En el caso presente, a esta fuente de variación se suma otra muy importante asociada con la preparación de las disoluciones a preconcentrar en las precolumnas. Cabe hacer notar que la concentración de *Cb* en las disoluciones se encuentra en el intervalo de 0.12-1.0 ppb ( $\text{ng mL}^{-1}$ ), lo que significa que, para el trazo de cada curva, del estándar de trabajo de *Cb* (2 ppm) se preparó un estándar diluido 1 a 10 (0.2 ppm) y de éste se tomaron alícuotas de 30, 50, 100 y 250  $\mu\text{L}$  que fueron llevados a un aforo de 50 mL con la disolución de ácido cítrico. Dado que las pequeñas alícuotas se midieron con micropipeta, usando puntas diferentes pero del mismo modelo para las cuatro curvas, esta fuente de variabilidad (entre puntas) pudo ser muy significativa.

Por otra parte, para una misma curva, el error de volumen succionado o desalojado de la punta de la micropipeta para las cuatro alícuotas señaladas, constituyó sin duda una parte importante del error relativo para cada valor de masa cuantificada (Tabla 3.9). Otra contribución significativa provino de la integración del pico de *Cb* en el cromatograma obtenido al eluir en línea la precolumna cargada con la disolución del analito en ácido cítrico 0.01 M. Es necesario señalar que, aun cuando las disoluciones de carga fueron preparadas con agua de alta pureza y con reactivos grado analítico, la elución en línea de la precolumna de preconcentración genera sistemáticamente cromatogramas con varias señales y una línea base ruidosa que pueden interferir en la correcta integración del pico de interés. A pesar de estas dos importantes fuentes de error, el análisis estadístico realizado demuestra la existencia de linealidad entre la cantidad de carbofurano determinado y la cantidad de carbofurano teóricamente cargado en la precolumna. Esta linealidad se mantiene en las cuatro curvas pese a que el error relativo para cada valor de masa cuantificada es grande, cubriendo una amplia gama de valores, desde -21.2% hasta 34.8%.

De acuerdo con los resultados de prueba de hipótesis de la comparación F realizada en la Tabla 3.10, todos los valores de desviación estándar de pendiente y ordenada al origen incluidos en la Tabla 3.9 son iguales entre sí. Por tanto, los valores de desviación estándar sobre *y* también son iguales entre ellos. Considerando la igualdad entre las desviaciones estándar sobre *y*, la ecuación A.21 es válida. En la Tabla 3.13 se incluyen los valores de  $S_{ey}$  e intervalo de confianza para cada curva. También se incluye el valor de desviación estándar combinada, el cual fue calculado a partir de los mismos valores de  $S_{ey}$ , considerando los grados de libertad señalados en la Tabla 3.9. Del valor de desviación estándar combinada es posible calcular la incertidumbre total asociada al método de preconcentración mediante la ecuación A.20. Asimismo, la incertidumbre total asociada al método de preconcentración en términos porcentuales puede calcularse utilizando la ecuación A.22.

Tabla 3.13 Evaluación de la incertidumbre asociada al método.

	Curva 1	Curva 2	Curva 3	Curva 4
$S_{ey}$	6107	2377	5131	7490
$\pm IC [y]$ <small><math>n = 0.05, v, 2 colas</math></small>	26278	10228	22075	32226
$S_{c(n-4)}$		6857		
$\pm IC [y]$ total <small><math>n = 0.05, n, 2 colas</math></small>		15812		
$\pm I_T [\%]$		27.2		

Notas: IC, intervalo de confianza al 95 % (ver ec. A.5);  $S_{c(n-4)}$ , Desviación estándar combinada para las 4 desviaciones estándar individuales (ver ec. A.21);  $I_T [\%]$ , Incertidumbre porcentual total (ver ec. A.22). Los valores de referencia fueron tomados de la Tabla 3.2.

El valor de incertidumbre porcentual total incluido en la tabla anterior corresponde al grado de incertidumbre asociado a procesos de extracción en fase sólida con precolumnas, incluyendo la incertidumbre en la preparación de las disoluciones de carga y la incertidumbre asociada a la determinación cromatográfica. Por tanto es correcto tomar en cuenta el valor de  $\pm I_T [\%]$ ,  $\pm 27.2 \%$ , como la incertidumbre global del método analítico.

Como último punto, es de suma importancia señalar que el carbofurano puede reaccionar hidrolíticamente en medio acuoso, lo cual significaría una contribución más al error global en la cuantificación del pesticida. Por tal razón, se realizaron experimentos de cuantificación del proceso de hidrólisis en dos composiciones matriciales de las disoluciones involucradas en los ensayos de EFS con ISs. Las disoluciones utilizadas consistieron en una disolución similar a la de carga (PBS 0.02 M pH 7, MeOH 2 % v/v) y una análoga a la de elución ( $H_3Cit$  0.01 M pH 2). Ambas disoluciones se doparon con 100 ng de Cb y fueron incubadas a temperatura ambiente por 24 h. Transcurrido ese tiempo, las disoluciones se preconcentraron en precolumnas siguiendo el procedimiento descrito en el apartado 2.3.5. Cada precolumna, una vez cargada, fue conectada al sistema cromatográfico y eluida en línea. De esta forma se determinó la cantidad de pesticida remanente y, por diferencia con la masa de carbofurano adicionada el día anterior, fue posible cuantificar la cantidad hidrolizada de Cb.

Tabla 3.14 Estimación del grado de hidrólisis de carbofurano en disolución de carga y en disolución de elución, tras 24 horas de incubación a temperatura ambiente.

Disolución	Masa de carbofurano [ng]	
	Inicial	Tras 24 h
Carga: PBS 0.02 M pH 7, MeOH 2 % v/v	100	91.8
Elución: $H_3Cit$ 0.01 M pH 2	100	96.4

De los resultados indicados en la Tabla 3.14 se deduce que el carbofurano no se hidroliza significativamente tras 24 horas de incubación a temperatura ambiente en el buffer fosfato de pH 7 o en la disolución de ácido cítrico pH 2. En efecto, la pequeña diferencia entre la cantidad de Cb cuantificado y la cantidad teórica inicial es mucho menor que la incertidumbre del método analítico. No obstante, en los

experimentos de inmunoeextracción reportados posteriormente (sección 3.4), la muestra percolada a través del cartucho de *IS* (Cb en PBS) fue preparada justo antes de comenzar el experimento. Además, tanto el effluente de carga como el eluato del cartucho de *IS* fueron preconcentrados en precolumnas inmediatamente después de ser obtenidos y las precolumnas fueron eluidas en línea y analizadas el mismo día o, a más tardar, al día siguiente. En éste último caso, las precolumnas fueron tapadas por ambos extremos y se mantuvieron en refrigeración (4 °C) hasta su análisis.

### 3.3 Actividad nativa de los anticuerpos y preparación de los inmunoabsorbentes

Dentro de este subcapítulo se compendian los resultados de cuantificación de la actividad nativa de los anticuerpos utilizados, BFNB-52, BFNB-67, BFNB-62 y BFNP-21. También se mencionan las cantidades de anticuerpo encapsulado en la preparación de cada inmunoabsorbente y las condiciones utilizadas en la preparación de los mismos. El procedimiento seguido en la determinación de la actividad nativa es el descrito en el apartado 2.3.3, mientras que en la preparación de los inmunoabsorbentes se siguió la técnica explicada en el apartado 2.3.4.

En lo que respecta a la evaluación de la actividad nativa de los *MAbs*, puede apreciarse en la Tabla 3.15 que para los primeros tres anticuerpos, BFNB-52, BFNB-67 y BFNB-62, los valores de actividad respectivos, 792, 665 y 1540 ng Cb/mL *MAB*, son mucho mayores (de ~7 a ~17 veces) que el correspondiente al último anticuerpo, BFNP-21, con 90.5 ng Cb/mL *MAB*. Una causa de tal anomalía pudo ser debida a que el recipiente en el cual se encontraba la suspensión original de este *MAB* mostró señales de escurrimiento, indicando una posible fuga durante el transporte desde el lugar de producción hasta su llegada al laboratorio. Por ello, para el caso de dicho anticuerpo, únicamente fue posible cuantificar la actividad en función del volumen de la disolución proteica purificada. En cambio, los valores de actividad nativa para los restantes 3 anticuerpos, BFNB-52, BFNB-67 y BFNB-62, pudieron ser determinados en unidades de ng Cb/mg *MAB*. En dicho caso, los valores de actividad en tales unidades equivalen numéricamente a los valores en unidades de ng Cb/mL *MAB*, en orden respectivo. Por otra parte, es importante señalar también que el *MAB* BFNP-21 fue generado a partir de un hapteno diferente al utilizado para los otros tres *MABs*. Evidentemente, la actividad nativa notoriamente menor del BFNP-21 debe estar relacionada en gran medida con este factor. Finalmente, se debe mencionar que este anticuerpo fue el último en ser evaluado, lo cual ocurrió a más de un año de la recepción de los 4 *MABs*. Aunque se nos indicó que los anticuerpos pueden durar largos periodos de tiempo sin ser afectados, mientras se mantengan en su formato de expedición original (precipitados en una solución saturada de sulfato amónico), no se puede descartar totalmente que el factor tiempo haya influido también en la baja actividad observada.

**Tabla 3.15** Determinación de la actividad nativa de los 4 distintos anticuerpos utilizados. Valores de alícuotas encapsuladas en sol-gel, actividad esperada al 100 % de actividad y pérdida de actividad debida al proceso de encapsulamiento.

	Anticuerpos			
	BFNB-52	BFNB-67	BFNB-62	BFNP-21
Actividad nativa m Cb / V MAb [ng Cb/mL MAb]	792	665	1540	90.5
Actividad nativa m Cb / m MAb [ng Cb/mg MAb]	792	665	1540	-
Volumen encapsulado [μL]*	900	480	475	450
Retención esperada/cartucho [ng]	712	319	732	40.7
Retención máxima observada/cartucho [ng]**	42.6	17.5	22.6	9.7
Pérdida de actividad por encapsulamiento [%]	94	95	97	76

\* El volumen total de las disoluciones purificadas de anticuerpo en PBS 0.02 M en todos los casos fue igual a 1 mL.

\*\*Se consideran sólo resultados obtenidos a partir del 4º ciclo de EFS en cada cartucho.

Las cantidades encapsuladas de *IgG* durante el proceso de preparación de los *ISs* no fueron las mismas para cada *MAb* (ver **Tabla 3.15**). En el caso de la preparación del *IS* con BFNB-52 se utilizó una mayor cantidad que en los restantes 3 casos, por ser éste el primer *MAb* evaluado y porque no se tenía ninguna idea del nivel de actividad de estos anticuerpos. Para las cantidades de *IgG* encapsuladas, se señala en la sección inferior de la **Tabla 3.15** la retención absoluta esperada si la actividad de los *MAbs* tras el proceso de encapsulamiento se preservara intacta. Asimismo se incluyen en dicha sección los valores de retención máxima observada durante la evaluación de cada cartucho preparado. La diferencia porcentual entre la retención esperada y la retención máxima determinada permite evaluar la pérdida de actividad en los inmunoadsorbentes debida al proceso de encapsulamiento. De los cuatro casos expuestos en dicha tabla, la mayor pérdida de actividad por encapsulamiento se presentó con el *MAb* BFNB-62, el cual preservó un 3 % de su actividad nativa. Sin embargo, la pérdida de actividad por encapsulamiento para BFNB-52, BFNB-67 y BFNB-62 es muy similar. Por otro lado, el cartucho con menor pérdida de actividad tras el encapsulamiento fue el *IS* BFNP-21, que mantuvo un 24 % de la actividad nativa, pero existe incertidumbre sobre la condición real inicial del anticuerpo BFNP-21, por las razones anteriormente expuestas.

En la etapa inicial de la preparación de los *ISs*, se ensayaron dos formas de agitación de la mezcla inicial de reactivos (TEOS, HCl y H<sub>2</sub>O), una manual y otra automática. Las cantidades de gel obtenidas para los 4 distintos *MAbs* (peso del hidrogel húmedo) se incluyen en la **Tabla 3.16**. En la misma tabla se indica el tiempo que se requirió en cada caso para alcanzar la homogeneización de las fases presentes (fase orgánica y fase acuosa), así como también el tipo de agitación utilizada. De la comparación de los tiempos de agitación requeridos con respecto al tipo de agitación utilizada, queda claro que el uso de agitación automática permite disminuir hasta tres horas el tiempo de preparación de los geles con respecto al tiempo requerido con agitación manual<sup>a</sup>.

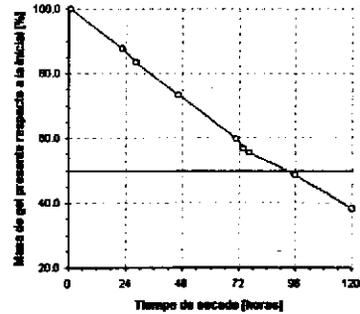
<sup>a</sup> ver **Tabla 3.16**, comparar BFNB-52 contra los otros 3 *MAbs*.

**Tabla 3.16** Geles preparados. Masa de gel obtenida, forma y tiempo de agitación durante su preparación.

	Anticuerpos encapsulados			
	BFNB-52	BFNB-67	BFNB-62	BFNP-21
Masa de gel obtenida <sup>1</sup> [g]	5.0	3.7	3.9	4.4
Forma de agitación	Manual	Mecánica	Mecánica	Mecánica
Tiempo de agitación [h]	6	3	3	3.5

<sup>1</sup> Antes de llevar a cabo el proceso de secado.

Durante la etapa de maduración y secado de los geles, se evaluó día a día la pérdida de masa de los mismos. Esto con el fin de controlar el proceso de secado hasta alcanzar una pérdida de masa equivalente al 50 % de la cantidad inicial. Sin embargo, el gel dopado con el *MAb* BFNB-67 se secó hasta pérdida del 60 % de su peso inicial, lo cual probablemente tuvo una influencia determinante sobre la actividad residual del anticuerpo encapsulado. Cabe señalar que la condición de secado hasta 50 % de pérdida de peso utilizada para los otros 3 geles se basa en resultados obtenidos con anterioridad por parte del grupo de trabajo de la Dra. Vera [4, 39 y 46]. En la *Figura 3.4* se incluye un gráfico del control porcentual en la pérdida de masa de un “gel blanco” en función del tiempo de secado. De las observaciones hechas sobre la pérdida de masa en función del tiempo, se pudo determinar que el tiempo requerido para alcanzar el 50 % de la masa inicial del gel es de 72 a 96 h, es decir, de 3 a 4 días. Estas condiciones corresponden a la evaporación del líquido contenido en los poros del hidrogel inicial, el cual fue colocado en un vaso de precipitados de 50 mL, cubierto con una tela de malla abierta y mantenido en refrigeración a 4 °C. En ese punto, el xerogel formado no ha alcanzado un peso constante como se observa claramente en el gráfico de la *Figura 3.4*.



*Figura 3.4* Gráfico de pérdida de masa en función del tiempo de secado durante la etapa de maduración de un “gel blanco” preparado usando agitación mecánica por 3.5 h. La masa inicial fue de 4.5 g.

Las condiciones del proceso sol-gel utilizadas para la preparación de los *ISs* fueron desarrolladas por el grupo de investigación, ya mencionado, para el encapsulamiento de anticuerpos policlonales y algunas enzimas. Los resultados obtenidos con esas biomoléculas fueron superiores a los que se reportan en este trabajo, pues se logró preservar entre el 20 y el 42 % de actividad nativa después del encapsulamiento. Esto nos lleva a concluir que las condiciones usadas no son las óptimas en el caso de los anticuerpos monoclonales, probablemente porque estas moléculas son más sensibles y delicadas que las antes ensayadas. De acuerdo con experimentos realizados por otros miembros del equipo de trabajo, parece ser que el punto más crítico se encuentra en la fase de secado. Aparentemente, un secado menos intenso y más lento podría preservar en mayor medida la actividad de los *MAbs* encapsulados.

### 3.4 Evaluación de los inmunoadsorbentes

El proceso de evaluación de los *ISs* consistió en efectuar ensayos de inmunoeextracción con disoluciones dopadas con *Cb*, estudiando distintas variables, tales como concentración de analito en la muestra de carga, velocidad de flujo y volumen de carga. Sin embargo, previamente a la realización del estudio de las variables mencionadas, se tuvieron que encontrar las condiciones de carga y lavado adecuadas para evitar que el pesticida fuera retenido de manera no específica. También fue necesario determinar la composición del eluyente que permitiera disociar el complejo antígeno-anticuerpo y que a la vez no causara desnaturalización excesiva de los anticuerpos encapsulados.

En este subcapítulo se exponen primero los resultados obtenidos en la búsqueda de las condiciones necesarias para evitar la retención no específica. Enseguida se mencionan los resultados del estudio de las condiciones de elución apropiadas. Posteriormente se muestra el estudio del efecto del tiempo sobre los inmunoadsorbentes, el cual incluye la estabilidad de los *ISs* en función del tiempo transcurrido desde su primer uso y del número de ensayos de *EFS* a que fueron sometidos. Por último se exponen los resultados del análisis de las variables de carga mencionadas en el párrafo anterior para cada inmunoadsorbente preparado.

#### 3.4.1 Estudio de retención no específica

A través de un cartucho con "gel blanco" se percolaron diferentes volúmenes de disoluciones de *Cb* en PBS 0.02 M con distintos contenidos de metanol, de acuerdo con la descripción previa señalada en el apartado 2.3.5. Los eluatos recuperados (usando como eluyente 3 mL de MeCN-H<sub>2</sub>O 65:35 v/v), diluidos con agua, preconcentrados en precolumnas y eluidos en línea con la columna permitieron, finalmente, cuantificar directamente la masa de pesticida retenida de manera no específica en la matriz de sílice del cartucho. De los resultados obtenidos a partir de los experimentos señalados, se definió que la disolución de lavado debe contener 4 % v/v de MeOH, y el volumen mínimo de lavado debe ser de 5 mL.

#### 3.4.2 Estudio de las condiciones de elución

Durante la búsqueda de la composición de la fase de elución que permitiera eluir completamente el pesticida del inmunoadsorbente y que a la vez tuviera un mínimo efecto desnaturalizante sobre el anticuerpo, se ensayaron 3 distintas disoluciones. En primer lugar se utilizó una mezcla de acetonitrilo-agua en proporción 65:35 v/v. La recuperación total del pesticida se logró con un volumen mínimo de eluyente de 6 mL<sup>4</sup>. El inmunoadsorbente con el cual se probó dicha fase de elución fue BFNB-52, para casi todos los ensayos de inmunoeextracción realizados. Sin embargo, en tan sólo 3 ciclos de *EFS*, entre el cuarto y el sexto ensayos (ya que los resultados de los primeros tres ciclos no se tomaron en cuenta para ningún *IS*, como se discutirá más adelante), se observó una pérdida del 37% en su capacidad de retención del *Cb*. En este punto habían transcurrido solamente 13 días desde que se empezó a trabajar con el cartucho. Por esta razón, para el siguiente inmunoadsorbente a probar, se decidió cambiar de fase de elución y usar ácido cítrico 0.01 M pH 2. Se prefirió aprovechar el efecto del cambio en el pH como factor debilitante del complejo *Ag-Ab* en vez de una alta concentración de disolvente orgánico porque se consideró que el ácido cítrico acuoso sería menos agresivo para las moléculas de *IgG* encapsuladas. Tras comparar la cantidad de pesticida recuperado usando la mezcla

<sup>4</sup> Ver Tabla 3.17.

acetonitrilo-agua y la disolución de ácido cítrico en ensayos de inmunoeextracción en el mismo cartucho, se pudo demostrar que esta última disolución sí logra disociar el complejo antígeno-anticuerpo y eluir por completo al pesticida del cartucho<sup>a</sup>. La desventaja de este eluyente más suave fue que se requirió un volumen de al menos 50 mL (Tabla 3.17) para asegurar la total desorción del *Cb* retenido específicamente. Aunque lo anterior significa una fuerte dilución del analito, que haría imposible el análisis directo del eluato por cromatografía, el problema queda resuelto preconcentrando dicho eluato en una precolumna de fase reversa que es posteriormente analizada en línea.

Cabe mencionar que en trabajos anteriores del mismo grupo de investigación, ya se habían utilizado mezclas acetonitrilo-agua como eluyente en cartuchos de inmunoeextracción para otros pesticidas, sin que se produjeran daños notables en la actividad del anticuerpo encapsulado [4,46]. Sin embargo, esos *ISs* fueron preparados con anticuerpos policlonales. Por lo observado al utilizar estas mezclas con el *IS* BFNB-52, se confirma que los *MAbs* son biomoléculas mucho más delicadas que los anticuerpos policlonales.

El uso de un volumen relativamente grande de ácido cítrico para la elución tiene el inconveniente adicional de alargar el tiempo requerido para el experimento de inmunoeextracción (a un flujo de 1 mL min<sup>-1</sup> se necesitan 50 minutos tan sólo para la elución). Una opción para acortar el tiempo sería aumentar la velocidad de flujo durante este paso, pero es sabido que el proceso de disociación del complejo antígeno-anticuerpo es lento en presencia de agentes débiles como el ácido cítrico, por lo que el tiempo de contacto es un factor importante para la completa elución del analito.

Otra alternativa es aumentar moderadamente la fuerza del eluyente, agregando una pequeña proporción de un disolvente orgánico menos agresivo para las biomoléculas que el acetonitrilo. De acuerdo con un reporte del equipo del Dr. Montoya [7] (quien produjo los anticuerpos utilizados en este trabajo), es posible añadir hasta un 15 % de metanol al buffer acuoso en contacto con los *MAbs* sin provocar una desnaturalización irreversible. Con esta base, se decidió ensayar como eluyente una mezcla metanol-ácido cítrico (0.01 M, pH 2) 10:90 (v/v). Los experimentos de inmunoadsorción realizados con dicho eluyente mostraron que con sólo 25 mL, a flujo de 1 mL min<sup>-1</sup>, era posible recuperar todo el analito retenido específicamente en el cartucho de *IS*<sup>b</sup>. La pequeña diferencia observada en la Figura 3.5 b para dos ensayos similares en el *IS* BFNB-62, utilizando como eluyente 50 mL de ácido cítrico sólo y 25 mL de ácido cítrico con 10 % de MeOH, no es significativa. En efecto, de acuerdo con la Tabla 3.13, la incertidumbre porcentual total del método analítico es de  $\pm 27.2$  %. El valor porcentual anterior equivale a  $\pm 2.4$  ng en el caso de la retención de 8.8 ng, mientras que para el caso de 7.6 ng correspondería a  $\pm 2.1$  ng, por tanto, la diferencia de 1.2 ng entre los dos experimentos comparados no es relevante. Las tres condiciones de elución ensayadas en este trabajo se resumen en la Tabla 3.17.

<sup>a</sup> Ver Figura 3.5 a.

<sup>b</sup> Ver Figura 3.5 b.

Tabla 3.17 Eluyentes probados y sus correspondientes volúmenes mínimos necesarios.

Composición	Eluyentes ensayados		
	Acetonitrilo/agua	Ácido cítrico acuoso	Ácido cítrico acuoso/metanol
	MeCN: 65 % v/v H <sub>2</sub> O: 35 % v/v 6 mL	0.01 M pH 2 50 mL	H <sub>3</sub> Cit 0.01 M, pH 2: 90 % v/v MeOH: 10 % v/v 25 mL
Volumen necesario			
IS en el que se aplicó	BFNB-52	BFNB-67	BFNB-62 y BFNP-21

Nota: La velocidad de flujo (*F*) utilizada durante la elución fue en todos los casos igual a 1 mL min<sup>-1</sup>.

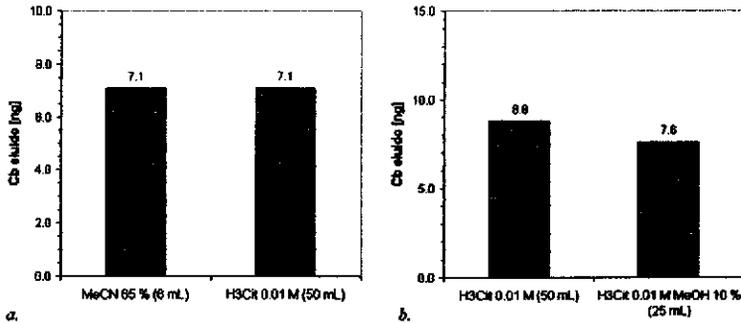


Figura 3.5 Recuperación en eluatos con respecto a la fase de elución utilizada. *a.* Inmunoadsorbente BFNB-52, carga: 80 ng de *Cb* en 25 mL de PBS 0.02 M con 2 % de MeOH,  $F = 0.5 \text{ mL min}^{-1}$ ; elución: disoluciones indicadas,  $F = 1 \text{ mL min}^{-1}$ . *b.* Inmunoadsorbente BFNB-62, carga: 50 ng de *Cb* en 25 mL de PBS 0.02 M con 2 % de MeOH,  $F \leq 1 \text{ mL min}^{-1}$ ; elución: disoluciones indicadas,  $F = 1 \text{ mL min}^{-1}$ .

Experimentos de inmunoextracción posteriores, en los que se hizo uso de las fases de elución con ácido cítrico, demostraron que estos eluyentes no causaban pérdidas abruptas de actividad como las observadas con el IS BFNB-52. En todos los experimentos de inmunoextracción realizados con el IS BFNB-67 se utilizó H<sub>3</sub>Cit 0.01 M pH 2, como eluyente y la pérdida de actividad observada después de 11 ciclos totales de EFS realizados en un periodo de 37 días fue de 35 %. Por otro lado, con el IS BFNB-62 se utilizó cítrico acuoso para los primeros 5 ensayos de EFS, mientras que en los restantes ensayos se empleó la mezcla cítrico acuoso-metanol. La pérdida de actividad tras 12 ciclos de adsorción-desorción fue de 43 % en 44 días. Por último, en el caso del IS BFNP-21, se utilizó en todos los ensayos de EFS la mezcla cítrico acuoso-metanol como eluyente y la pérdida de actividad durante su uso en 10 ciclos (29 días) fue de 56 %. Por lo tanto, aunque sí se observó pérdida de actividad de estos *MAbs* con el uso de los correspondientes cartuchos en experimentos de EFS y a lo largo del tiempo, esta pérdida ocurrió en forma más paulatina que con el eluyente a base de acetonitrilo. Una ventaja adicional del uso de fases de ácido cítrico para la elución se presentó en la etapa de análisis. La limpieza de los cromatogramas obtenidos a partir de los eluatos preconcentrados en precolumnas con estas dos últimas fases de elución, fue significativamente mayor que en el caso de los cromatogramas obtenidos de eluatos con acetonitrilo/agua (ver cromatogramas C.6, C.7 y C.8).

### 3.4.3 Efecto del tiempo y el uso sobre la capacidad de retención de los inmunoabsorbentes

Antes de iniciar la evaluación de los *IS*s se realizaron dos o tres experimentos "blanco" de *EFS* en los cartuchos recién preparados. Estos consistieron en percolar a través del cartucho disoluciones de la misma composición que las usadas para la carga, lavado y elución, pero sin agregar *Cb* en la fase de carga. La única excepción a este tratamiento previo fue con el primer *IS* preparado, dopado con el *MAb* BFNB-52. La razón de dicho tratamiento se basa en observaciones hechas tanto en trabajos antecedentes como durante la evaluación del *IS* BFNB-52. En efecto, se ha comprobado que los primeros ciclos de *EFS* en cartuchos de inmunoabsorción recién preparados dan resultados muy dispares y en ocasiones aberrantes, que no reflejan realmente el comportamiento más regular que tendrá el anticuerpo encapsulado en ciclos posteriores. Por ello, en esta sección y en las siguientes, el punto de partida que se tomará para comparar los diferentes *IS*s y para deducir conclusiones respecto al efecto de los parámetros experimentales de la etapa de carga será el cuarto ciclo de *EFS*.

El número de experimentos totales de *EFS* realizados en los cartuchos de los cuatro inmunoabsorbentes varió entre 11 y 17; de éstos, los datos o resultados finalmente considerados para el análisis del comportamiento de cada cartucho fueron: 7 para BFNP-21, 8 para BFNB-67, 8 para BFNB-62 y 11 para BFNB-52. La diferencia entre ciclos realizados y datos tomados en cuenta fue debida, por una parte, a que sólo se contabilizaron datos a partir del cuarto ciclo de *EFS*, y por otra parte, a que en algunos casos aislados se presentaron interferencias durante el análisis, que impidieron una cuantificación confiable del carbofurano. Respecto al periodo total de tiempo durante el cual se trabajó con cada cartucho, éste fue de 34 días con BFNP-21, 37 días con BFNB-67, 45 días con BFNB-62 y 37 días con BFNB-52. Estas especificaciones son relevantes puesto que los anticuerpos encapsulados pierden actividad tanto en función del uso como en función del tiempo.

**Tabla 3.18** Disminución de la capacidad de enlazamiento de *Cb* para los cuatro inmunoabsorbentes en función del uso y el tiempo.

	Inmunoabsorbente			
	BFNB-52	BFNB-67	BFNB-62	BFNP-21
Capacidad máxima* [ng]	42.6	17.5	22.5	9.7
Capacidad final [ng]	7.1**	11.3	12.9	4.3
Ciclo de <i>EFS</i> correspondiente	17	11	12	10
Tiempo en uso [días]	37	37	44	29
Pérdida de actividad [%]	83	35	43	56

\*Estos resultados corresponden a la máxima retención observada, lo cual sistemáticamente ocurrió en los primeros ensayos (entre el cuarto y el sexto ciclo de *EFS*).

\*\*Para el *IS* con BFNB-52 los datos correspondientes al doceavo ciclo de *EFS* son: 11.2 ng de *Cb* retenido, 22 días en uso, 74 % de pérdida de actividad.

En la Tabla 3.18 se compara la disminución de actividad de los 4 anticuerpos encapsulados especificando el número de ciclos de *EFS* considerados y el tiempo en uso correspondiente. Para los *MAbs* BFNB-62 y BFNP-21 se realizó un ciclo más de *EFS*, respecto a lo señalado en la tabla, pero no se incluyó porque el resultado obtenido en ese caso estuvo gobernado por las condiciones experimentales empleadas y no

representa un efecto del tiempo o del número de usos. Por otra parte, para una mejor comparación del comportamiento de los anticuerpos, en el pie de tabla se indican los datos correspondientes al doceavo ciclo de *EFS* para el *IS* dopado con el *Mab* BFNB-52. Como puede observarse, el *Mab* BFNB-67 fue el que mejor preservó su actividad en función del tiempo y el uso. En este aspecto, el peor resultado fue el del *Mab* BFNB-52, pero esto es claramente debido al eluyente acetonitrilo-agua utilizado en los ensayos con este *IS*. Bajo condiciones de elución menos drásticas, la preservación de actividad de este *Mab* hubiera podido ser similar o incluso mayor a la de los otros anticuerpos. De hecho, la actividad del BFNB-52 medida en el cuarto ciclo de *EFS* fue muy superior a la de los otros *Mabs*. En lo que respecta al BFNP-21, los resultados de la tabla indican que es el menos interesante de los cuatro anticuerpos en todos sentidos; su actividad inicial es considerablemente menor y su pérdida de actividad con el uso y/o el tiempo es significativamente mayor a la de los *ISs* que fueron tratados con el eluyente de ácido cítrico.

En las Figuras 3.6 y 3.7 se puede apreciar más claramente la evolución de los inmunoabsorbentes, medida por la variación en la cantidad de carbófurano retenido a lo largo del tiempo y del número de usos respectivamente. Es importante mencionar que los resultados graficados para un mismo *IS*, fueron obtenidos de experimentos de *EFS* realizados bajo condiciones experimentales no idénticas, por lo que no son estrictamente comparables. Sin embargo, como se demostrará más adelante (secciones 3.4.4-3.4.7, estudio individual de cada *IS*), en las condiciones de carga usadas en el presente trabajo, algunos parámetros experimentales tienen una influencia nula o despreciable sobre la capacidad de retención de los *ISs*. De hecho, en las Figuras 3.6 y 3.7 se omitieron resultados de algunos ensayos de *EFS*, para los cuales se comprobó la existencia de un efecto significativo de las condiciones experimentales sobre la cantidad de carbófurano retenido.

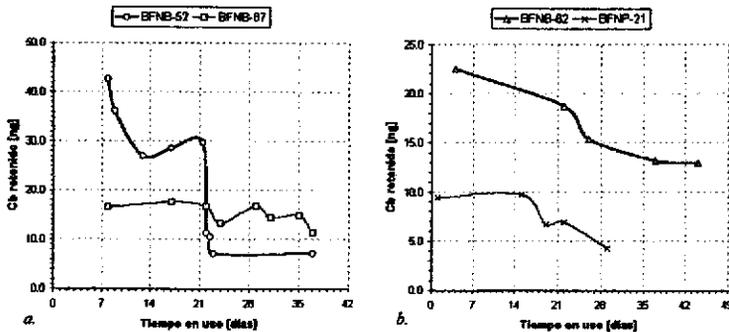


Figura 3.6 Evolución de la capacidad de retención de los cartuchos de inmunoeextracción en función del tiempo. *a.* Inmunoabsorbentes dopados con *Mabs* BFNB-52 y BFNB-67. *b.* Inmunoabsorbentes dopados con *Mabs* BFNB-62 y BFNP-21.

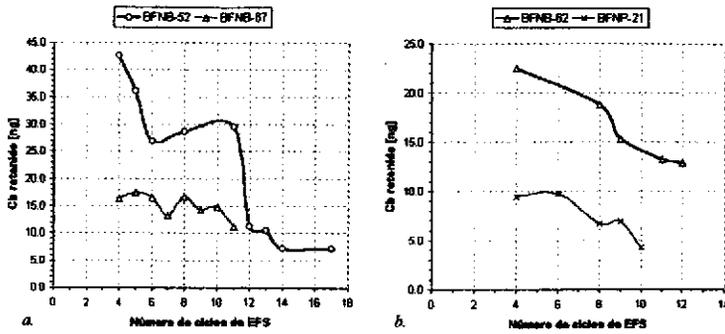


Figura 3.7 Evolución de la capacidad de retención de los cartuchos de inmunoadsorción en función del número de usos. a. Inmunoadsorbentes dopados con MAbs BFNB-52 y BFNB-67, b. ISs dopados con MAbs BFNB-62 y BFNP-21.

De acuerdo con estas figuras, la evolución del IS BFNB-52 se produjo en forma escalonada con caídas abruptas de actividad seguidas por zonas de meseta. Este comportamiento parece indicar que la desnaturalización irreversible del anticuerpo se lleva a cabo en dos etapas. En la primera etapa, que se produce de inmediato, las moléculas de anticuerpo más expuestas (probablemente situadas en poros más grandes dentro del soporte) son destruidas progresivamente por el disolvente orgánico en cada ciclo de EFS. Otra fracción de moléculas, encapsulada en poros más estrechos que impiden el desplegamiento abrupto de la proteína, logra resistir las condiciones adversas de las etapas de elución y mantener su funcionalidad. Sin embargo, ante la repetida exposición a condiciones agresivas, la estructura terciaria de la proteína se debilita y los sitios activos se distorsionan produciéndose la segunda caída de actividad. Esta caída tan pronunciada no se ha logrado explicar satisfactoriamente pues, según el modelo planteado, se esperaría un descenso más paulatino de actividad en la segunda etapa.

Por otra parte, la evolución de los ISs BFNB-62 y BFNP-21 es similar, con una pérdida ligera pero sistemática de actividad en cada ciclo de EFS. En ambos casos, la disminución de actividad parece estar asociada al uso (ciclos de EFS) y no al tiempo. Finalmente, el IS dopado con el MAbs BFNB-67 mostró la mayor constancia en cuanto a capacidad de retención. Las pequeñas variaciones de retención observadas parecen más bien aleatorias y por lo tanto están relacionadas con la propia incertidumbre del método analítico. Solamente en el último ciclo de EFS (#11) se nota una disminución de retención más significativa que se podría asociar con el inicio de degradación del anticuerpo debido al tiempo.

Los resultados mostrados en las Figuras 3.6 y 3.7 confirman que los anticuerpos, una vez encapsulados, presentan buena estabilidad. Sin embargo, es necesario que el eluyente utilizado en la EFS no sea demasiado agresivo para la biomolécula. En particular debe evitarse el uso de acetonitrilo, reemplazándolo en su caso por metanol y manteniendo una fase de elución predominantemente acuosa.

### 3.4.4 Inmunoabsorbente BFNB-52

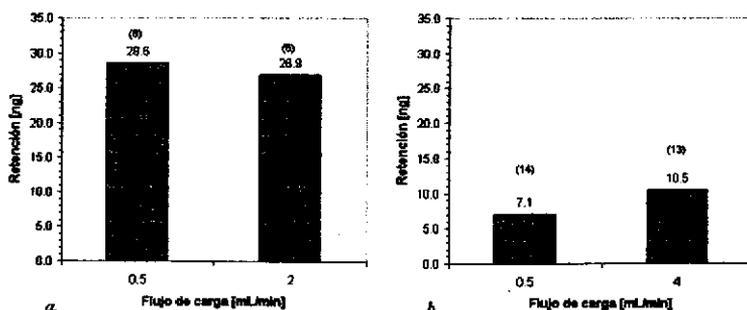
Considerando la tendencia de los *ISs* hacia la pérdida de actividad en función del uso y el tiempo, es necesario realizar la comparación de experimentos consecutivos o muy próximos para poder poner de manifiesto, en su caso, el efecto de otros parámetros experimentales de interés. Esto fue particularmente importante en el caso del anticuerpo BFNB-52 cuya desnaturalización irreversible fue más rápida y marcada debido al eluyente acetonitrilo-agua utilizado.

#### 3.4.4.1 Efecto de la velocidad de flujo en la etapa de carga

En la *Figura 3.8* se presentan resultados de dos pares de experimentos que demuestran claramente la ausencia de efecto del flujo sobre la retención del carbofurano en el *IS* dopado con el *MAb* BFNB-52. El primer par de ensayos comparados corresponde a los ciclos cronológicos #6 y #8 de *EFS*, en los cuales se cargó un volumen de 50 mL de buffer conteniendo 100 ng de *Cb* a flujo de 2 y 0.5 mL min<sup>-1</sup>, respectivamente y la cantidad de *Cb* retenido fue de 26.9 y 28.6 ng, respectivamente. Dada la incertidumbre del método analítico, la pequeña diferencia entre ambos valores no es significativa, por lo que se asume que en el intervalo de velocidades de flujo de 0.5-2 mL min<sup>-1</sup> este parámetro no tiene influencia sobre la retención del analito.

El segundo par comparado corresponde a los ciclos de *EFS* #13 y #14 con una carga de 80 ng de *Cb* en 25 mL de buffer a flujo de 4 y 0.5 mL min<sup>-1</sup>, respectivamente. Aunque en este caso la diferencia en la cantidad de *Cb* retenido es un poco mayor (3.4 ng), esta sólo refleja el efecto de la degradación progresiva del *IS* y no del flujo. Como puede observarse, la mayor cantidad retenida (10.5 ng) se obtuvo para el primero de los dos experimentos realizados, cuyo flujo era el más alto (4 mL min<sup>-1</sup>). Puesto que una disminución en la velocidad de flujo, en caso de tener influencia, repercute en un aumento de la retención, los resultados obtenidos confirman la ausencia de influencia de este parámetro en el comportamiento del inmunoabsorbente.

En resumen, se establece como evidencia que la velocidad de flujo, en el intervalo de 0.5-4 mL min<sup>-1</sup>, no tiene influencia sobre la capacidad de enlazamiento del analito por el *MAb* BFNB-52 encapsulado. Esto podría significar que la cinética de difusión del soluto a través del esqueleto sólido del soporte y la subsecuente formación del complejo *Ab-Ag* son bastante rápidas.



*Figura 3.8* Efecto de la velocidad de flujo en la etapa de carga sobre la retención del *Cb* en el *IS* dopado con el *MAb* BFNB-52. *a.* Carga de 100 ng de *Cb* en 50 mL de buffer. *b.* Carga de 80 ng de *Cb* en 25 mL de buffer. Entre paréntesis se indica el número de ciclo de *EFS* que corresponde a cada ensayo.

## 3.4.4.2 Efecto de la masa de analito y del volumen de carga

Para el estudio de estos parámetros se analizaron dos conjuntos de 8 experimentos de EFS. Los datos correspondientes a estos experimentos y los resultados obtenidos se muestran en las Tablas 3.19 y 3.20 y la Figura 3.9.

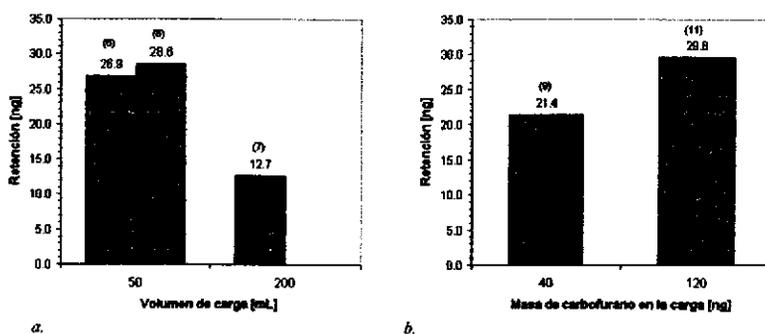
**Tabla 3.19** Retención del Cb en el IS dopado con el MAb BFNB-52 bajo condiciones de masa cargada constante y volumen de carga variable.

# Ciclo	Masa de Cb [ng]	Volumen de carga [mL]	Concentración* [ng mL <sup>-1</sup> ]	Flujo [mL min <sup>-1</sup> ]	Retención [ng]
6	100	50	2	2	26.9
7	100	200	0.5	1	12.7
8	100	50	2	0.5	28.6

\*Concentración del carbofurano en la disolución de carga.

**Tabla 3.20** Retención del Cb en el IS dopado con el MAb BFNB-52 bajo condiciones de volumen de carga constante y masa cargada variable.

# Ciclo	Masa de Cb [ng]	Volumen de carga [mL]	Concentración [ng mL <sup>-1</sup> ]	Flujo [mL min <sup>-1</sup> ]	Retención [ng]
9	40	25	1.6	0.5	21.4
11	120	25	4.8	0.5	29.6



**Figura 3.9** Efecto del volumen y la masa en la disolución de carga sobre la retención del Cb en el IS dopado con el MAb BFNB-52. *a.* Carga de 100 ng de Cb en 50 y 200 mL de buffer. *b.* Carga de 40 y 120 ng de Cb en 25 mL de buffer.

En la Tabla 3.19 se reportan los resultados de dos experimentos casi idénticos (sólo difieren en el flujo), entre los cuales está intercalado un experimento realizado en condiciones totalmente diferentes. Esto tiene por objeto establecer inequívocamente que los resultados obtenidos son producto de las condiciones experimentales utilizadas y no del tiempo o uso del IS. El valor del flujo se incluye en la tabla únicamente como dato, pues ya se ha visto que este parámetro no afecta a la retención. Como puede observarse, un aumento en el volumen de carga a masa cargada constante provoca una disminución drástica (mayor al 50 %) en la retención del carbofurano (ver Figura 3.9 *a.*). Para la discusión que se presentará más adelante, es importante notar que al aumentar el volumen de carga se produce una disminución equivalente de la

concentración del analito en la solución de carga. Además, también es importante mencionar que en este conjunto de experimentos, el mínimo volumen cargado fue de 50 mL y la masa cargada fue por lo menos 3.5 veces superior a la masa finalmente retenida.

En la **Tabla 3.20** se presentan los resultados de dos experimentos en los cuales la masa cargada se incrementó de 40 a 120 ng, manteniendo el volumen de disolución constante (así como el flujo). Evidentemente, la concentración de  $C_b$  en la solución de carga aumentó proporcionalmente al incremento en la masa. Los resultados obtenidos muestran un aumento, no muy grande pero significativo, en la retención de  $C_b$  entre los ciclos #9 y #11 de *EFS* (ver *Figura 3.9 b.*). Por el orden cronológico de los experimentos, se deduce que el efecto observado es forzosamente debido a las condiciones experimentales y no a factores relacionados con la evolución del *IS* por el uso o el tiempo. Es interesante notar que la cantidad de  $C_b$  retenido en el ciclo #11 es similar a la de los ciclos #6 y #8 de la **Tabla 3.19**.

La interpretación de estos resultados no es sencilla. Por ejemplo comparando los ciclos #6, #8 y #11 se podría llegar a la conclusión de que ni la masa ni el volumen de carga, tienen efecto sobre la retención; pero como ya se mencionó, comparando entre sí los resultados de cada tabla se llega a la conclusión contraria. Para poder entender el comportamiento observado es necesaria una discusión profunda sobre las isothermas de adsorción en los inmunoabsorbentes y sobre el estado de equilibrio en un cartucho o columna. En la siguiente sección se hace una presentación de estos temas que servirá como base para interpretar resultados obtenidos con los 4 diferentes inmunoabsorbentes estudiados.

#### 3.4.4.3 Isothermas de adsorción y estado de equilibrio

Típicamente, la isoterma de adsorción de un analito (antígeno) en un inmunoabsorbente es del tipo Langmuir y obedece la ecuación (*E.I*):

$$Q_{(st)} = \frac{Q_{\max(st)} K C_{(m)}}{1 + K C_{(m)}} \quad (E.I)$$

Donde,  $Q_{(st)}$  y  $Q_{\max(st)}$  son la cantidad actual de soluto retenido al equilibrio en el *IS* y la máxima cantidad de soluto que puede retener el *IS* considerando el número de sitios activos del anticuerpo encapsulado (incluyendo sólo los sitios accesibles al soluto y que permanecen activos al momento en que se realiza el experimento);  $C_{(m)}$  es la concentración de soluto en la fase móvil (disolución percolada) al equilibrio;  $K$  es la constante de la isoterma, que en el caso de un *IS* es igual a la constante de formación del complejo *Ab-Ag* (bajo la suposición de que la energía de interacción es la misma para todos los sitios activos disponibles en el *IS*). De acuerdo con la ecuación (*E.I*) la curva de la isoterma se puede dividir en dos partes bien diferenciadas (ver *Figura 3.10 a.*), una rama ascendente de forma hiperbólica en función de  $C_{(m)}$  seguida de una meseta indicativa de la saturación de los sitios activos. Se puede considerar que la meseta de saturación se alcanza cuando  $K C_{(m)} \geq 100$  (es decir, el término 1 se hace despreciable). Lo anterior implica que, entre más estable sea el complejo *Ab-Ag*, menor será la concentración de soluto en la fase móvil requerida para la saturación del adsorbente.

Cuando dos ensayos de *EFS* se realizan en condiciones diferentes, pero éstos son tales que la concentración de analito en la solución de carga corresponde en ambos casos a la zona de saturación de la isoterma, la cantidad de analito retenido en los dos experimentos será igual (*Figura 3.10 b.*, puntos indicados por *i*). Por el contrario, cuando al menos una de las concentraciones corresponde a la rama ascendente de la

isoterma (*Figura 3.10 b.*, punto *ii*), la cantidad de compuesto adsorbido será diferente en ambos experimentos. Por otra parte, si las concentraciones de analito en los dos experimentos son diferentes pero muy pequeñas (tal que  $K C_{(m)} \ll 1$ ), entonces la cantidad de compuesto retenido será diferente, pero esta diferencia será proporcional a la diferencia de concentraciones (ver *Figura 3.10 c.*).

Durante la degradación progresiva de un inmunoadsorbente (p.ej. por el uso o el tiempo) pueden ocurrir dos diferentes fenómenos: (1) desnaturalización irreversible de algunas moléculas de anticuerpo y consecuentemente disminución de sitios activos que se traduce por una disminución de  $Q_{\max(st)}$  y (2) distorsión parcial de los sitios activos del anticuerpo encapsulado que conlleva al debilitamiento de su interacción con el antígeno y por lo tanto a la disminución de  $K$ . En los dos casos, el resultado neto es una disminución de  $Q_{(st)}$  pero con ciertas particularidades. En el primer caso, la cantidad de soluto adsorbido disminuye (con respecto a la retención observada antes de la degradación) para cualquier valor de  $C_{(m)}$ ; incluyendo por supuesto concentraciones de soluto correspondientes a la meseta de saturación (comparar Isotermas 1, 2 y 3 en *Figura 3.10 d.*). En el segundo caso, el número absoluto de sitios activos se mantiene y la cantidad máxima de soluto que puede retenerse es la misma, pero se requieren concentraciones más elevadas de soluto en la fase móvil para alcanzar la meseta de saturación. Esto último significa que la pendiente de la rama ascendente de la isoterma disminuye mientras que la meseta de saturación se mantiene en el mismo nivel (respecto al eje de ordenadas en la curva  $Q_{(st)}$  vs.  $C_{(m)}$ ), tal y como es el caso observado al comparar las Isotermas 1, 4 y 5 en la *Figura 3.10 d.* En la práctica, es probable que ambos fenómenos ocurran ya sea en forma simultánea o secuencial (debilitamiento de sitios  $\rightarrow$  pérdida de sitios) durante la degradación de un inmunoadsorbente.

Las consideraciones expuestas en los párrafos anteriores son válidas, si y sólo si, se alcanza el estado de equilibrio entre el adsorbente y la disolución percolada. En un sistema de *EFS*, el estado de equilibrio se alcanza cuando el frente de migración del soluto emerge completamente del cartucho o columna; en cuyo caso, la concentración de soluto en el efluente es igual a la concentración de soluto en el influente (ver *Figura 1.4 a.* en el apartado 1.2.1: curva de análisis frontal).

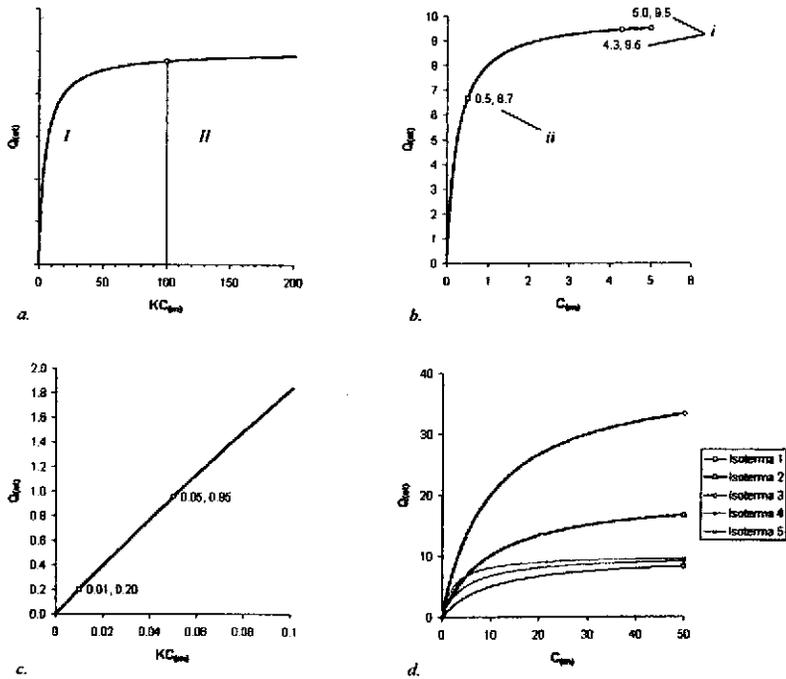
Cabe mencionar que también es posible que una diferencia de retención observada entre dos experimentos de *EFS* realizados a diferentes condiciones sea debida a que no se alcanzó el estado de equilibrio en uno o ambos ensayos. Esto suele suceder cuando se cumplen algunas de las siguientes condiciones: (1) la cinética del proceso es lenta, (2) la concentración de analito en la solución de carga es muy baja, (3) el volumen percolado es pequeño, y (4) la masa total cargada es pequeña. El estado de no equilibrio se puede identificar por un aumento en la cantidad de analito retenido en los siguientes casos:

- al aumentar el volumen cargado, manteniendo constantes el flujo y la concentración del compuesto en la solución de carga.
- al disminuir el flujo manteniendo constantes el volumen cargado y la concentración de analito.

Sin embargo, estas pruebas presuponen un adsorbente de características estables. Cuando el adsorbente se degrada paulatinamente, las pruebas anteriores sólo pueden dar indicaciones confiables si se comparan ensayos consecutivos o muy cercanos.

Una consideración adicional que permite estimar si se alcanza o no el estado de equilibrio es la comparación de las masas de analito retenido y no retenido en un experimento dado. De acuerdo con lo

presentado en la sección 1.2.1, el área sobre la curva del frente de migración en un análisis frontal es proporcional a la cantidad de soluto retenido, mientras que el área bajo la curva hasta el límite marcado por el volumen percolado es proporcional a la cantidad de soluto no retenido. En todos los experimentos que se reportan en este trabajo para los 4 inmunoabsorbentes, la cantidad de soluto no retenido fue mayor, o por lo menos igual, a la cantidad de soluto retenido. Analizando la curva de análisis frontal se deduce que forzosamente el volumen percolado (cualquiera que este haya sido) fue mayor o por lo menos igual al volumen del punto de equilibrio, por lo tanto se puede asegurar que en todos los casos se alcanzó el estado de equilibrio.



**Figura 3.10** Isothermas de adsorción de un analito en un inmunoabsorbente. *a.* *I*, rama ascendente hiperbólica; *II*, meseta indicativa de la saturación de los sitios activos ( $K C_{(m)} \geq 100$ ); la escala del eje de las ordenadas es arbitraria. *b.* Ejemplos de ensayos de *EFS* hechos bajo tres condiciones distintas: *i*, diferentes concentraciones de analito en la disolución de carga dentro de la zona de saturación de la isoterma (misma retención en ambos casos); *ii*, concentración de analito correspondiente a la rama ascendente de la isoterma (retención distinta a la obtenida en *i*); las unidades en ambos ejes son completamente arbitrarias. *c.* Concentraciones de analito y valores de retención respectivos para dos ensayos de *EFS* hechos tal que  $K C_{(m)} \ll 1$ . *d.* Cinco ejemplos de isothermas graficadas a partir de 3 valores de  $K$  y 3 valores de  $Q_{\max(st)}$ : Isooterma 1,  $K = 1 \times 10^8 M^{-1}$ ,  $Q_{\max(st)} = 10$  ng; Isooterma 2,  $K = 1 \times 10^8 M^{-1}$ ,  $Q_{\max(st)} = 20$  ng; Isooterma 3,  $K = 1 \times 10^8 M^{-1}$ ,  $Q_{\max(st)} = 40$  ng; Isooterma 4,  $K = 2 \times 10^8 M^{-1}$ ,  $Q_{\max(st)} = 10$  ng; Isooterma 5,  $K = 4 \times 10^8 M^{-1}$ ,  $Q_{\max(st)} = 10$  ng; el eje de las ordenadas se halla expresado en unidades de ng y el eje de las abscisas en nM.

**3.4.4.4 Interpretación de resultados para el IS dopado con el MAb BFNB-52.**

Habiendo establecido que los resultados anteriormente presentados (sección 3.4.4.2) en las Tablas 3.19 y 3.20 corresponden a un estado de equilibrio, es ahora posible relacionarlos con las isoterma de adsorción del *Cb* en el IS dopado con el MAb BFNB-52.

Analizando la Tabla 3.19 se observa que al aumentar el volumen de carga se produce una notable disminución en la retención; sin embargo, el parámetro de importancia en este caso no es el volumen sino la concentración. De acuerdo con lo discutido en la sección anterior, se deduce que una concentración de 0.5 ng mL<sup>-1</sup> de *Cb* (0.5 ppb) en la disolución percolada corresponde a la rama ascendente de la isoterma puesto que, al aumentar la concentración a 2 ppb, aumenta la cantidad retenida. Para saber si esta última concentración corresponde a la zona de saturación de la isoterma es necesario proceder al análisis de la Tabla 3.20.

En la Tabla 3.20 se observa que un aumento en la masa cargada, a volumen constante, se traduce en un ligero aumento en la cantidad de *Cb* retenido. Nuevamente, el factor de importancia en estos experimentos no es la masa sino la concentración. No obstante, a diferencia de la Tabla 3.19, en el caso presente un aumento de 3 veces en la concentración no produjo un aumento muy notable en la retención. De hecho, si se compara el ciclo #9 de la Tabla 3.20 con los ciclos #6 y #8 de la Tabla 3.19 se observa una mayor congruencia, ya que en el primero la concentración es ligeramente menor (1.6 ppb en el ciclo #9 y 2 ppb en los ciclos #6 y #8) y la cantidad retenida también es ligeramente menor (21.4 ng comparado con 27.7 ng, como promedio de los dos ciclos). Por el contrario, la comparación del ciclo #11 (concentración 4.8 ppb, cantidad retenida 29.6 ng) con los ciclos #6 y #8 muestra aparentemente una incongruencia, puesto que la concentración en el primero es más del doble que en los segundos y, sin embargo, las cantidades retenidas son prácticamente iguales.

La explicación más plausible a todas las observaciones comentadas es que la meseta de saturación de la isoterma se alcanza cuando la concentración de *Cb* en la fase móvil al equilibrio es de aproximadamente 2 ppb. Así, la concentración de *Cb* en los ciclos #6, #8 y #11 se sitúa en la zona de saturación, en el ciclo #9 se encuentra cercana a la meseta pero sin alcanzarla y en el ciclo #7 corresponde francamente a la rama ascendente de la isoterma. Es importante hacer notar que esta deducción es válida solamente para las condiciones en que se encontraba el inmunoadsorbente (es decir el estado de actividad) en el periodo de tiempo en que se realizaron estos experimentos.

Utilizando los resultados obtenidos y la ecuación de la isoterma (*E.1*) es posible estimar aproximadamente el valor de la constante de formación del complejo *Cb*-MAb BFNB-52. A continuación se presentan dos formas distintas de cálculo.

1. Se asume que la cantidad máxima de *Cb* que puede adsorberse es de alrededor de 29 ng ( $Q_{max(st)} = 29$ ) y se utilizan los resultados del ciclo #7 (que no está en la zona de saturación).

Dado que P.M. del *Cb* = 221.26 g mol<sup>-1</sup> se tiene que:

$$C_{(m)} = 0.5 \text{ ng mL}^{-1} = 2.26 \times 10^{-9} \text{ M}$$

$$Q_{(st)} = 12.7 \text{ ng}$$

Sustituyendo en (*E.1*)

$$12.7\text{ng} = \frac{29\text{ng} \times K \times 2.26 \times 10^{-9} \text{M}}{1 + K \times 2.26 \times 10^{-9} \text{M}}$$

De donde despejando K se tiene

$$K = 3.45 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$$

- Se asume que la constante K es independiente de la concentración en el intervalo de 0.5-1.6 ppb y se utilizan los resultados de los ciclos #7 y #9, asumiendo además que este último corresponde a un punto situado antes de la meseta de saturación.

Despejando K en la ecuación (E.1):

$$K = \frac{Q_{(st)}}{C_{(m)}(Q_{\max(st)} - Q_{(st)})}$$

Igualando para los ciclos #7 y #9:

$$\frac{12.7\text{ng}}{(2.26 \times 10^{-9} \text{M}) \times (Q_{\max(st)} - 12.7\text{ng})} = \frac{21.4\text{ng}}{3.2 \times (2.26 \times 10^{-9} \text{M}) \times (Q_{\max(st)} - 21.4\text{ng})}$$

Nota:  $C_{(m)}$  en el ciclo #9 es 3.2 veces mayor que en el ciclo #7

Se obtiene:  $Q_{\max(st)} = 31.1 \text{ ng}$  y  $K = 3.05 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$

Como puede observarse, ambas formas de cálculo conducen a resultados similares y éstos validan la interpretación de resultados presentada anteriormente. En efecto, aunque la cantidad retenida en los ciclos #6, #8 y #11 (considerados en la zona de saturación) es ligeramente inferior al valor de  $Q_{\max(st)}$  calculada, se debe recordar que la meseta de saturación de la isoterma no es estrictamente constante sino que corresponde a la rama de una hipérbola que tiende asintóticamente a un cierto valor, en este caso ese valor es 31.1 ng. En lo que se refiere a la constante K, ésta es de un orden de magnitud similar al encontrado por Wang et al. [43] para la formación del complejo fluoresceína-antifluoresceína en un inmuoadsorbente sol-gel. Estos investigadores reportaron una constante de  $0.7 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$  en el gel, la cual comparada con la que determinaron para el mismo complejo en solución ( $2 \times 10^{10} \text{ M}^{-1}$ ), indica una pérdida de actividad del orden de magnitud de  $10^2$  por el encapsulamiento. En nuestro caso, se piensa que el valor obtenido de K estuvo influido por la degradación sufrida por el inmuoadsorbente a causa del eluyente acetonitrilo-agua utilizado en cada ciclo de EFS.

### 3.4.5 Inmuoadsorbente BFNB-67

Debido a la mayor estabilidad presentada por este inmuoadsorbente a lo largo del tiempo, fue posible evaluar con mayor facilidad y confiabilidad los efectos sobre la retención causados por las tres variables manejadas en la etapa de carga.

#### 3.4.5.1 Efecto del flujo de carga

Los resultados obtenidos al variar la velocidad de flujo en la carga están incluidos en la *Figura 3.11*. En ella se muestran los valores de retención observados para cuatro ensayos hechos con 100 ng de pesticida contenido en volúmenes no mayores que 50 mL, a velocidades de flujo de 0.5 a 4 mL  $\text{min}^{-1}$ . Los ensayos hechos a 0.5 y 2 mL  $\text{min}^{-1}$  corresponden a un volumen de carga de 25 mL, mientras que los ensayos restantes

se realizaron con 50 mL. De los resultados obtenidos se observa que a un flujo de carga menor o igual que 1 mL min<sup>-1</sup>, el valor de retención permanece constante, sin embargo, se presenta una pequeña disminución en la retención a flujos de carga mayores que 1 mL min<sup>-1</sup>. Por esta razón es necesario considerar el error asociado a los valores de retención determinados, para poder decidir si existe diferencia significativa entre los dos resultados obtenidos a flujos bajos y los resultados a flujos altos. Los valores de incertidumbre corresponden a 4.5, 4.5, 3.6 y 3.9 ng, en el mismo orden señalado por el gráfico. De aquí puede afirmarse que, dados los valores de incertidumbre, no hay diferencia en la retención para los cuatro ensayos incluidos, y por tanto, no existe efecto de flujo sobre la retención. Esto confirma que en los 4 experimentos se alcanzó el estado de equilibrio y, en estas condiciones no es posible saber si la cinética de difusión del pesticida en el inmunoadsorbente y la formación del complejo antígeno-anticuerpo son rápidas.

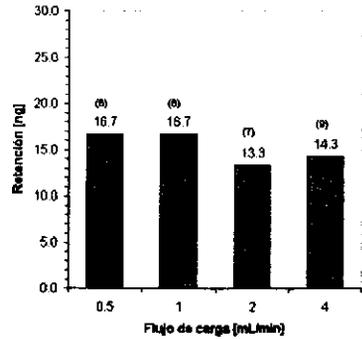


Figura 3.11 Efecto del flujo de carga sobre la retención de Cb en el IS BFNB-67. Carga de 100 ng de Cb en 25 mL (ciclos #6 y #7) o 50 mL (ciclos #8 y #9).

### 3.4.5.2 Efecto de la masa de analito en la carga

En lo que respecta al estudio del efecto de la masa de analito en la carga, se incluyen en la Figura 3.12 los resultados de retención de dos ensayos de inmunoextracción. Ambos experimentos fueron realizados con disoluciones de carga de 25 mL a una velocidad de flujo de 1 mL min<sup>-1</sup>. Los valores de masa disueltos en las disoluciones percoladas fueron 50 (2 ppb) y 100 ng (4 ppb), y la retención observada fue de 16.4 y 17.5 ng, respectivamente. Pese a una pequeña diferencia entre ambos valores, tal discrepancia no es mayor al valor de incertidumbre porcentual para cada uno de los resultados incluidos. Por ello, es válido afirmar que la retención del cartucho cargado con 50 ng en las condiciones de volumen y flujo mencionadas, es la misma que

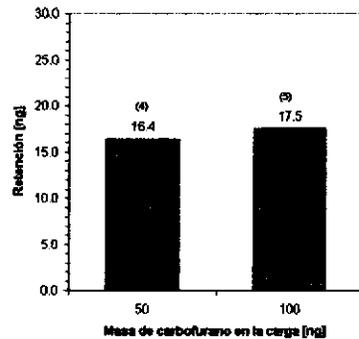


Figura 3.12 Efecto de la masa de analito en la carga sobre la retención de Cb en el IS BFNB-67. Volumen de carga 25 mL, velocidad de flujo de 1 mL min<sup>-1</sup>.

con una masa de carga de 100 ng, en las mismas condiciones. Por tanto, no se presenta efecto de masa desde 50 a 100 ng de carbofurano, contenidos en 25 mL y percolados a 1 mL min<sup>-1</sup>. Debido a que los valores de

retención para ambos ensayos son iguales, es posible decir que a esas concentraciones (2 y 4 ppb, respectivamente) se ha alcanzado en ambos ensayos la meseta de saturación de la isoterma de adsorción; es decir, todos los sitios activos (y accesibles) del anticuerpo encapsulado fueron ocupados por moléculas de carbofuran.

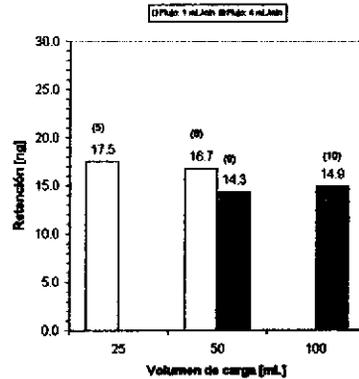
### 3.4.5.3 Efecto del volumen de carga

Los resultados sobre el efecto del volumen de carga se exponen en los gráficos de barras de la *Figura 3.13*. En ellos se incluyen dos series de experimentos. La primera serie (blanco) corresponde a dos ensayos hechos percolando 100 ng de *Cb* disueltos en 25 mL y en 50 mL (4 y 2 ppb, respectivamente), a una velocidad de flujo de 1 mL min<sup>-1</sup>. La segunda serie (gris) se obtuvo con dos ensayos de cargas con 100 ng de *Cb*, pero disueltos en 50 mL y 100 mL (2 y 1 ppb, respectivamente), percolados a 4 mL min<sup>-1</sup>.

Dada la incertidumbre del método analítico y el orden cronológico en el que fueron realizados los experimentos, la pequeña diferencia de retención entre las dos series no es significativa o bien puede atribuirse a una

ligera disminución de actividad del *IS* con el tiempo y el uso. Por tal motivo, es válido afirmar que no existe efecto del volumen de carga sobre la retención del *IS* dopado con el *MAb* BFNB-67 en el intervalo de 25 a 100 mL. Además es importante hacer notar que la concentración de *Cb* en la fase móvil del último ensayo (ciclo #10) fue de 1 ppb. Puesto que, como ya se discutió en una sección anterior, todos los ensayos corresponden a un estado de equilibrio, se concluye que para este inmunoadsorbente la meseta de saturación de la isoterma se alcanza desde concentraciones de 1 ppb en la fase móvil.

Desafortunadamente no se hicieron ensayos a concentraciones menores con este inmunoadsorbente, lo que impide determinar con mayor precisión la concentración mínima a la cual se alcanza la zona de saturación. Por otra parte, no es posible estimar el valor de la constante de la isoterma porque todos los ensayos realizados corresponden a la meseta de saturación. Sin embargo, es obvio que la constante de formación del complejo *Ab-Ag* es mayor en este inmunoadsorbente que en el *IS* dopado con el *MAb* BFNB-52 (al momento de hacer el estudio correspondiente). Por otra parte, el número de sitios activos disponibles es menor en el *IS* BFNB-67 que en el *IS* BFNB-52, es decir,  $Q_{max(st)}$  es menor. Esto último se explica por dos razones: en primer lugar, la cantidad de anticuerpo usado en la preparación del *IS* BFNB-67 fue menor, en segundo lugar el secado de este inmunoadsorbente fue más intenso (más del 50 % de pérdida de peso) por lo que una mayor proporción del anticuerpo encapsulado pudo desnaturalizarse en esa etapa.



*Figura 3.13* Efecto del volumen de carga sobre la retención de *Cb* en el *IS* BFNB-67. Masa cargada 100 ng, a flujo de 1 mL min<sup>-1</sup> (ciclos #5 y #8) o 4 mL min<sup>-1</sup> (ciclos #9 y #10).

### 3.4.6 Inmunoadsorbente BFNB-62

Aunque este inmunoadsorbente presentó una capacidad de retención más alta que el IS BFNB-67 en los primeros ensayos de EFS, posteriormente tuvo una sistemática y progresiva disminución de actividad en función del tiempo y del uso. Por ello, en el análisis del efecto de las variables experimentales, es necesario tener en cuenta dicho factor para una interpretación correcta.

#### 3.4.6.1 Efecto de la velocidad de flujo durante la carga

Para este estudio se toman en cuenta los resultados de dos diferentes conjuntos de experimentos. El primer conjunto considera dos ensayos realizados con una carga de 50 ng de Cb en 25 mL de buffer a flujos de 0.5 y 1 mL min<sup>-1</sup>. En el segundo conjunto se incluyen cuatro ensayos efectuados con una carga de 150 ng de Cb en 25 o 50 mL de buffer, a flujos de 0.5, 2 y 4 mL min<sup>-1</sup>. Los resultados obtenidos se presentan en la Figura 3.14, marcando el primer conjunto con barras blancas y el segundo con barras grises.

Como puede observarse para el primer conjunto, un aumento del flujo de 0.5 a 1 mL/min no provoca un cambio significativo en la retención. De hecho, la cantidad retenida es ligeramente mayor en el ensayo al flujo más alto, pero se debe notar que esto coincide con el orden cronológico de los experimentos. Por otra parte, en el segundo conjunto, aparentemente se obtiene una mayor retención al flujo más bajo (0.5 mL min<sup>-1</sup>); sin embargo, comparando los experimentos a 2 y 4 mL min<sup>-1</sup> no se detecta un efecto definido de este parámetro. Más bien, dentro de este conjunto, las diferentes cantidades de Cb retenido están estrechamente relacionadas con el orden en que se realizaron los experimentos (al igual que en el caso anterior). En resumen, se puede establecer que la velocidad de flujo no afecta la retención del analito en el intervalo de 0.5 a 4 mL min<sup>-1</sup>. Esto confirma que, en todas las condiciones empleadas para estos experimentos, se alcanzó el estado de equilibrio; es decir, el volumen de solución percolada fue suficiente para que el frente de migración del carbofurano emergiera completamente del cartucho de inmunoadsorción.

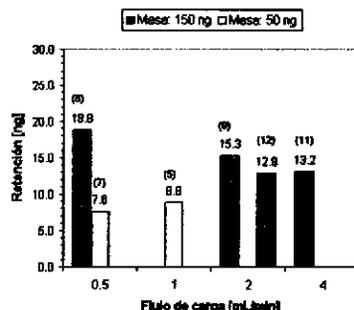
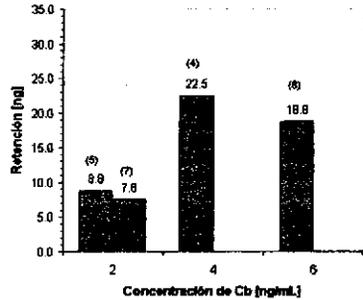


Figura 3.14 Efecto del flujo de carga sobre la retención de Cb en el IS BFNB-62. Carga de 50 ng (ciclos #5 y #7) o 150 ng de Cb en 25 mL (ciclos #8, #9, #11 y #12).

#### 3.4.6.2 Efecto de la masa de analito y el volumen de carga

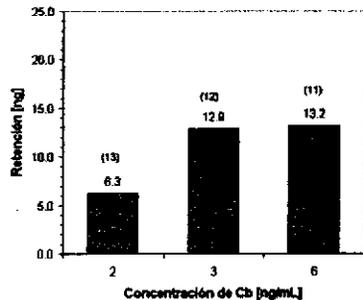
De acuerdo con lo que se ha discutido en la evaluación de los inmunoadsorbentes anteriores, la masa cargada a volumen constante o el volumen percolado a masa constante no son por sí mismos, en tanto que masa o volumen, los parámetros que definen la retención en un estado de equilibrio. El parámetro relevante en ambos casos es la concentración del analito en la solución de carga (fase móvil) y su relación con la isoterma de adsorción. Por eso se decidió tratar los dos tipos de experimentos conjuntamente.

En la *Figura 3.15* se muestran los resultados de retención obtenidos en experimentos realizados a masa cargada variable (50, 100 y 150 ng) y volumen percolado constante (25 mL). Las concentraciones respectivas de *Cb* en estos ensayos fueron 2, 4 y 6 ng mL<sup>-1</sup>. Aunque el orden cronológico de los experimentos tiene influencia en los resultados, es evidente que si hay un efecto de la concentración para los ensayos realizados con 2 ng mL<sup>-1</sup> de *Cb* en la solución de carga. También es obvio que la diferencia observada entre los ensayos a 4 y 6 ng mL<sup>-1</sup> de *Cb* (22.5 y 18.8 ng retenidos, respectivamente) es únicamente debida a la degradación progresiva del *IS*, pues un aumento de concentración en la fase móvil nunca genera una disminución de retención. De estos resultados se concluye que la concentración de 2 ng mL<sup>-1</sup> corresponde a la rama ascendente de la isoterma de adsorción, mientras que a concentración de 4 ng mL<sup>-1</sup> es probable que la meseta de saturación ya se haya alcanzado.



*Figura 3.15* Retención de *Cb* en el *IS* BFNB-62 en función de la concentración a masa cargada variable y volumen constante. Cargas de 50, 100 y 150 ng de *Cb* en 25 mL de buffer a flujo  $\leq 1$  mL min<sup>-1</sup>.

La *Figura 3.16* muestra resultados de tres ensayos consecutivos en los que se cargaron 150 ng de *Cb* en volúmenes de 25, 50 y 75 mL de buffer. Las concentraciones respectivas son 6, 3 y 2 ng mL<sup>-1</sup> de *Cb* en la solución de carga. Los resultados obtenidos ponen en evidencia que no hay una diferencia significativa de retención entre los experimentos realizados a concentraciones de 3 y 6 ng mL<sup>-1</sup> de *Cb* en fase móvil, pero nuevamente se observa una fuerte diferencia para la concentración de 2 ng mL<sup>-1</sup>. Es importante hacer notar que estos experimentos son los últimos realizados en el cartucho del *IS* BFNB-62 (entre los días 37 y 45 contados a partir de su primer uso). Por esta razón la cantidad de *Cb* retenida en el experimento a



*Figura 3.16* Retención de *Cb* en el *IS* BFNB-62 en función de la concentración a masa cargada constante y volumen variable. Cargas de 150 ng de *Cb* en 25, 50 y 75 mL de buffer a flujo de 4 mL min<sup>-1</sup> (ciclo #11) y 2 mL min<sup>-1</sup> (ciclos #12 y #13).

concentración de 6 ng mL<sup>-1</sup> es bastante menor que la presentada en la *Figura 3.15* para la misma concentración (experimento realizado en día 22). A pesar de estas variaciones provocadas por la degradación del *IS*, los ensayos de la *Figura 3.16* son consecutivos y no dejan duda respecto al efecto observado para una concentración de 2 ng mL<sup>-1</sup>. Por otra parte, de acuerdo con estos resultados, aparentemente la meseta de

saturación de la isoterma se alcanza desde una concentración de  $3 \text{ ng mL}^{-1}$ . Además, el comportamiento de este inmunoabsorbente parece indicar que la disminución en su capacidad de retención está relacionada con la pérdida de sitios activos por desnaturalización del anticuerpo (es decir, disminución de  $Q_{\text{max(st)}}$ ) y no es debida (o al menos en menor grado) al debilitamiento de la interacción *Ag-Ab* (es decir,  $K$  no disminuye con el tiempo).

Comparando los 3 inmunoabsorbentes ya analizados, con respecto a la concentración de analito requerida para alcanzar la meseta de saturación de la isoterma, se tiene lo siguiente:

**Tabla 3.21** Concentración de saturación aproximada para los inmunoabsorbentes BFNB-52, BFNB-67 y BFNB-62.

Inmunoabsorbente	Concentración de saturación [ $\text{ng mL}^{-1}$ ]
BFNB-52	$1.6 < C_{\text{pm}} < 2$
BFNB-67	$C_{\text{pm}} < 1$
BFNB-62	$2 < C_{\text{pm}} < 3$

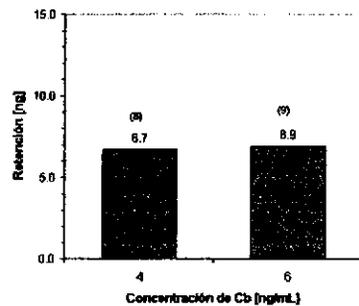
Por lo tanto, se deduce que el complejo más estable lo forma el *IS* BFNB-67 y el menos estable el *IS* BFNB-62. Sin embargo, dado que el *IS* BFNB-52 fue tratado con un eluyente muy diferente y mucho más agresivo, no se pueden plantear conclusiones definitivas sobre la estabilidad del complejo comparada con la del *IS* BFNB-67.

### 3.4.7 Inmunoabsorbente BFNP-21

De los cuatro inmunoabsorbentes preparados, el dopado con el *MAb* BFNP-21 fue el menos interesante y aportó muy poca información dada su bajísima actividad desde el primer ensayo cuantificado (4° ciclo de *EFS*). En efecto, su capacidad de retención inicial de *Cb* fue menor que la capacidad final de los *IS* BFNB-67 y BFNB-62 (estos últimos después de 11 o 12 ciclos y más de 30 días en uso). Esto era de esperarse dada la bajísima actividad nativa determinada para el *MAb* BFNP-21 antes de su encapsulamiento. Por otra parte, la actividad del *IS* dopado con este anticuerpo también disminuyó con el uso y el tiempo, en forma relativamente más importante que la de los dos adsorbentes antes mencionados.

La incertidumbre en la determinación de cantidades tan pequeñas de *Cb* (menos de 10 ng) es bastante alta por lo que sólo se presentan a continuación algunos resultados que estimamos razonablemente confiables.

En la *Figura 3.17* se muestran los resultados de retención para dos ensayos consecutivos en los que se cargaron 100 y 150 ng de *Cb* en 25 mL de buffer. Las concentraciones



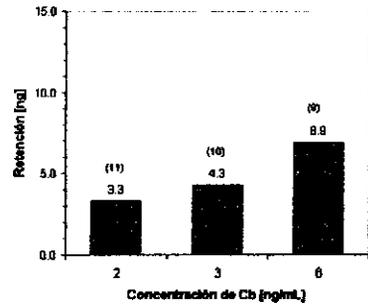
**Figura 3.17** Retención de *Cb* en el *IS* BFNP-21 en función de la concentración a masa cargada variable y volumen constante. Cargas de 100 y 150 ng de *Cb* en 25 mL de buffer a flujos de 0.5 (ciclo #8) y 1 mL  $\text{min}^{-1}$  (ciclo #9).

correspondientes de analito en la solución de carga son, respectivamente, 4 y 6 ng mL<sup>-1</sup>. Se observa que no existe diferencia de retención entre ambos experimentos por lo que ambas concentraciones corresponden a la saturación de los sitios activos disponibles en el anticuerpo encapsulado.

En la *Figura 3.18* se presentan resultados obtenidos al cargar una masa constante de 150 ng en volúmenes variables de solución buffer (25, 50 y 75 mL). Las concentraciones en estos ensayos, consecutivos, son respectivamente 6, 3 y 2 ng mL<sup>-1</sup> de *Cb*. Aparentemente, a medida que aumenta la concentración del analito, aumenta también la retención. Sin embargo, estos resultados deben ser tomados con cierta reserva porque el orden cronológico en que se realizaron los experimentos es justamente inverso al aumento de concentración.

Con las reservas antes mencionadas y conjuntando los resultados de las *Figuras 3.17* y *3.18* se deduce que la saturación del inmuoadsorbente se alcanza para concentraciones de analito en la fase móvil entre 3 y 4 ng mL<sup>-1</sup>. Esto significa que la constante de formación del complejo en el *IS* BFNP-21 es menor que en los otros tres inmuoadsorbentes analizados.

La baja afinidad del *Mab* BFNP-21 por el analito podría estar relacionada con el hapteno utilizado para generar los anticuerpos de origen (poiclonales) en el animal inmunizado. Este hapteno fue diferente al utilizado para generar los anticuerpos de la serie BFNB.



*Figura 3.18* Retención de *Cb* en el *IS* BFNP-21 en función de la concentración a masa cargada constante y volumen variable. Cargas de 150 ng de *Cb* en 25, 50 y 75 mL de buffer a flujo de 1 mL min<sup>-1</sup>.

## Conclusiones

El objetivo general planteado en el subcapítulo 1.5 pudo ser llevado a cabo satisfactoriamente. Se prepararon los cuatro inmunoabsorbentes, BFNB-52, BFNB-67, BFNB-62 y BFNP-21, mediante la técnica de encapsulamiento sol-gel y se evaluó y comparó su comportamiento de retención así como su estabilidad en ciclos de extracción en fase sólida bajo diferentes condiciones. Así también, se alcanzaron los objetivos particulares de forma apropiada:

- Las condiciones cromatográficas de detección y elución se optimizaron de forma que fuera posible determinar el pesticida con una buena resolución tanto en disoluciones de trabajo eluidas en línea a partir de precolumnas, como en disoluciones estándar inyectadas directamente en el cromatógrafo. La fase de elución con mejores resultados fue la fase móvil Isocrática 2 (MeCN-H<sub>2</sub>O 20:80 v/v) y la longitud de onda de detección *UV-VIS* fue 280 nm.
- La incertidumbre presente tanto en el proceso de cuantificación por cromatografía de líquidos como aquella debida al método de preconcentración de muestras acuosas en precolumnas de fase reversa pudo ser evaluada apropiadamente. La incertidumbre total asociada a la determinación cromatográfica fue de  $\pm 1.2 \%$ , para cantidades de carbofurano inyectadas de  $\sim 50$  ng. En lo que respecta a la incertidumbre asociada al método, ésta correspondió a  $\pm 27.2 \%$ , para concentraciones de analito de  $0.12-1 \text{ ng mL}^{-1}$  en las disoluciones analizadas.
- Pudo determinarse la actividad nativa para cada uno de los cuatro anticuerpos monoclonales. También logró evaluarse la pérdida de actividad en los inmunoabsorbentes debida al proceso de encapsulamiento.
- Se encapsularon los cuatro anticuerpos monoclonales de acuerdo con protocolos establecidos previamente para anticuerpos policlonales. La significativa pérdida de actividad observada indicó que estos protocolos deben ser modificados y optimizados para el encapsulamiento de biomoléculas muy delicadas, como resultaron ser los *MAbs* estudiados.
- Se optimizó el proceso de inmuoextracción. Pudo establecerse la composición y el volumen necesario de la disolución de lavado posterior a la carga para reducir al máximo la retención no específica; las condiciones apropiadas de lavado fueron con 4 mL de MeOH-PBS (0.02 M, pH 7) 4:96 (v/v). Además, se pudo establecer la composición de una fase de elución adecuada, de forma que no se observaran pérdidas abruptas en la capacidad de retención de los inmunoabsorbentes en función del uso. Ésta consistió de 25 mL de MeOH-H<sub>3</sub>Cit (0.01 M, pH 2) 10:90 (v/v).
- Se estudió el efecto del tiempo y el número de veces de uso sobre la capacidad de retención de los cuatro inmunoabsorbentes preparados. De ellos, aquel que mostró una mayor constancia en cuanto a capacidad de retención fue el preparado con el anticuerpo BFNB-67.

- También se evaluó el efecto causado sobre la capacidad de retención de cada inmunoadsorbente por parte de la velocidad de flujo en la etapa de carga, así como también, el efecto de la masa de pesticida y del volumen de disolución de carga.
- De acuerdo con el análisis de resultados efectuado se concluyó que, bajo las condiciones experimentales utilizadas en este estudio, la masa de analito cargado a volumen de carga constante, o el volumen de disolución percolado a masa constante, tienen efecto sobre la concentración del pesticida en disolución y es este último parámetro el que realmente incide sobre la retención.
- En ningún caso se observó un efecto significativo de la velocidad de flujo durante la carga sobre la retención del analito, en el intervalo de 0.5-4 mL min<sup>-1</sup>. Sin embargo, no es posible concluir sobre la cinética de formación del complejo antígeno-anticuerpo porque las condiciones empleadas en todos los ensayos correspondieron a un estado de equilibrio.
- A partir de los resultados incluidos en las secciones 3.4.4 a 3.4.7 puede concluirse que el complejo antígeno-anticuerpo más estable lo forma el inmunoadsorbente BFNB-67 y el menos estable el BFNB-21. Sin embargo, debido a que el inmunoadsorbente BFNB-52 fue tratado con un eluyente mucho más agresivo, no fue posible establecer conclusiones definitivas sobre la estabilidad del complejo respecto a los demás inmunoadsorbentes.

En resumen, se puede establecer que el anticuerpo que presentó mejores características para ser utilizado en la preparación de inmunoadsorbentes sol-gel para carbofurano fue el *MAb* BFNB-67.

---

## Referencias bibliográficas

---

- 1 Stevenson, D. Immuno-affinity solid-phase extraction. Review. *J. Chromatogr. B* 2000, 745, 39-48.
- 2 Velásquez-Ramírez, G.; IMSS, Comunicación privada, 2003.
- 3 Zelada-Rauda, G.; Obra Kolping S.C., Comunicación privada, 2004.
- 4 Vázquez-Lira, J.C.; Camacho-Frias, E.; Peña-Álvarez, A.; Vera-Ávila, L.E. Preparation and characterization of a sol-gel immunosorbent doped with 2,4-D antibodies. *Chem. Mater.* 2003, 15, 154-161.
- 5 Hartley, D.; Kidd, H. *The Agrochemicals Handbook*. RSC, Londres, 1986.
- 6 Lewis, R. *Life*. Wm. C. Brown Publishers, E.U.A., 1992.
- 7 Abad, A.; Moreno, M.; Montoya, A. Development of monoclonal antibody-based immunoassays to the *N*-methylcarbamate pesticide carbofuran. *J. Agric. Food Chem.* 1999, 47, 2475-2485.
- 8 McGarvey, B.D. High-performance liquid chromatographic methods for the determination of *N*-methylcarbamate pesticides in water, soil, plants and air. Review. *J. Chromatogr.* 1993, 642, 89-105.
- 9 Rangel-Ordóñez, L. Tesis de Maestría. *Estudio de un inmunoabsorbente específico para herbicidas fenilureicos y su evaluación como técnica alternativa de extracción en fase sólida*. Facultad de Química, UNAM, 2002.
- 10 Metcalf, R.L.; Fukuto, T.R.; Collins, C.; Borck, K.; El-Aziz, S.A.; Muñoz, R.; Cassil, C.C. Metabolism of 2,2-dimethyl-2,3-dihydrobenzofuranyl-7-*N*-methylcarbamate (furalan) in plants, insects and mammals. *J. Agric. Food Chem.* 1968, 16, 300-311.
- 11 Cook, R.F.; Stanovick, R.P.; Cassil, C.C. Determination of carbofuran and its carbamate metabolite residues in corn using a nitrogen-specific gas chromatographic detector. *J. Agric. Food Chem.* 1969, 17, 277-282.
- 12 Richardson, M.L.; Gangolli, S. *The Dictionary of Substances and their Effects. Volume 2*. RSC, Inglaterra, 1993.
- 13 Department of Chemistry at The University of Akron. *The Chemical Database*. <http://ull.chemistry.uakron.edu/erd/chemicals/7/6252.html>
- 14 Lehninger, A. *Bioquímica*. Ediciones Omega S.A., España, 1994.
- 15 Laguna, J.; Piña, E. *Bioquímica*. Ed. La Prensa Médica Mexicana, México, 1986.
- 16 Norma Oficial Mexicana. NOM-Y-301-1998.
- 17 Yang, S.S.; Goldsmith, A.I.; Smetena, I. Recent advances in the residue analysis of *N*-methylcarbamate pesticides. *J. Chromatogr. A* 1996, 754, 3-16.
- 18 Liška, I.; Slobodník, J. Comparison of gas and liquid chromatography for analysing polar pesticides in water samples. Review. *J. Chromatogr. A* 1996, 733, 235-258.

- 19 Martin-Esteban, A.; Fernández, P.; Cámara, C. Immunosorbents: a new tool for pesticide sample handling in environmental analysis. *Fresenius J. Anal. Chem.* 1997, 357, 927-933.
- 20 Rule, G.S.; Mordehal, A.V.; Henion, J. Determination of carbofuran by on-line immunoaffinity chromatography with coupled-column liquid chromatography/mass spectrometry. *Anal. Chem.* 1994, 66, 230-235.
- 21 Moreno, M.; Abad, A.; Pelegrí, R.; Martínez, M.; Sáez, A.; Gamón, M.; Montoya, A. Validation of a monoclonal enzyme immunoassay for the determination of carbofuran in fruits and vegetables. *J. Agric. Food Chem.* 2001, 49, 1713-1719.
- 22 Hennion, M.-C.; Coquart, V. Comparison of reversed-phase extraction sorbents for the on-line trace enrichment of polar organic compounds in environmental aqueous samples. *J. Chromatogr.* 1993, 642, 211-224.
- 23 Minaard, W.A.; Slobodník, J.; Vrleus, J.J.; Hupe, K.-P.; Brinkman, U.A.Th. Rapid liquid chromatographic screening of organic micropollutants in aqueous samples using a single short column for trace enrichment and separation. *J. Chromatogr. A* 1995, 696, 333-340.
- 24 Vera-Ávila, L.E.; Gallegos-Pérez, J.L.; Camacho-Frías, E. Frontal analysis of aqueous phenol solutions in amberlite XAD-4 columns. Implications on the operation and design of solid phase extraction systems. *Talanta* 1999, 50, 509-526.
- 25 Werhoven-Goewle, C.E.; Brinkman, U.A.; Frei, R.W. Trace enrichment of polar compounds on chemically bonded and carbonaceous sorbents and applications to chlorophenols. *Anal. Chem.* 1981, 52, 2072-2080.
- 26 Porath, J.; Axén, R.; Ernback, S. Chemical coupling of proteins to agarose. *Nature* 1967, 215, 1491-1492.
- 27 Porath, J. molecular sieving and adsorption. *Nature* 1968, 218, 834-838.
- 28 Vera-Ávila, L.E.; Rangel-Ordóñez, L.; Covarrubias-Herrera, R. Evaluation and characterization of a comercial immunosorbent cartridge for the solid-phase extraction of phenylureas from aqueous matrices. *J. Chromatogr. Sci.* 2003, 41, 480-488.
- 29 Cichna, M.; Knopp, D.; Niessner, R. Immunoaffinity chromatography of polycyclic aromatic hydrocarbons in columns prepared by the sol-gel method. *Anal. Chim. Acta* 1997, 339, 241-250.
- 30 Komiyama, M.; Takeuchi, T.; Mukawa, T.; Asanuma, H. *Molecular imprinting. From fundamentals to applications.* Wiley-VCH, Alemania, 2003.
- 31 Kriz, D.; Ramström, O.; Mosbach, K. Molecular imprinting. New possibilities for sensor technology. *Anal. Chem.* 1997, 69, 345A-349A.
- 32 Muldoon, M.T.; Stanker, L.H. Molecularly imprinted solid phase extraction of atrazine from beef liver extracts. *Anal. Chem.* 1997, 69, 803-808.

- 33 Delaunay, N.; Pichon, V.; Hennion, M.-C. Immunoaffinity solid-phase extraction for the trace-analysis of low-molecular-mass analytes in complex sample matrices. Review. *J. Chromatogr. B* **2000**, *745*, 15-37.
- 34 Pichon, V.; Chen, L.; Hennion, M.-C.; Daniel, R.; Martel, A.; Le Goffic, F.; Abian, J.; Barceló, D. Preparation and evaluation of immunosorbents for selective trace enrichment of phenylurea and triazine herbicides in environmental waters. *Anal. Chem.* **1995**, *67*, 2451-2460.
- 35 Clarke, W.; Beckwith, J.; Jackson, A.; Reynolds, B.; Karle, M.; Hage, D. Antibody immobilization to high-performance liquid chromatography supports. Characterization of maximum loading capacity for intact immunoglobulin G and Fab fragments. *J. Chromatogr. A* **2000**, *888*, 13-22.
- 36 Houben, A.; Meulenberg, E.; Stoks, P. Immunoaffinity extraction of pesticides from surface water. *Anal. Chim. Acta* **1999**, *74*, 69-74.
- 37 Gill, I.; Ballesteros, A. Bioencapsulation within synthetic polymers (part 1): sol-gel encapsulated biologicals. *Trends Biotechnol.* **2000**, *18*, 282-296.
- 38 El-Essi, F.A.; Zuhri, A.Z.A.; Al-Khalil, S.I.; Abdel-Latif, M.S. Spectrophotometric determination of enzymatically generated hydrogen peroxide using sol-gel immobilized horseradish peroxidase. *Talanta*, **1997**, *44*, 2051-2058.
- 39 Morales-Zamudio, E. Tesis de Maestría. *Preparación de sensores químicos y bioquímicos por la técnica sol-gel*. Facultad de Química, UNAM, 2003.
- 40 Brinker, C. J.; Scherer, G. W. *Sol-Gel Science: The physics of Sol-Gel processing*. Academic Press, Nueva York, 1990.
- 41 Maron, S.; Prutton, C. *Fundamentos de fisicoquímica*. Editorial Limusa Wiley, S.A., México, 1968.
- 42 Pulido-Tofiño, P.; Barrero-Moreno, J. M.; Pérez-Conde, M. C. Sol-gel glass doped with isoproturon antibody as selective support for the development of a flow-through fluoroimmunosensor. *Anal. Chim. Acta* **2001**, *429*, 337-345.
- 43 Wang, R.; Narang, U.; Prasad, P.N.; Bright, F. V. Affinity of antiluorescein antibodies encapsulated within a transparent sol-gel glass. *Anal. Chem.* **1993**, *65*, 2671-2675.
- 44 Bronshtein, A.; Aharonson, N.; Avnir, D.; Turmiansky, A.; Altstein, M. Sol-gel matrixes doped with atrazine antibodies: atrazine binding properties. *Chem Mater.* **1997**, *9*, 2632-2639.
- 45 Jin, W.; Brennan, J.D. Properties and applications of proteins encapsulated within sol-gel derived materials. Review. *Anal. Chim. Acta* **2002**, *461*, 1-36.
- 46 Vázquez-Lira, J.C. Tesis de Doctorado. *Desarrollo, evaluación y caracterización de inmunoabsorbentes para la extracción en fase sólida de pesticidas a partir de muestras acuosas y su determinación por cromatografía de líquidos*. Facultad de Química, UNAM, 2003.
- 47 Stryer, L. *Bioquímica*. Editorial Reverté S.A., España, 1990.
- 48 Miller, J.; Miller, J. *Estadística y Quimiometría para Química Analítica*. Prentice Hall, España, 2002.

## Anexo

## A. Listado de ecuaciones estadísticas

A.1	$\bar{x} = \frac{\sum_{i=1}^n x_i}{n}$	$\bar{x}$	Media aritmética muestral de los valores $x_i$
		$x_i$	Cada uno de los valores muestrales
		$n$	Número de muestras
A.2	$S = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n-1}}$	$S$	Desviación estándar de los valores $x_i$
A.3	$S^2 = \frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n-1}$	$S^2$	Varianza
A.4	$CV = \frac{100S}{\bar{x}}$	CV	Coefficiente de variación o desviación estándar relativa
A.5	$IC = \pm \frac{t_{\alpha/2, v}}{\sqrt{n}} S$	IC	Intervalo de confianza
		$t_{\alpha/2, v}$	Valor t para una incertidumbre de $100\alpha\%$ y $v$ grados de libertad
A.6	$t_c = \frac{(\bar{x}_1 - \bar{x}_2)}{s_c \sqrt{\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2}}}$	$t_c$	Valor de t calculado (el valor de $v$ se calcula con la ecuación A.7)
		$\bar{x}_{1,2}$	Medias muestrales para 1 ó 2
		$s_c$	Desviación estándar combinada (ver A.21)
		$n_{1,2}$	Número de muestras en 1 ó 2
A.7	$v = n_1 + n_2 - 2$		

A.6 y A.7 son ecuaciones válidas para cuando las poblaciones poseen desviaciones estándar comparables

A.8	$t_c = \frac{(\bar{x}_1 - \bar{x}_2)}{\sqrt{\frac{S_1^2}{n_1} + \frac{S_2^2}{n_2}}}$	$t_c$	Valor de t calculado (el valor de $v$ se calcula con la ecuación A.9)
		$S_{1,2}$	Desviación estándar para 1 ó 2
A.9	$v = \frac{\left( \frac{S_1^2}{n_1} + \frac{S_2^2}{n_2} \right)^2}{\left( \frac{S_1^4}{n_1^2(n_1-1)} + \frac{S_2^4}{n_2^2(n_2-1)} \right)}$		

A.8 y A.9 son ecuaciones válidas para cuando las poblaciones poseen desviaciones estándar diferentes



A.10	$F_c = \frac{S_1^2}{S_2^2}$	F <sub>c</sub>	Valor de F calculado para 1 y 2, donde 1 y 2 se disponen de tal manera que $F_c \geq 1$ y en donde $v_1 = n_1 - 1$ y $v_2 = n_2 - 1$
A.11	$G_c = \frac{ x_s - \bar{x} }{S}$	G <sub>c</sub>	Valor de G de Grubbs calculado
A.12	$y = mx + b$	x <sub>s</sub>	Valor muestral anómalo
		y	Variable dependiente
		m	Pendiente de la recta de mínimos cuadrados
		x	Variable independiente
		b	Ordenada al origen de la recta de mínimos cuadrados
A.13	$m = \frac{\sum_i [(x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})]}{\sum_i [(x_i - \bar{x})^2]}$	x <sub>i</sub>	Valores i en la variable independiente
		y <sub>i</sub>	Valores i en la variable dependiente
		$\bar{x}$	Valor medio de la variable independiente
		$\bar{y}$	Valor medio de la variable dependiente
A.14	$b = y - mx$		
A.15	$S_{ey} = \sqrt{\frac{\sum_i (y_i - \hat{y}_i)^2}{n - 2}}$	S <sub>ey</sub>	Desviación estándar en la dirección y
		$\hat{y}_i$	Valor de y calculada para cada valor de x <sub>i</sub>
		n	Número de pares de valores x <sub>i</sub> , y <sub>i</sub>
A.16	$S_{em} = \frac{S_{ey}}{\sqrt{\sum_i (x_i - \bar{x})^2}}$	S <sub>em</sub>	Desviación estándar en la pendiente de la recta de mínimos cuadrados
A.17	$S_{cb} = S_{ey} \sqrt{\frac{\sum_i x_i^2}{n \sum_i (x_i - \bar{x})^2}}$	S <sub>cb</sub>	Desviación estándar en la ordenada al origen de la recta de mínimos cuadrados
A.18	$S_{ex} = \frac{S_{ey}}{m} \sqrt{\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n} + \frac{(y_0 - \bar{y})^2}{m^2 \sum_i (x_i - \bar{x})^2}}$	S <sub>ex</sub>	Desviación estándar asociada al valor calculado de x a partir de la recta de mínimos cuadrados y el valor medido y <sub>0</sub> .
		n <sub>1</sub>	Número de lecturas de y <sub>0</sub>
		y <sub>0</sub>	Valor medido del término dependiente
A.19	$r = \frac{\sum_i [(x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})]}{\sqrt{\left[ \sum_i (x_i - \bar{x})^2 \right] \left[ \sum_i (y_i - \bar{y})^2 \right]}}$	r	Coeficiente de correlación momento-producto

A.20  $IC [m,b] = \pm tS_{c,m,b}$

IC[m,b] Intervalo de confianza para la pendiente o la ordenada al origen

$S_{c,m,b}$  Desviación estándar sobre la pendiente o la ordenada al origen

A.21

$$S_{c(n)} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n S_i^2 (n_i - 1)}{\left(\sum_{i=1}^n v_i\right)}}$$

$S_{c(n)}$  Desviación estándar combinada para n desviaciones estándar individuales

$v_i$  Número de grados de libertad para cada desviación estándar individual

A.22

$$I_T [\%] = \frac{IC[y]_{total}}{\bar{y}_g} 100$$

$I_T, [\%]$  Incertidumbre total porcentual

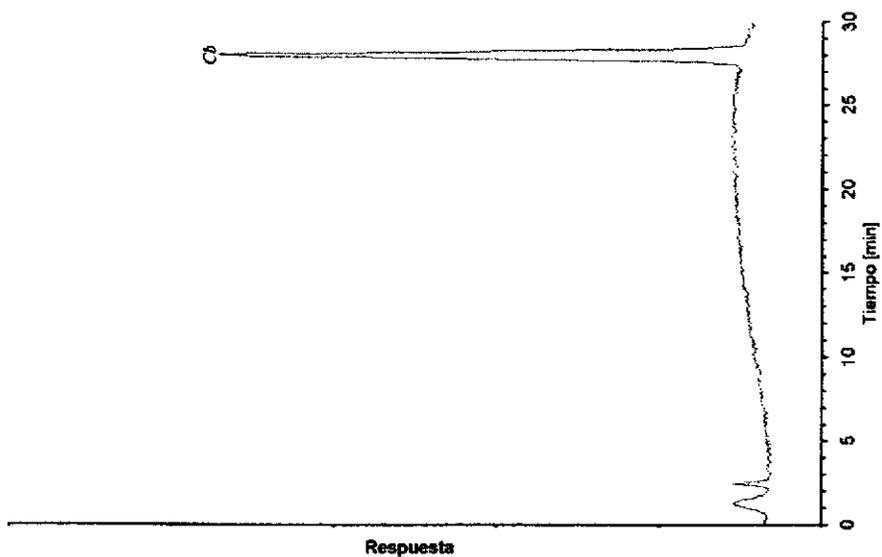
IC[y]total Incertidumbre total en y

$\bar{y}_g$  Centroide promedio en y para el conjunto de valores incluidos en las rectas de regresión

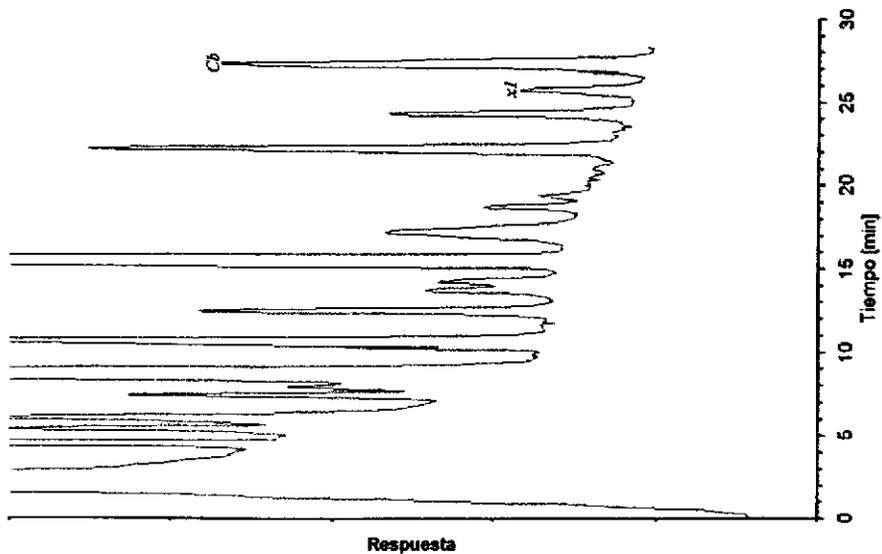
## B. Listado de ecuaciones cromatográficas

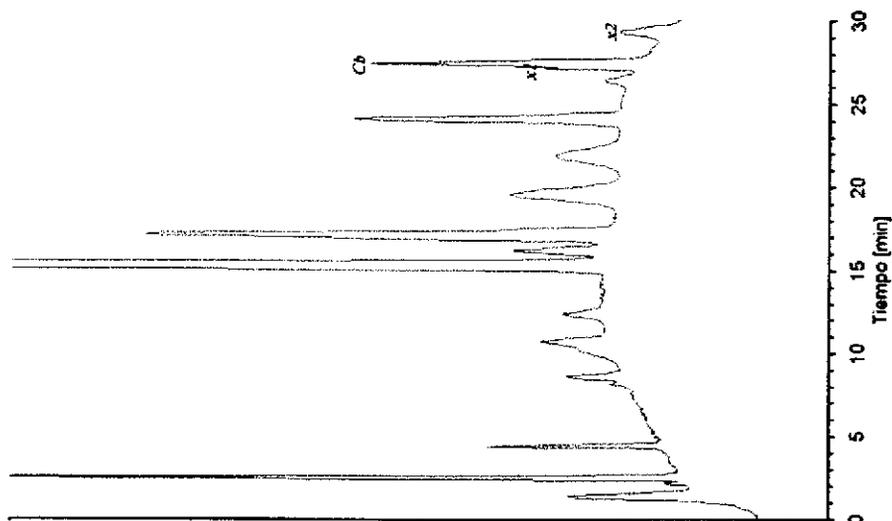
B.1	$\phi = \frac{C}{C_0}$	$\Phi$	Concentración relativa del analito en el efluente
		C	Concentración del analito en el efluente a un volumen $V_i$
		$C_0$	Concentración del analito en la muestra percolada
B.2	$V_b = V_s - 2\sigma_v$	$V_b$	Volumen de fuga
		$V_s$	Volumen estequiométrico
		$\sigma_v$	Ensanchamiento de la banda
B.3	$q_i = \frac{C_0 A'_{(i)} (V_i - V_0)}{A_{r(i)}}$	$q_i$	Cantidad de analito dentro de la columna
		$A_{r(i)}$	Área total del rectángulo definido por la línea vertical trazada en $i$
		$A'_{(i)}$	Área sobre la curva dentro del rectángulo $i$
		$V_i$	Volumen de disolución percolada por la columna en el punto $i$
		$V_0$	Volumen muerto dentro de la columna
B.4	$q_b = C_0 (V_b - V_0)$	$q_b$	Cantidad de soluto presente en el adsorbente en el punto de fuga
B.5	$q_e = C_0 (V_s - V_0)$	$q_e$	Cantidad de soluto presente en el adsorbente en el punto de saturación o equilibrio
B.6	$t_r' = t_r - t_m$	$t_r'$	Tiempo de retención ajustado
		$t_r$	Tiempo de retención del analito
		$t_m$	Tiempo muerto
B.7	$k' = \frac{t_r'}{t_m}$	$k'$	Factor de capacidad
B.8	$R_{i/j} = \frac{t_{rj} - t_{ri}}{w} = \frac{t_{rj} - t_{ri}}{1.70w_{1/2}}$	$R_{i/j}$	Resolución entre los picos $j$ e $i$
		$t_{rj}$	Tiempo de retención del pico $j$ ó $i$
		$w$	Ancho medio de las bases de los picos $j$ e $i$
		$w_{1/2}$	Ancho medio a la mitad de la altura de los picos $j$ e $i$
B.9	$N = \frac{16t_r^2}{w^2} = \frac{5.55t_r^2}{w_{1/2}^2}$	N	Número de platos teóricos
		$w$	Ancho de la base del pico
		$w_{1/2}$	Ancho a la mitad de la altura
B.10	$H = \frac{L}{N}$	H	Altura de plato teórico
		L	Longitud de columna

## C. Cromatogramas



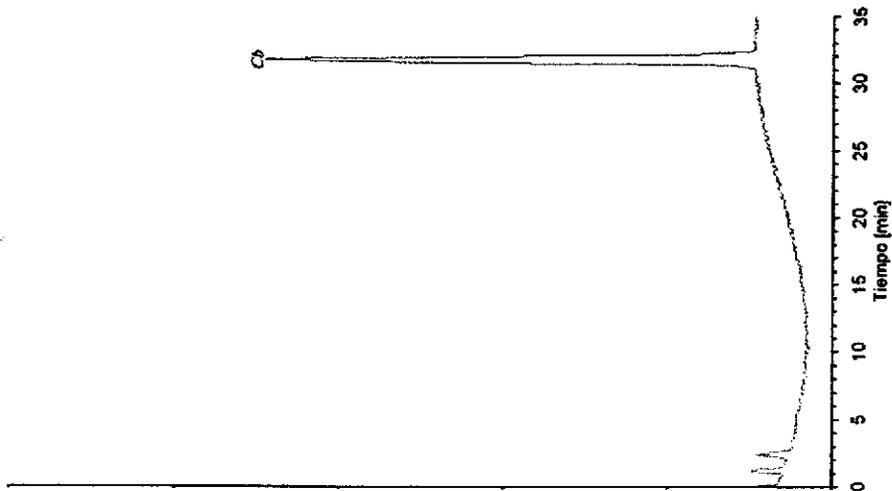
C.1 Elución Gradiente 1. Estándar de carbofurano. Inyección de 49.6 ng Cb.

C.2 Elución Gradiente 1. Efluentes. IS BFNB-52. Carga de 80 ng Cb en 25 mL a 0.5 mLmin<sup>-1</sup>. Elución con MeCN-H<sub>2</sub>O, 65:35 v/v.



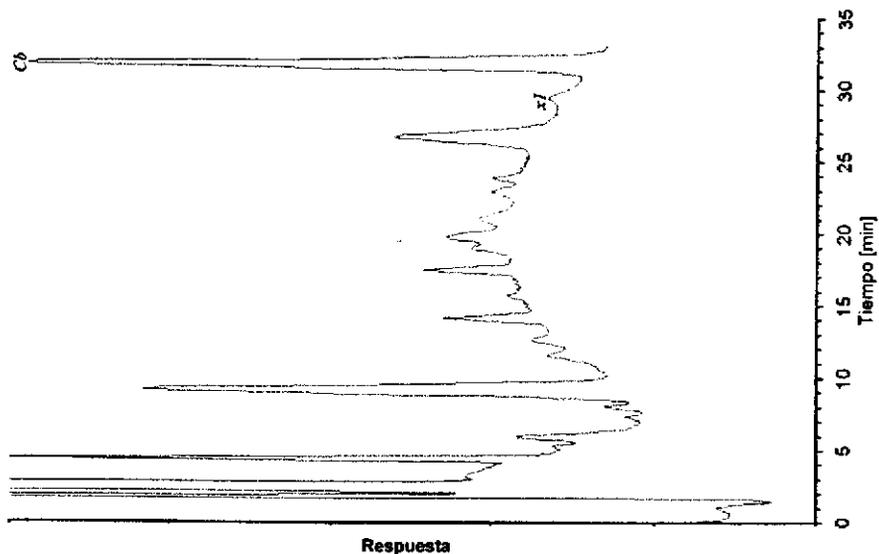
Respuesta

C.3 Elución Gradiente 1. Eluatos. *IS* BFNB-52. Carga de 80 ng *Cb* en 25 mL a 0.5 mL/min<sup>1</sup>. Elución con MeCN-H<sub>2</sub>O, 65:35 v/v.

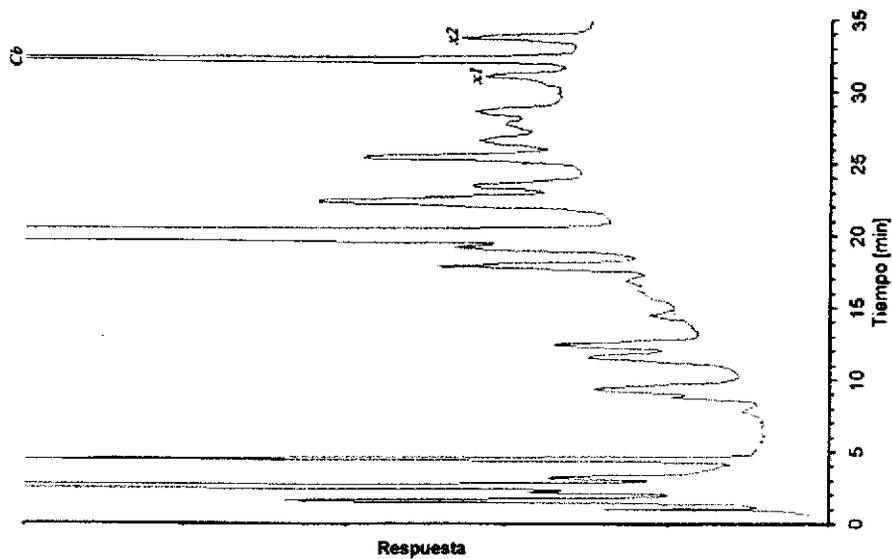


Respuesta

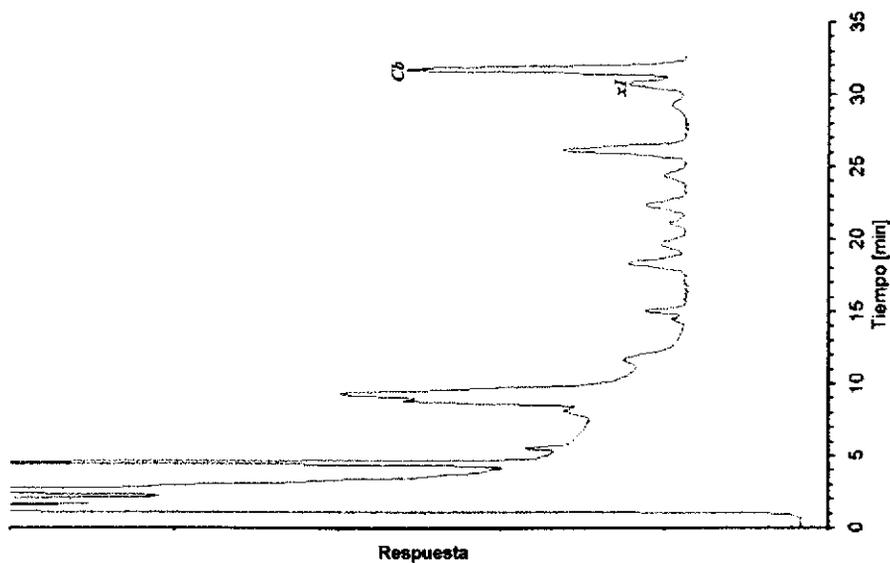
C.4 Elución Gradiente 2. Estándar de carbofurano. Inyección de 49.6 ng *Cb*.



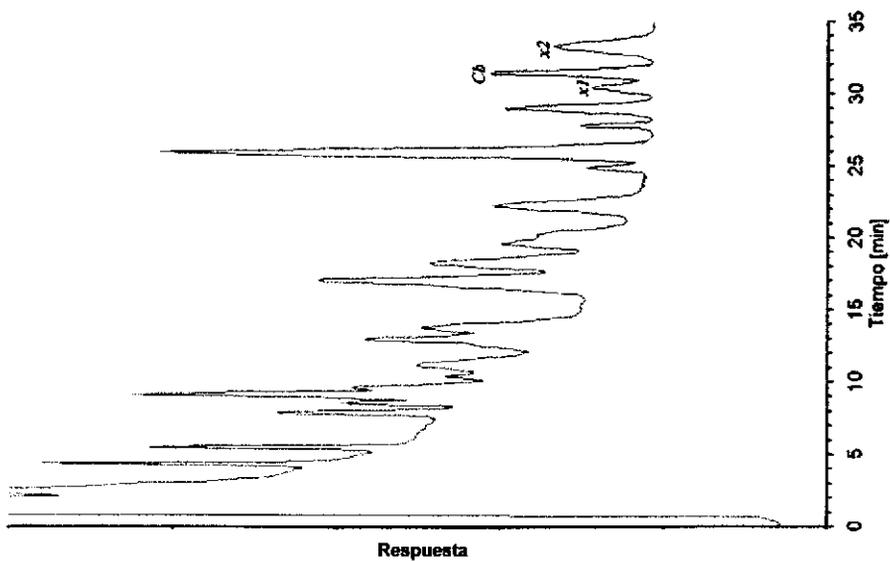
C.5 Elución Gradiente 2. Effluentes. *IS* BFNB-52. Carga de 80 ng Cb en 25 mL a 4 mLmin<sup>-1</sup>. Elución con MeCN-H<sub>2</sub>O, 65:35 v/v.



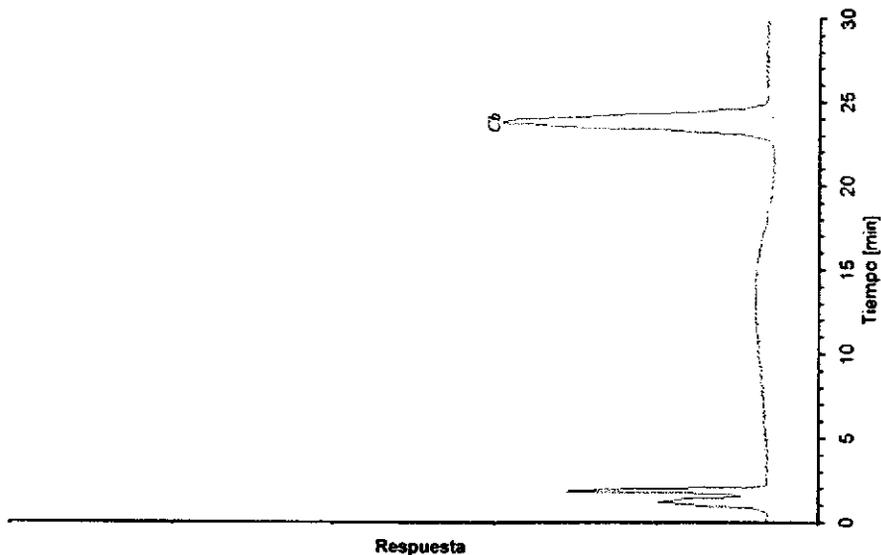
C.6 Elución Gradiente 2. Eluatos. *IS* BFNB-52. Carga de 80 ng Cb en 25 mL a 0.5 mLmin<sup>-1</sup>. Elución con MeCN-H<sub>2</sub>O, 65:35 v/v.



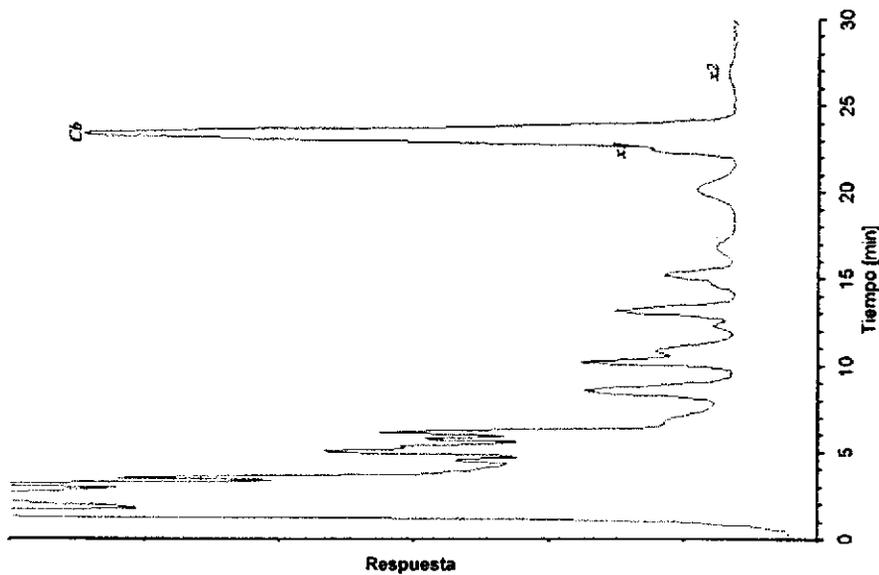
C.7 Elución Gradiente 2. Eluatos. *JS* BFNB-67. Carga de 100 ng *Cb* en 25 mL a 1 mLmin<sup>-1</sup>. Elución con H<sub>3</sub>Cit 0.01 M pH 2.



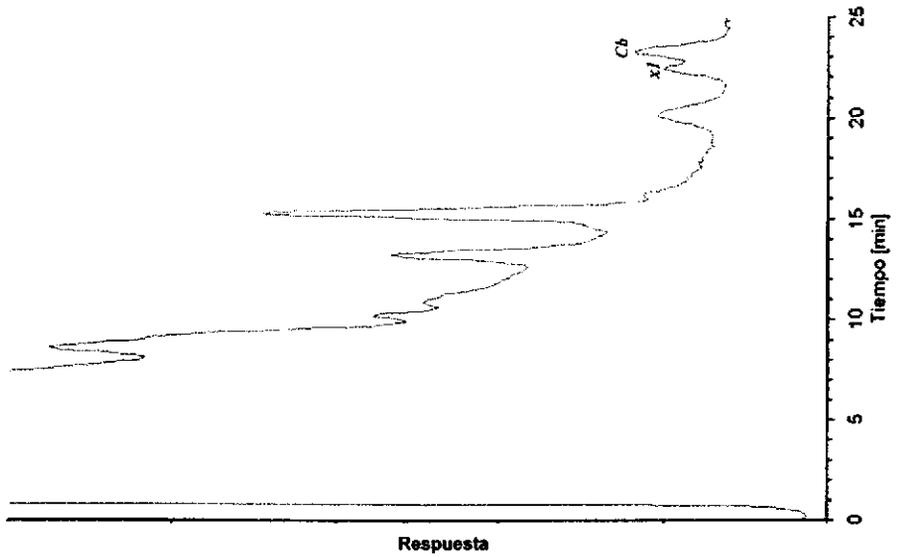
C.8 Elución Gradiente 2. Eluatos. *JS* BFNB-62. Carga de 150 ng *Cb* en 25 mL a 2 mLmin<sup>-1</sup>. Elución con H<sub>3</sub>Cit 0.01 M pH 2 - MeOH, 90:10 v/v.



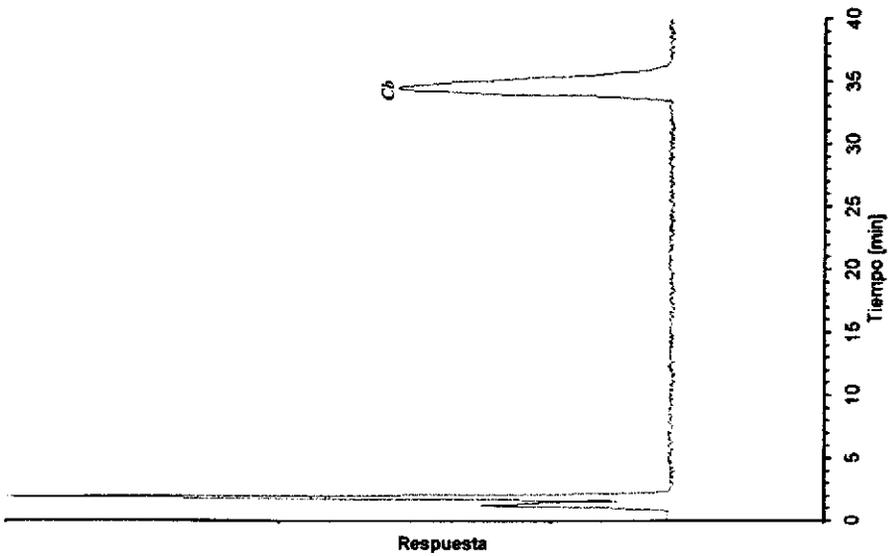
C.9 Elución Isocrática 1. Estándar de carbofurano. Inyección de 49.6 ng Cb.



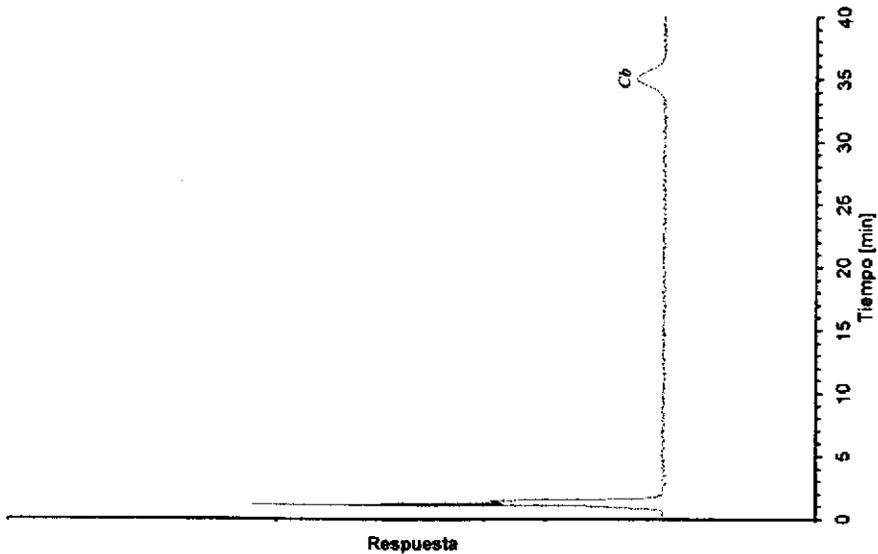
C.10 Elución Isocrática 1. Efluentes. /S BFNB-62. Carga de 150 ng Cb en 25 mL a 4 mLmin<sup>-1</sup>. Elución con H<sub>2</sub>Cit 0.01 M pH 2 - MeOH, 90:10 v/v



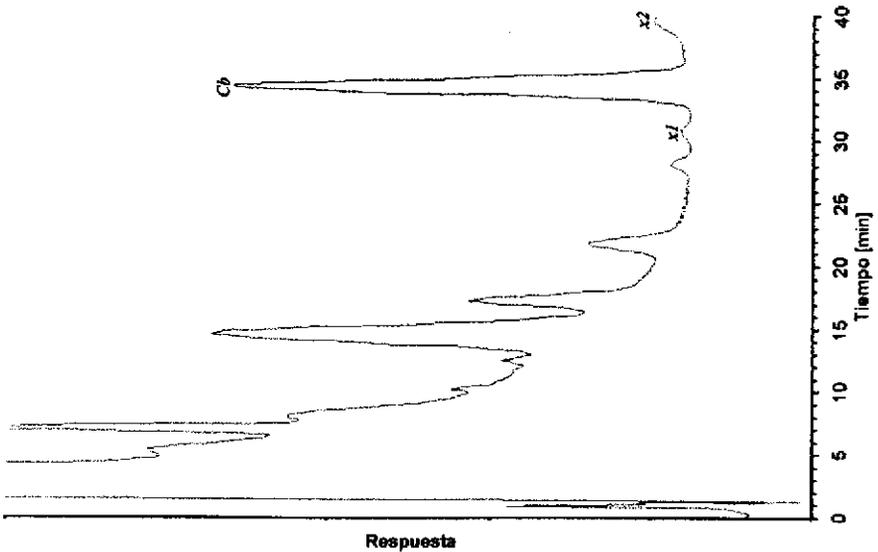
- C.11 Elución Isocrática 1. Eluatos. *IS* BFNB-62. Carga de 150 ng *Cb* en 25 mL a 4 mL $\cdot$ min $^{-1}$ . Elución con H $_2$ Cit 0.01 M pH 2 - MeOH, 90:10 v/v.



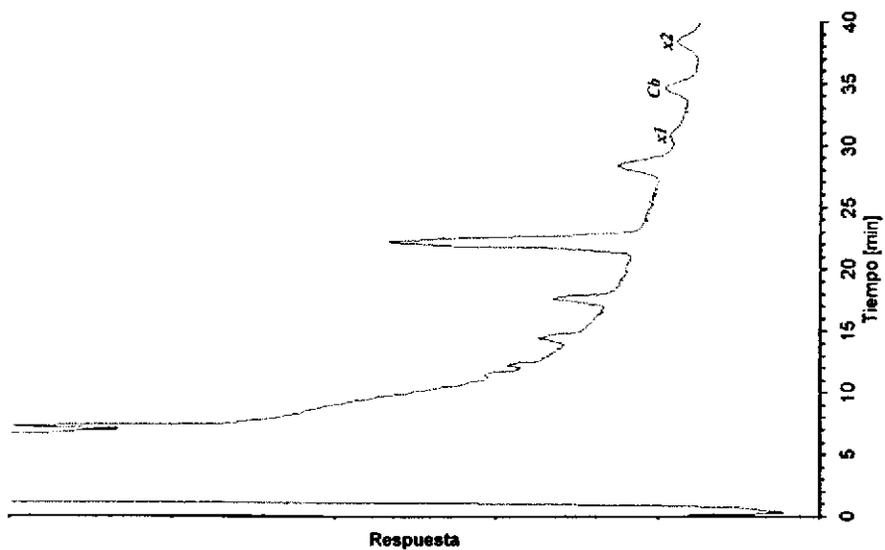
- C.12 Elución Isocrática 2. Estándar de carbofurano. Inyección de 49.6 ng *Cb*.



C.13 Elución Isocrática 2. Estándar de carbofurano. Inyección de 4.96 ng Cb.



C.14 Elución Isocrática 2. Efluentes. IS BFNB-62. Carga de 150 ng Cb en 75 mL a 2 mL $\cdot$ min $^{-1}$ . Elución con H<sub>2</sub>Cit 0.01 M pH 2 - MeOH, 90:10 v/v.



- C.15 Elución Isocrática 2. Elutos. *IS* BFNB-62. Carga de 150 ng *Cb* en 75 mL a 2 mLmin<sup>-1</sup>. Elución con H<sub>3</sub>Cit 0.01 M pH 2 - MeOH, 90:10 v/v.