



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

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

**“INMUNOEXTRACCIÓN Y EFS-CLAR EN LÍNEA PARA LA
DETERMINACIÓN SENSIBLE Y SELECTIVA DE CARBOFURANO EN
EXTRACTOS DE TEJIDO BIOLÓGICO”**

TESIS
PARA OPTAR EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA

I.Q. BANI PALOMA MÁRQUEZ LIRA



TUTOR: DRA. LUZ ELENA VERA VERA ÁVILA
2007



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Jurado asignado

Presidente	<i>Dr. Rafael Villalobos Pietrini</i>
Vocal	<i>Dra. Evangelina Camacho Frías</i>
Secretario	<i>Dr. José de Jesús García Valdés</i>
Primer Suplente	<i>Dr. Abel Moreno Cárcamo</i>
Segundo Suplente	<i>Dr. Julio César Aguilar Cordero</i>

La presente tesis se desarrolló en el Laboratorio de Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución de la Facultad de Química de la UNAM, bajo la asesoría de la Dra. Luz Elena Vera Avila.

Los resultados de este trabajo se presentaron en el XX Congreso de Química Analítica y en el Congreso Latinoamericano de Cromatografía.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada durante los estudios de Maestría.

A la DGEP por el complemento de beca otorgado

Al CONACyT por el apoyo financiero otorgado para la realización de este trabajo mediante el proyecto 46558

A la Dra. Luz Elena Vera Ávila

Por la guía y conocimientos brindados a través de todo el proyecto, tanto en el aspecto académico como profesional.

A la M. en C. Rosario Covarrubias Herrera

Por tu apoyo y ayuda incondicionales, pero sobre todo por tu amistad sincera.

NOTACIONES EMPLEADAS

Ac	Anticuerpo
Ag	Antígeno
ACN	Acetonitrilo
APCI	Interfase de ionización a presión atmosférica
ASB	Albúmina de suero bovino
C-18	Columna de fase enlazada octadecilsilano
CG	Cromatografía de gases
CL	Cromatografía de líquidos
CLAR	Cromatografía de líquidos de alta resolución
EFS	Extracción en fase sólida
IA	Inmunoadsorbente
IE	Inmunoextracción
LDM	Límite de detección del método
MAB	Anticuerpo monoclonal
MeOH	Metanol
MS	Espectrometría de masas
PBS	Solución salina amortiguadora de fosfatos
TEOS	Tetraetoxisilano
TMOS	Tetrametoxisilano

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN	1
I. ABSTRACT	3
II. INTRODUCCIÓN	5
III. ANTECEDENTES	7
3.1 EXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA	7
3.2 CROMATOGRAFÍA DE AFINIDAD (CA)	8
3.3 INMUNOADSORBENTES	9
3.3.1 Anticuerpos	10
3.3.2 Soporte	12
3.3.3 Métodos de inmovilización	14
3.3.4 Condiciones de elución	16
3.3.5 Regeneración y almacenamiento	17
3.3.6 Propiedades de los inmunoadsorbentes	18
3.4 TÉCNICA SOL-GEL	18
3.5 PLAGUICIDAS	23
3.5.1 Carbamatos	24
3.5.2 Carbofurano	24
IV. OBJETIVOS	31
4.1 OBJETIVO GENERAL	31
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	31
V. PARTE EXPERIMENTAL	32
5.1 EQUIPO Y MATERIAL	32
5.2 REACTIVOS Y DISOLVENTES	33
5.3 PREPARACIÓN DE MUESTRAS	33
5.4 PREPARACIÓN DEL INMUNOADSORBENTE POR EL MÉTODO SOL-GEL	34
5.4.1 Optimización del lavado en el proceso de inmovilización	35
5.6 ESTUDIO DE LA INMUNOEXTRACCIÓN DE CARBOFURANO EN LOS CARTUCHOS CON INMUNOADSORBENTE (IA)	36
5.6.1 Optimización de la elución	38
5.6.2 Condiciones finales	38
5.7 CONCENTRACIÓN, LIMPIEZA Y ANÁLISIS EN LÍNEA	39
5.7.1 Comprobación de la ausencia de fuga en la precolumna durante la carga	40
5.7.2 Optimización del paso de limpieza de muestra	40
5.7.3 Condiciones finales para la preconcentración, limpieza de muestra y análisis en línea	41
VI. RESULTADOS	43
6.1 PREPARACIÓN DEL INMUNOADSORBENTE POR EL MÉTODO SOL-GEL	43
6.2 DETERMINACIÓN DE ACTIVIDAD DEL ANTICUERPO MONOCLONAL (MAB) LIB-BFNB-67	46
6.3 ESTUDIO DE LA INMUNOEXTRACCIÓN DE CARBOFURANO EN LOS CARTUCHOS CON INMUNOADSORBENTE	51
6.3.1 Optimización de la elución	54
6.4 CONCENTRACIÓN, LIMPIEZA Y ANÁLISIS EN LÍNEA DEL ELUATO OBTENIDO EN LA INMUNOEXTRACCIÓN	54
6.4.1 Comprobación de la ausencia de fuga en la precolumna durante la carga	55
6.4.2 Optimización del paso de limpieza de muestra	56
6.5 EVALUACIÓN ESTADÍSTICA DEL MÉTODO ANALÍTICO DESARROLLADO PARA DETERMINAR CARBOFURANO EN MUESTRAS DE TEJIDO DE EPITELIO CERVICAL	61
6.5.1 Linealidad del método	61
6.5.2 Aplicación del método	65
VII. CONCLUSIONES	71
VIII. BIBLIOGRAFÍA	73

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura III.1 Estructura general de un anticuerpo (Inmunoglobulina G).	10
Figura III.2 Síntesis del hapteno BFNB del carbofurano, donde $n=3$ y $X=CH_2$ ¹⁷	12
Figura III.3 Consecuencias de una inmovilización inadecuada ¹⁴	15
Figura V.1 Proceso de inmovilización por el método sol-gel.....	35
Figura V.2 Etapas de la inmuoextracción.....	37
Figura VI.1. Estabilidad en función del tiempo para el último IA dopado con 500 µg de anti-carbofurano.....	50
Figura VI.2. Estabilidad en función del número de ciclos de IE para el último IA dopado con 500 µg de anti-carbofurano.	50
Figura VI.4. Cromatogramas obtenidos del análisis de los efluentes (a) y el eluato (b) del cartucho de inmuoextracción. Muestra: 1 mL de extracto de tejido epitelial cérvico-uterino. Condiciones de análisis: carga de efluentes, o eluato diluido con agua, en precolumna (20 x 2 mm D.I.) de fase reversa PLRP-S, 5 µm; lavado con 6 mL de agua; elución en línea con la columna (150 x 4.6 mm D.I.) de fase reversa Hypersil ODS, 5 µm, usando la fase móvil ACN-H ₂ O 23:77 (v/v) a flujo de 1 mL/min; detección UV a 280 nm.	57
Figura VI.5. Cromatograma obtenido del análisis del eluato del cartucho de inmuoextracción en una escala expandida (a) y, como referencia, cromatograma del análisis de un estándar de carbofurano inyectado directamente (104 ng) (b). Otras condiciones como en la Fig. VI.4.	59
Figura VI.6. Cromatograma obtenido del análisis del eluato de un extracto de tejido blanco (a) y de un estándar de carbofurano inyectado (b). Otras condiciones como en la figura VI.4, excepto: muestra 2 mL de extracto y fase móvil ACN-H ₂ O 21:79 (v/v)	60
Figura VI.7 Resultados del análisis de extractos de tejido blanco dopados con diferentes cantidades de carbofurano.	62
Figura VI.8 (a) (b) (c). Cromatogramas obtenidos del análisis de 3 extractos de tejido cérvico-uterino. Las muestras provenían de tres mujeres expuestas al plaguicida en las que se detectaron anomalías por análisis clínicos. Condiciones experimentales como en la Fig. VI.6.....	67

RESUMEN

En este trabajo se desarrolló un método altamente sensible y selectivo para la determinación de carbofurano a niveles de concentración del orden de trazas en extractos de tejido epitelial cérvico-uterino. El punto clave en este método es el uso de un cartucho de inmuoextracción en el paso de preparación de muestra, para aislar y recuperar cuantitativamente al plaguicida a partir de la matriz biológica.

El método propuesto consiste de dos etapas:

- 1) Inmuoextracción
- 2) Reconcentración del eluato, obtenido en el paso anterior, en una precolumna de fase reversa y análisis en línea de esta última por cromatografía de líquidos (CLAR) con detección UV a 280 nm.

La primera etapa proporciona una alta selectividad al método, mientras que la segunda permite alcanzar una gran sensibilidad.

El cartucho de inmuoextracción utilizado en la primera etapa se preparó en el laboratorio. El inmuoadsorbente se sintetizó por encapsulamiento del anticuerpo monoclonal anticarbofurano, LIB-BFNB-67, en los poros de un soporte de sílice mediante la técnica sol-gel. Con el fin de preservar lo más posible la actividad biológica del anticuerpo, se modificaron y optimizaron diversas condiciones experimentales del proceso sol-gel, tales como: tiempo de hidrólisis del precursor, concentración de buffer para neutralizar y desestabilizar el sol, volúmenes y soluciones de lavado del hidrogel, velocidad y tiempo de secado. Esto permitió establecer un método eficaz para la síntesis de un biomaterial con alta capacidad de enlazamiento del carbofurano y características repetibles de lote a lote.

Los resultados obtenidos, al certificar el método con extractos del tejido biológico fortificados con carbofurano, mostraron que éste es lineal en el intervalo de concentraciones de 10-40 ng/mL (cantidad absoluta: 20-80 ng de carbofurano en 2 mL de extracto). La recuperación promedio fue de 101%, con un coeficiente de variación de 8.5%, para niveles de concentración de 20 ng/ml. El límite de detección estimado de acuerdo con los criterios recomendados por la EPA (Agencia de protección ambiental de E.U.) fue de 5.5 ng/mL.

El método se probó aplicándolo en el análisis de 8 diferentes muestras de tejido cérvico-uterino (con alteraciones detectadas por análisis clínicos), las cuales provenían de mujeres expuestas al plaguicida. No se detectó carbofurano en ninguno de los extractos

metanólicos del tejido, aunque es importante aclarar que las muestras habían sido tomadas mucho tiempo antes, por lo que este resultado no excluye la posible penetración del plaguicida en el organismo de estas mujeres. Sin embargo, lo importante, de esta prueba es que permitió confirmar la alta selectividad del método pues en todos los casos se obtuvieron cromatogramas muy limpios.

Los resultados obtenidos en este trabajo destacan las grandes ventajas que aporta la inmunoextracción en la determinación de contaminantes ambientales y, en general, de cualquier compuesto minoritario en una matriz compleja. La fuerte y específica interacción del anticuerpo inmovilizado con el analito-antígeno facilita enormemente el paso de preparación de muestra, permitiendo alcanzar una alta sensibilidad y selectividad en los análisis, sin que se requiera de instrumentación muy especializada y/o costosa.

I. ABSTRACT

A highly sensitive and selective method for the determination of carbofuran at trace concentration levels in cervical-uterine epithelial tissue was developed in this work. The key point in this method is the use of an immunoextraction cartridge during sample preparation, for isolation and quantitative recovery of the pesticide from the biological matrix.

The method consists of two main parts:

- 1) Immunoextraction
- 2) Concentration of the eluate from the previous step in a reversed phase precolumn; which is further on-line analyzed by liquid chromatography with UV detection at 280 nm.

The first one provides a high selectivity to this method while the second gives the possibility to reach a great sensitivity.

The immunoextraction cartridge used during the first part of the procedure was prepared in the laboratory. The immunosorbent was synthesized by encapsulation of the monoclonal anticarbofuran antibody, LIB-BFNF-67, on the pores of a silica support using the sol-gel technique. Some experimental conditions of the encapsulation procedure were modified and optimized to preserve as much as possible the biological activity of the antibody. Therefore, new conditions were established concerning: the hydrolysis time for the precursor, the concentration of buffer to neutralize the sol and promote gelation, the volume and nature of solutions to wash the hydro gel, and the drying velocity and drying time. These changes allowed us to establish an efficient way to synthesize biomaterials with a high binding capacity for carbofuran and repeatable characteristics from batch to batch.

Biological tissue extracts spiked with carbofuran were used to certify the analytical method. Results showed that the method was linear in the concentration range of 10-40 ng/mL (absolute carbofuran amount of 20-80 ng in 2 mL of extract). A mean recovery of 101% with a variation coefficient of 8.5% was obtained in replicate analysis of extracts spiked at 20 ng/mL of carbofuran. A detection limit of 5.5 ng/mL was estimated for this method, according to criteria recommended by EPA.

In order to determine the method reliability, 8 different samples of cervical-uterine epithelial tissue (with alterations detected by clinical analysis) were analyzed. These

samples came from country women that had been severely exposed to the pesticide. Carbofuran was not detected in either of the methanolic extracts from these tissues. However, as the samples were stored for a long time before analysis, the obtained result does not exclude the possibility of carbofuran penetration into the organism of these women. Which is important from this test is that all chromatograms were quite clean, confirming the high selectivity of the method.

The results obtained in this work point out the great advantages provided by immunoextraction for the determination of environmental pollutants, and in general for the determination of any minor compound in a complex matrix. The strong and specific interaction of immobilized antibodies with the analyte-antigen greatly facilitates the sample preparation step and gives the possibility to attain high selectivity and sensitivity in the analysis, without requiring very specialized or costly instrumentation

II. INTRODUCCIÓN

La preparación de muestra es una parte fundamental en cualquier procedimiento analítico, ya que determina en gran medida la sensibilidad y selectividad del análisis y generalmente contribuye con el mayor error en las determinaciones. Desde hace varios años, la extracción en fase sólida (EFS), particularmente en la modalidad de fase reversa, se ha convertido en el método preferido para recuperar, preconcentrar y, hasta cierto punto, purificar los analitos de interés presentes en matrices acuosas previo a su análisis cromatográfico. El acoplamiento en línea de la extracción en fase sólida y la cromatografía de líquidos (EFS-CLAR) ha resultado un medio excelente para alcanzar muy altas sensibilidades y mejorar la precisión y exactitud de los análisis.

No obstante, cuando los analitos son relativamente polares y se encuentran a niveles traza en muestras muy complejas, como lo son las matrices ambientales (aguas superficiales, extractos de tejidos biológicos o suelos, etc.), los adsorbentes de fase reversa usados en la EFS no resultan satisfactorios. En efecto, la coextracción de muchos otros compuestos presentes en la muestra a altas concentraciones, puede dar como resultado una baja retención de los analitos de interés, además de generar cromatogramas con muchas interferencias donde resulta difícil, si no imposible, identificar los picos de los compuestos traza que se pretende determinar.

Por lo anterior, las investigaciones más recientes en este campo se han enfocado hacia el desarrollo de procedimientos de extracción más efectivos y selectivos, basados en el reconocimiento molecular. La inmunoextracción (IE) es una modalidad de la EFS que aprovecha la alta afinidad y especificidad de las interacciones antígeno-anticuerpo para aislar y preconcentrar un compuesto único o una familia de compuestos de estructura muy similar. Los adsorbentes utilizados para la IE están constituidos por un soporte sólido en el cual se encuentran inmovilizados anticuerpos generados contra el compuesto de interés. Estos materiales, llamados inmunoadsorbentes (IA), han demostrado ser una herramienta única en la preparación de muestras complejas.

Hasta ahora, en la gran mayoría de los IA reportados se ha utilizado el anclaje químico para inmovilizar el anticuerpo en un soporte hidrofílico activado (sílica aldehído, agarosa, etc.) por enlace covalente. Sin embargo, esta técnica es muy delicada y minuciosa, y fácilmente da lugar a problemas de desnaturalización del anticuerpo o de mala orientación de las moléculas ligadas. Una vía alternativa, que ha dado buenos resultados para otras biomoléculas sensibles (enzimas, ácidos nucleicos, células vivas), es la inmovilización física por encapsulamiento en los poros del soporte mediante la técnica sol-gel.

Las matrices a base de sílice preparadas por técnicas sol-gel se consideran como una plataforma prometedora para el encapsulado de biomoléculas, ya que a través de esta técnica se conserva por mayor tiempo su funcionalidad biológica y actividad.

Una de las principales aplicaciones de los inmunoabsorbentes es en el área de la Química Analítica Ambiental, para la determinación de contaminantes, entre los que destacan los plaguicidas.

El uso de los plaguicidas se ha incrementado notablemente en las últimas décadas con el objeto de controlar las plagas, malezas y enfermedades que afectan a los cultivos. Una de las familias de plaguicidas más utilizada por su amplio espectro de actividad biológica (insecticidas, herbicidas, fungicidas, moluscocidas) y por su bajo grado de bioacumulación es la de los Carbamatos, y en particular el grupo de los N-Metilcarbamatos al cual pertenece el Carbofurano.

En años recientes, un gran número de mujeres que habitan en regiones agrícolas donde el carbofurano es ampliamente usado, han presentado problemas de cáncer cérvico-uterino. Aunque no se ha demostrado que el carbofurano sea el agente cancerígeno, el frecuente contacto directo que tienen con el plaguicida pudiera haber ocasionado que este carbamato penetrara y se depositara en el cuello uterino de estas mujeres, provocando así alteraciones que favorecieron el desarrollo del cáncer

Por estas razones, la optimización del proceso de encapsulación del anticuerpo por el método sol-gel, el estudio de la inmuoextracción del carbofurano, la determinación de las condiciones óptimas para la concentración, limpieza y análisis en línea de las muestras son parte integral de la investigación realizada. El método desarrollado se aplicó a muestras reales, es decir los inmunoabsorbentes se utilizaron para determinar trazas de carbofurano en extractos de tejido cérvico-uterino fortificados y en algunas muestras provenientes de mujeres expuestas al plaguicida.

III. ANTECEDENTES

3.1 EXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA

La extracción en fase sólida (EFS) es uno de los métodos más recomendados para la preparación de muestras de matrices complejas, ya que requiere poco disolvente orgánico y, por lo tanto, el costo es menor, además de que éste método se puede automatizar fácilmente.

La EFS concentra y purifica un analito por adsorción de éste en un sorbente de fase sólida, seguida de una elución del analito utilizando un disolvente apropiado¹. Actualmente, diferentes métodos basados en EFS, tanto en línea como fuera de línea, han sido desarrollados para la determinación de plaguicidas².

En el caso de la extracción fuera de línea la preparación de muestra se realiza separada del sistema cromatográfico. Los dispositivos más utilizados para este tipo de extracción son los cartuchos y los discos de extracción. La extracción en línea involucra la transferencia directa de los analitos adsorbidos en la precolumna a la columna analítica por medio de la fase móvil, ayudándose para ello de una válvula de conmutación. La EFS en línea tiene las siguientes ventajas: se evitan pérdidas del analito, disminuye la manipulación de la muestra y el tiempo de análisis, además tanto la reproducibilidad como los límites de detección son mejores¹⁻³.

La mayoría de estos métodos permiten obtener bajos límites de detección en muestras simples (agua potable), pero la falta de selectividad de los sorbentes utilizados comúnmente para EFS (C18, C8, florisil, alúmina, etc.) no permite alcanzar un límite de detección suficientemente bajo en muestras más complejas, ya que generalmente ocurre una co-extracción de analitos e interferencias. Este es el mayor problema cuando los analitos de interés se encuentran a nivel traza mientras que las interferencias están presentes en altas concentraciones, por lo que es necesario involucrar etapas de limpieza de la muestra que consumen tiempo, la pérdida y contaminación de la muestra es mayor y los resultados no siempre son confiables ni satisfactorios.

Por las razones mencionadas anteriormente, es necesario desarrollar sorbentes más selectivos que permitan realizar las operaciones de extracción, concentración y eliminación de posibles interferentes en un solo paso.

La selectividad se puede mejorar usando materiales que involucren interacciones antígeno-anticuerpo, lo que resulta en métodos selectivos de extracción basados en el reconocimiento molecular⁴⁻⁸.

3.2 CROMATOGRAFÍA DE AFINIDAD (CA)

La cromatografía de afinidad es un tipo de cromatografía de líquidos que usa agentes enlazantes específicos, conocidos como ligandos de afinidad, como fase estacionaria para purificar selectivamente y analizar muestras^{9,10}. Gracias a la gran variedad de estos ligandos y a su selectividad, la CA se ha convertido en una técnica bastante útil en áreas como bioquímica, ciencias farmacéuticas, química clínica y análisis ambientales.

En esta técnica, la retención de solutos se basa en interacciones específicas y reversibles, como las que ocurren en sistemas biológicos. Estas interacciones se llevan a cabo inmovilizando un ligando de afinidad en un soporte sólido y colocando este soporte modificado dentro de una columna. Aquí la columna está diseñada para retener un analito específico o analitos muy relacionados, mientras nada de lo demás de la muestra se retiene. Posteriormente, el analito de interés se eluye de la columna y se cuantifica.

En los procesos de retención y elución del analito, en una columna de afinidad, existen factores importantes como¹¹:

- La fuerza de interacción analito-ligando, la cual depende de la naturaleza de la biomolécula inmovilizada
- La cantidad de ligando inmovilizado activo en la columna, que depende del método de inmovilización
- Cinética de asociación y disociación del complejo analito-ligando.

Entre los ligandos de afinidad más comunes se encuentran las lectinas, los metales quelatos inmovilizados y las proteínas A y G, conocidos como ligandos generales, los cuales se caracterizan por ser capaces de enlazar a una familia o clase de moléculas. También existen ligandos de tipo específico entre los que figuran los inhibidores, ácidos nucleicos, enzimas y anticuerpos, éstos son compuestos que enlazan a una o pocas moléculas y son usados cuando se quiere analizar o purificar un soluto específico¹⁰.

Cuando el ligando inmovilizado es una molécula biológica, la técnica de separación se conoce como cromatografía de bioafinidad y dentro de este tipo de cromatografía existe una categoría especial llamada *cromatografía de inmunoafinidad* en la cual el ligando inmovilizado es un anticuerpo.

La cromatografía de inmunoafinidad guarda una estrecha relación con los inmunoensayos, ya que en ambas técnicas el anticuerpo reconoce con alta afinidad y especificidad al analito. Por otra parte, la técnica de inmunoensayo es relativamente simple, no requiere de instrumentación sofisticada y permite analizar varias muestras simultáneamente. Sin embargo, los resultados cuantitativos son menos confiables que los obtenidos por las técnicas cromatográficas en general.

Los inmunoensayos se aplicaron por primera vez en pruebas de diagnóstico clínico por su sensibilidad y selectividad. En los años 70, los químicos se dieron cuenta del potencial de este tipo de ensayos para monitorear contaminantes ambientales y fue en los años 80 cuando se les reconoció como una técnica útil para detectar compuestos contaminantes como los plaguicidas, residuos industriales y sus respectivos productos de degradación¹². Actualmente los inmunoensayos tienen una amplia aplicación en áreas farmacéuticas, de alimentos, veterinaria y análisis forenses^{11,13,14}.

Existen dos tipos de inmunoensayos: homogéneos y heterogéneos. Se llaman homogéneos a aquellos en los que la inmunorreacción se lleva a cabo en disolución. Estos inmunoensayos son más fáciles de llevar a cabo debido a su rapidez y a que no involucran pasos de limpieza, sin embargo presentan interferencias de matriz. Los inmunoensayos en los que se inmoviliza un inmunorreactivo en un soporte sólido se conocen como heterogéneos¹⁴.

3.3 INMUNOADSORBENTES

El factor clave de cualquier inmunoensayo son los anticuerpos o inmunoglobulinas. Éstos son proteínas producidas por un sistema inmune como defensa contra agentes externos como las bacterias y los virus (llamados antígenos)³⁸. Los anticuerpos también pueden ser enlazados a un soporte apropiado y colocados en una columna para formar lo que se conoce como inmunoadsorbentes (IA)^{8,15}.

Por sus características, pueden ser empleados para purificar sustancias de mezclas biológicas complejas, separar la forma nativa de la desnaturalizada de una misma sustancia y recuperar pequeñas cantidades de material biológico de grandes cantidad de sustancias contaminantes.

Los inmunoadsorbentes han sido utilizados por mucho tiempo para los fines antes mencionados en las áreas de medicina y biología. Sin embargo, su aplicación en análisis ambientales es relativamente reciente debido a que la obtención de anticuerpos para

moléculas pequeñas es un proceso difícil. El primer IA comercial fue desarrollado para el análisis de aflatoxinas, usando anticuerpos enlazados a Sepharosa^{5,12}.

3.3.1 Anticuerpos

Los anticuerpos están formados por cuatro cadenas polipéptidas, dos largas y dos cortas idénticas por pares, que están unidas a través de enlaces disulfuro y enlaces no covalentes generando una molécula en forma de Y (Figura 3.1)^{4,14}.

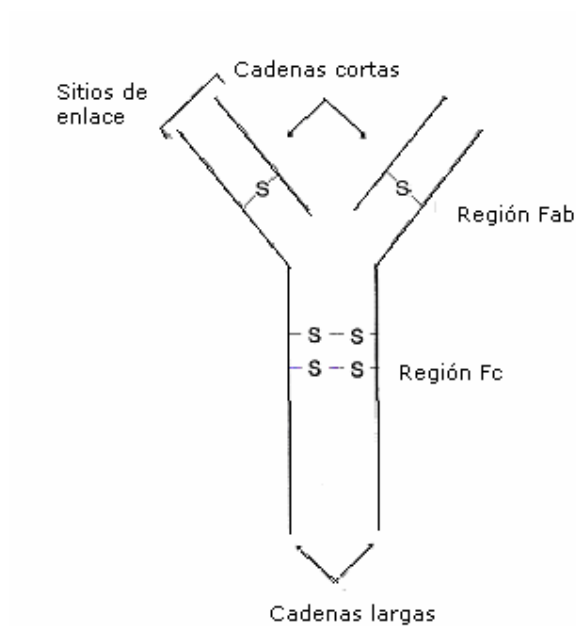


Figura III.1 Estructura general de un anticuerpo (Inmunoglobulina G).

En los sitios de enlace de un anticuerpo, existe un arreglo tridimensional de aminoácidos que interactúa con el antígeno vía puentes de hidrógeno, interacciones iónicas, hidrofóbicas, dipolo-dipolo y fuerzas de London. A pesar de que la fuerza de estos enlaces es relativamente débil, el gran número de interacciones y la geometría adecuada de los sitios de enlace con respecto a la estructura de la molécula de antígeno, dan como resultado una energía de enlace mayor y el complejo antígeno-anticuerpo formado presenta una constante de asociación de 10^8 - 10^{12} M^{-1} . Esta fuerza de enlace y selectividad es lo que hace que los anticuerpos sean usados como reactivos para determinar compuestos químicos en muestras complejas⁷.

La región que tiene los sitios de enlace del antígeno es conocida como fragmento Fab y la región constante que involucra la regulación inmune se llama región Fc. La secuencia de

aminoácidos y la conformación espacial en los extremos del fragmento Fab determinan la especificidad y la fuerza de enlace.

La interacción entre el anticuerpo y el antígeno es reversible y es estabilizada por las fuerzas mencionadas anteriormente⁹. En el equilibrio, cuando el complejo anticuerpo-antígeno se forma, la constante de afinidad se define como:

$$K_a = \frac{|AcAg|}{[Ac][Ag]} \quad \text{donde: } Ac = \text{anticuerpo y } Ag = \text{antígeno}$$

Los anticuerpos generalmente se clasifican en dos categorías: policlonales (si se purifican de antisuero animal) y monoclonales (si se producen vía hibridoma). El antisuero policlonal contiene una variada población de inmunoglobulinas con diferentes propiedades de enlace, por lo que su actividad es una combinación de respuestas de anticuerpos individuales a diferentes partes de la molécula del antígeno. Estos anticuerpos presentan diferente tolerancia a los disolventes y a las interferencias de matriz. Muchos inmunoensayos ambientales están basados en anticuerpos policlonales, debido a su alta afinidad hacia un cierto analito y a que su producción es más simple que la de otros tipos de anticuerpos. Desafortunadamente, tienen la desventaja de que es difícil obtener grandes cantidades y su reproducibilidad es baja. Por otro lado, los anticuerpos monoclonales contienen una única inmunoglobulina producida por un clon de célula. La ventaja de la tecnología hibridoma es que provee una cantidad ilimitada de anticuerpo con afinidad idéntica hacia un antígeno, sin embargo el costo de producción de estos anticuerpos es más elevado^{6,8}.

Actualmente, la producción de anticuerpos contra plaguicidas ha despertado un gran interés para el desarrollo y aplicación de IAs en análisis ambientales. Sin embargo, la síntesis y purificación de anticuerpos para este tipo de sustancias requiere tener un buen protocolo de inmunización, ya que son compuestos con bajo peso molecular e incapaces de desencadenar una respuesta inmune^{7,8}. El proceso se basa en la conjugación de un hapteno (derivado funcionalizado del compuesto de interés) con una molécula inmunogénica (generalmente albúmina de suero bovino, ASB). Para formar el hapteno, se debe introducir un grupo funcional (OH, COOH, NH₂ o SH) en la molécula del analito, ó aprovechar un grupo existente, para el enlazamiento con la proteína; sin embargo, las características particulares de identidad del analito deben mantenerse lo mejor posible. Este paso es de suma importancia, ya que la especificidad de los anticuerpos depende de la formación del hapteno^{16,17}. El complejo hapteno-proteína se inyecta al animal (conejo, ratón, borrego, etc.) para provocar la reacción inmune y colectar el suero varios meses después. Finalmente, la fracción de inmunoglobulina que contiene a los anticuerpos es aislada, purificada y caracterizada para determinar su actividad. La fracción purificada (anticuerpos policlonales) se preserva ya sea en solución o liofilizada^{4,6,7}.

Para la realización del presente trabajo se utilizaron anticuerpos monoclonales anti-carbofurano. El hapteno fue preparado enlazando una cadena alquílica con un grupo carboxílico (ácido 4-aminobutanoico) al grupo hidróxido del precursor fenólico, después de hacerlo reaccionar con fósgeno para formar el grupo carbamato (Figura 3.2).

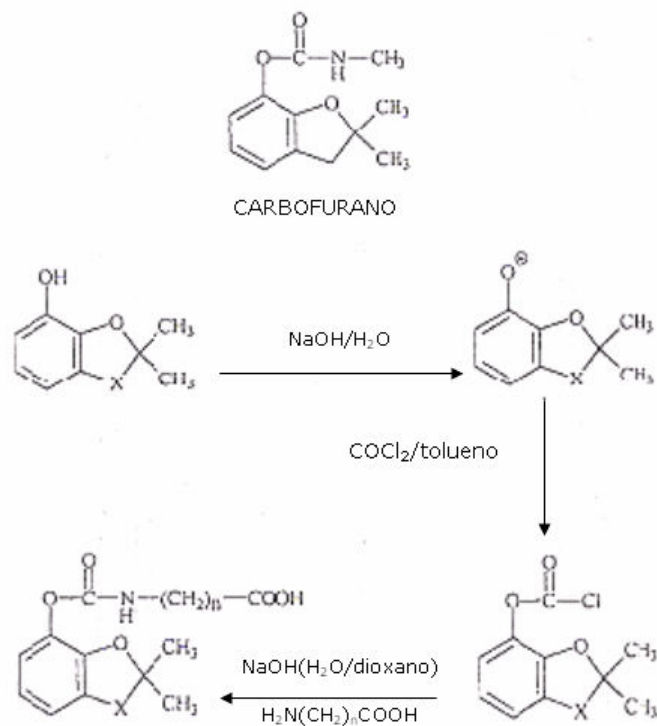


Figura III.2 Síntesis del hapteno BFNB del carbofurano, donde $n=3$ y $X=CH_2$ ¹⁷.

Los haptenos formados, fueron posteriormente unidos covalentemente a ASB y después los animales, en este caso ratas, se inmunizaron a través de 4 inyecciones del conjugado preparado. Los linfocitos B producidos por el animal fueron aislados del bazo y fusionados con células de mieloma murino (células cancerosas) generando así los hibridomas. Finalmente, se procedió a la separación y selección de hibridomas, la clonación y la purificación de los anticuerpos¹⁷.

3.3.2 Soporte

Es el material usado para inmovilizar al anticuerpo y es también un parámetro crítico que debe cumplir con ciertas características, como^{4,8}:

- Química y biológicamente inerte
- Fácilmente activado

- Mecánicamente estable
- Uniforme en cuanto a tamaño de partícula
- Con poros grandes porque los anticuerpos son moléculas grandes
- Hidrofílico para minimizar interacciones no-específicas
- Estable bajo presión, flujo y disolvente
- Rígido

Algunos ejemplos de soportes se muestran en la tabla III.1.

Tabla III.1 Ejemplos de soportes utilizados en la preparación de inmunoabsorbentes

Soportes	Ejemplos
Basados en carbohidratos	Agarosa, celulosa, celulosa modificada
Soportes inorgánicos modificados	Sílice, vidrio de poro controlado
A base de orgánicos sintéticos	Copolímeros agarosa/acrilamida, poliestireno hidroxilado, derivados de poliacrilamida

Existen dos tipos de soportes de afinidad apropiados para preparar un inmunoabsorbente⁷:

- Los primeros son geles no rígidos de diámetro de poro grande. Ejemplos: soportes hechos a base de materiales orgánicos sintéticos y de carbohidratos. Se caracterizan por su estabilidad limitada a altas presiones y flujos, son baratos, presentan buena estabilidad química y generan pocas interacciones no-específicas. Este tipo de soportes son adecuados para inmunoextracciones fuera de línea.
- Los soportes de la segunda categoría consisten de partículas pequeñas y rígidas y son capaces de soportar altas presiones y flujos. Incluyen: sílice, vidrios porosos y medios de poliestireno hidroxilados. La sílice es lo más apropiado debido a su alta estabilidad mecánica, además se activa fácilmente y es hidrofílica, lo cual disminuye interacciones no-específicas como se mencionó anteriormente. Otra ventaja de la sílice es su biocompatibilidad y resistencia a ataques de microorganismos. Su mayor desventaja es el rango limitado de pH en que puede ser utilizada.

Interacciones no-específicas

Este tipo de interacciones pueden ocurrir entre el soporte del IA ó la molécula de anticuerpo y los componentes de la muestra incluyendo al analito. Comúnmente, fuerzas iónicas e hidrofóbicas son las responsables de adsorciones no deseables lo que ocasiona una disminución en la selectividad y en el límite de detección. Las interacciones no-específicas ocurren con mayor frecuencia con compuestos muy hidrofóbicos, los cuales tienden a adsorberse en todas las superficies que se encuentran en contacto con sus soluciones acuosas. Estas interacciones se pueden reducir adicionando un pequeño porcentaje de disolvente orgánico a la fase acuosa⁷.

3.3.3 Métodos de inmovilización

Se refiere a la manera en la cual el anticuerpo es unido al soporte sólido. Una buena inmovilización tiene que ser simple y rápida, debe mantener la actividad bioespecífica de los anticuerpos y permitir obtener IA estables^{7,8}.

Las técnicas de inmovilización más comunes son por:

- Enlace covalente
- Enlace no-covalente
- Adsorción
- Método sol-gel

Por enlace covalente.- Esta técnica se lleva a cabo por reacción entre los grupos amino libres de los anticuerpos y los soportes que contienen grupos epóxido o aldehído sobre su superficie. Su desventaja es que el procedimiento es largo y complicado, y las reacciones químicas involucradas pueden provocar la inactivación de una fracción importante de la biomolécula por distorsión o pérdida de su estructura. Además, el anticuerpo puede quedar mal orientado impidiendo así el acceso del analito. Algunos problemas frecuentes son^{7,8}:

- a) Un enlazado multisitio, esto significa que el acoplamiento del ligando (en este caso el anticuerpo) al soporte se realiza a través de varios grupos funcionales, lo cual origina distorsión y desnaturalización de la región activa del ligando. Esto se puede minimizar usando un soporte de baja densidad de sitios activos.
- b) Una orientación impropia, que aunque genera también una pérdida de actividad se puede evitar uniendo al ligando a través de grupos que estén lejos de su región activa.
- c) Impedimentos estéricos, se refieren a la pérdida de actividad debido a la presencia cercana del soporte u otros ligandos. Los impedimentos producidos por ligandos

cercanos se minimizan usando un recubrimiento ligero de ligando, en tanto que los producidos por el soporte se reducen adicionando un brazo espaciador entre el ligando y el soporte. La presencia de un brazo espaciador es importante cuando se usan ligandos pequeños para la retención de analitos grandes.

La elección del método de inmovilización química es también un factor importante ya que éste puede afectar la actividad del inmuoadsorbente; algunos elementos que deben ser considerados en la inmovilización de biomoléculas son¹⁰:

- Grupos funcionales sobre el ligando: La mayoría de los métodos de inmovilización por enlace covalente usan los grupos amino libres del ligando, aunque pueden ser usados otros como ácidos carboxílicos, fenoles y tioles.
- Brazos espaciadores: Cuando se inmovilizan ligandos pequeños, frecuentemente se utiliza un brazo espaciador con el fin de que el analito sea capaz de alcanzar el sitio de enlace del ligando. Sin embargo, el brazo espaciador puede alterar la fuerza de interacción con el analito debido a efectos hidrofóbicos o iónicos.
- Empleo de medios acuosos
- Temperatura de 4-25 °C
- Fuerza iónica entre 0.01-0.5 mol/dm³
- pH entre 4-9
- Tiempos de reacción cortos (menos de 16 h)

En la figura III.3 se ilustran los problemas mencionados anteriormente

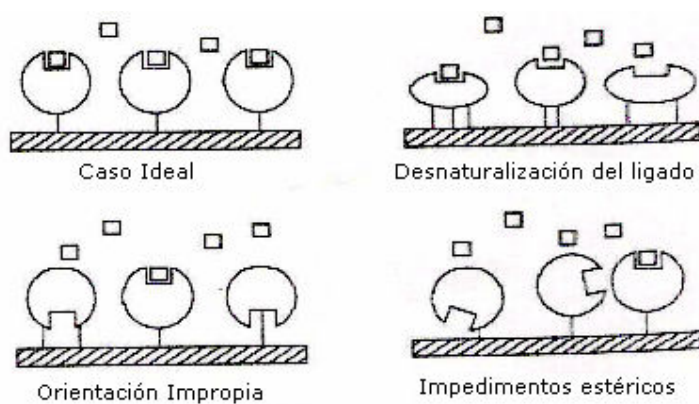


Figura III.3 Consecuencias de una inmovilización inadecuada¹⁴.

Por enlace no covalente.- En este caso los soportes que contienen proteínas A ó G, previamente inmovilizadas por adsorción o enlace covalente, interactúan con la región Fc de los anticuerpos, orientándolos de tal manera que los sitios de enlace del antígeno quedan lejos de la superficie del soporte. Esta técnica tiene las desventajas, primero, de que el enlace proteína-anticuerpo se rompe fácilmente al disminuir el pH de la solución y segundo, requiere mayor cantidad de anticuerpo que la técnica por enlace covalente.

Por adsorción.- Es otro método de inmovilización, en el cual la molécula se adhiere al soporte por fisiorción. Es el más simple pero tiene la desventaja de que la vida útil del material resultante es corta, ya que el agente adsorbido tiende a perderse progresivamente^{12,19}.

Técnica sol-gel.- Consiste en inmovilizar a los anticuerpos por encapsulamiento en los poros de una matriz de vidrio hidrofílico y transparente. Comparado con las otras técnicas de inmovilización, ésta presenta algunas ventajas como son: los anticuerpos mantienen su afinidad y especificidad hacia el antígeno en mayor medida ya que el proceso de inmovilización se realiza en condiciones suaves, los poros de la matriz se llenan de agua evitando así impedimentos estéricos y disminuye la adsorción no-específica de analitos no polares¹⁸. En cuanto al tamaño de poro, éste es suficientemente pequeño para prevenir la difusión de moléculas grandes y bacterias hacia el interior de la estructura porosa¹⁹. Por otro lado, con esta técnica se evitan las reacciones de activación y de enlazamiento que se requieren en las otras técnicas²⁰.

La técnica sol-gel se describirá en detalle más adelante por ser el método empleado para la preparación de inmunoabsorbentes en este trabajo.

3.3.4 Condiciones de elución

Una vez preparado el IA, la muestra se carga y los analitos específicos son retenidos por los anticuerpos, mientras que otros componentes de la matriz no lo son. Las principales fuerzas involucradas en las interacciones anticuerpo-antígeno son fuerzas de Van der Waals, atracciones hidrofóbicas y puentes de hidrógeno entre otras.

Para desadsorber el analito del inmunoabsorbente es necesario disociar el complejo anticuerpo-antígeno formado y como la energía de las interacciones bioquímicas es muy grande, la desadsorción sólo se lleva a cabo modificando notablemente las condiciones experimentales. Por ejemplo: utilizar agentes desplazadores, agentes caotrópicos, incrementar la temperatura, variar el pH ó usar mezclas de agua con fase orgánica. Cabe mencionar que la solución de elución no debe desnaturar al anticuerpo con el objeto de que pueda ser reutilizado^{7,8}.

Un desplazador es una molécula de reactividad cruzada alta capaz de inducir una desadsorción bioespecífica. Las moléculas desplazadoras compiten con el analito enlazado y el exceso de éstas asegura una desadsorción cuantitativa del analito. Para lograr un rendimiento óptimo en la elución, el desplazador debe tener: reactividad cruzada alta con el anticuerpo inmovilizado, un tiempo de retención diferente de los analitos ya que el exceso de desplazador que se utiliza genera un pico muy ancho que puede interferir en la detección de los analitos, buena estabilidad y alta pureza, no tóxico y que sea poco detectable comparado con los analitos.

Las soluciones de iones caotrópicos destruyen la estructura acuosa que existe alrededor del anticuerpo, lo que induce una ruptura de las interacciones hidrofóbicas entre el anticuerpo y el antígeno. Los iones caotrópicos más comunes son: cloruros, yoduros, percloratos y tiocianatos a concentraciones entre 1.5 y 8 M.

Un incremento en la temperatura origina un aumento de las constantes de disociación del complejo anticuerpo-antígeno.

Generalmente para desadsorber moléculas pequeñas del inmunoabsorbente se utilizan soluciones con pH bajo, mínimo a tres unidades de diferencia con el punto isoeléctrico del anticuerpo. Las soluciones más utilizadas son soluciones amortiguadoras de fosfatos 0.05 M ó soluciones de ácido fórmico a pH igual a 2.5. Una elección apropiada de la solución amortiguadora minimiza, a su vez, la desadsorción de compuestos interferentes de la muestra, que hayan podido quedar retenidos en el IA por interacción no específica.

La presencia de disolventes orgánicos reduce las interacciones hidrofóbicas entre anticuerpo-antígeno, sin embargo estas condiciones de elución pueden desnaturalizar al anticuerpo de una manera irreversible⁷.

3.3.5 Regeneración y almacenamiento

Debido al alto costo de los anticuerpos y a la escasa disponibilidad de IA comerciales, los IA son regenerados por percolación de PBS (amortiguador salino de fosfato) y almacenados a 4 °C cuando no se usan. Algunas veces también se usa azida de sodio como agente antimicrobiano cuando el IA se almacena por periodos prolongados. Sin embargo, con el tiempo y el número de ciclos de uso, la actividad de la biomolécula disminuye progresivamente.

La posibilidad de reutilización de los cartuchos de inmunoextracción también depende de la resistencia mecánica del soporte empleado en el proceso de inmovilización⁸.

3.3.6 Propiedades de los inmunoadsorbentes

- Densidad de enlace

La densidad de enlace se define por el número de moléculas de anticuerpo inmovilizado en el adsorbente. Esta propiedad determina la capacidad de enlace del antígeno. El grado de purificación de la solución del anticuerpo es otro factor importante, ya que la co-inmovilización de otras proteínas reduce la densidad de enlace del inmunoadsorbente.

- Capacidad del inmunoadsorbente

Es definida por el número total de anticuerpos activos inmovilizados, la cual no puede ser medida directamente porque la concentración de anticuerpos activos no es conocida. Un método para conocer la capacidad es calcular la cantidad de analito adsorbido después de haberlo hecho pasar a través del inmunoadsorbente^{7,8}.

3.4 TÉCNICA SOL-GEL

Debido a que los soportes con moléculas biológicas inmovilizadas han tenido gran aplicación en diversas áreas, como biosensores, biocatalizadores y en cromatografía de afinidad, uno de los aspectos más importantes en el desarrollo de estas matrices ha sido el estudio y optimización de técnicas de inmovilización que mantengan la funcionalidad de las biomoléculas.

Las matrices a base de sílice preparadas por técnicas sol-gel se consideran como una plataforma prometedora para el encapsulado de biomoléculas, como los anticuerpos, debido a que son químicamente inertes, hidrofílicas, su síntesis es barata y sencilla y, comparadas con otros materiales poliméricos, presentan la ventaja de alta resistencia a la fuerza mecánica, estabilidad térmica y soportan el empleo tanto de disolventes orgánicos como acuosos sin cambio de volumen. De hecho, este tipo de matrices pueden actuar también como reservorio para el agua, lo cual en el caso de los inmunoadsorbentes es de gran interés pues ayuda a preservar la actividad del anticuerpo inmovilizado²¹.

La combinación de las propiedades de una matriz sol-gel (estabilidad, alta porosidad, área superficial grande y claridad óptica) junto con la selectividad y sensibilidad de los anticuerpos ha dado como resultado un grupo de biomateriales que permiten la purificación, concentración y monitoreo de una variedad de agentes contaminantes residuales provenientes de diferentes fuentes²²⁻²⁴.

El proceso sol-gel es una técnica de síntesis química para preparar geles, polvos cerámicos y materiales para nanotecnología, además de que permite sintetizar vidrios inorgánicos a temperatura ambiente sin necesidad de fundir.

La síntesis de estos materiales generalmente involucra el uso de un precursor que es típicamente un alquilsilicato, un alquilalcoxisilano o alcóxidos metálicos $M(OR)_n$ (donde M puede ser Al, Si, Ti, por ejemplo), los cuales experimentan reacciones de hidrólisis casi espontáneamente bajo condiciones ácidas o catálisis básica para formar derivados hidroxilo. Después se producen reacciones de condensación para dar geles. Este proceso se lleva a cabo a baja temperatura y en presencia de catalizadores (por ejemplo: HCl, HF, NH_4OH , aminas, etc.) para favorecer la reacción de hidrólisis^{16,20,25}.

En varias aplicaciones, monolitos de sílice que tienen encapsulada alguna proteína han sido preparados por hidrólisis y condensación de un orto-silicato como el tetrametilortosilicato (TMOS) ó el tetraetilortosilicato (TEOS). Primero el TEOS (ó el TMOS) es parcialmente hidrolizado a través de un ataque nucleofílico del oxígeno de la molécula de agua sobre el átomo de silicio. La velocidad de la reacción de hidrólisis depende de la relación molar agua-alcoxisilano en la mezcla reaccionante, la adición de catalizadores y su naturaleza, la adición de un cosolvente y el tamaño y propiedades químicas de los átomos unidos al silicio. Durante esta reacción los enlaces $Si-OCH_2CH_3$ se convierten en enlaces $Si-OH$ que condensan para formar un puente con estructura $Si-O-Si$ y se genera etanol. En este punto, la mezcla de reacción se ha transformado en un sol, esto es, una suspensión coloidal de especies sólidas en un líquido. Conforme continúa la policondensación, el grado de entrecruzamiento entre las partículas aumenta y por lo tanto también la viscosidad del sol. Este material viscoso se solidifica y forma un gel poroso. Previo a la transición sol-gel, la especie biológica es añadida junto con una solución amortiguadora adecuada que promueve la gelificación. La solución amortiguadora de pH debe permitir, primero, que la solución final se encuentre muy cerca de la neutralidad para evitar la desnaturalización de la proteína y, segundo, que se diluya el alcohol generado durante la hidrólisis disminuyendo sus efectos nocivos sobre las biomoléculas. Es sabido que el alcohol en concentraciones mayores al 60 % (v/v) provoca el desdoblamiento y desnaturalización de las biomoléculas²⁶.

El punto de transición sol-gel corresponde a aquél en donde dos o más grandes coloides se unen por condensación formando una molécula gigante que se extiende por todo el medio y la solución deja de fluir. Esta transición es irreversible y en este punto el sol se transforma en un sistema bifásico (conocido como gel) constituido por un esqueleto sólido poroso y el líquido intersticial atrapado en él.

Cabe mencionar que este gel presenta cambios en su estructura y propiedades aún después de la gelación, conforme las reacciones de policondensación continúan llevándose a cabo entre fragmentos con Si-OH terminal. Durante este proceso conocido como maduración del gel se forman enlaces nuevos Si-O-Si que ocasionan una contracción en las cadenas del gel, el tamaño de poro disminuye y parte del solvente es expulsado de los poros. El grado de contracción del gel depende de las condiciones de maduración así como de las condiciones previas a la gelificación, es decir, tamaño, grosor y grado de entrecruzamiento de los agregados poliméricos antes de la transición sol-gel. Generalmente el gel se contrae entre 5 y 20 % de su volumen original durante la maduración^{19,26}.

Cuando el gel se seca, las fuerzas capilares originadas por la tensión superficial de la fase líquida tienden a densificar aún más el sólido, comprimiendo y cerrando la red polimérica, reduciendo el volumen poroso y destruyendo las partes más frágiles de la estructura tridimensional. La reducción del volumen en esta etapa puede llegar hasta el 85 % del volumen inicial.

Sin embargo, idealmente, la morfología creada durante la etapa de gelación se debería mantener, lo que implica minimizar el encogimiento del material y el colapso de los poros durante la etapa de secado. Para evitar este problema, se han propuesto diversas alternativas. Una de ellas consiste en realizar una prehidrólisis del precursor, recuperar las partículas formadas en el sol inicial, llevar a cabo una transesterificación con glicerol y continuar posteriormente el proceso de hidrólisis y condensación con las partículas modificadas. El glicerol generado durante esta última etapa actuará como un agente de control durante el secado, disminuyendo la tensión superficial de la fase líquida y promoviendo una lenta evaporación de ésta²⁰. Otra propuesta se basa en sustituir la mezcla agua-alcohol de los poros del gel formado por un disolvente orgánico de menor tensión superficial, combinado con un secado a presión y temperatura arriba de los valores críticos del disolvente sustituto²⁷.

Aunque esta última propuesta permite obtener materiales altamente porosos (aerogeles) que son de gran utilidad para algunas aplicaciones (p. ej. catálisis), no es un método compatible con el encapsulamiento de biomoléculas. Algunos autores han sugerido que las etapas iniciales del proceso sol-gel son cruciales para la obtención de un material con alta porosidad y buenas propiedades mecánicas^{18,27}. La formación de grandes micelas o partículas elementales al inicio del proceso da como resultado una estructura fuerte que resiste bien las etapas de maduración y secado sin que se produzca un excesivo encogimiento del gel. Para promover la formación de grandes núcleos en dicha etapa, es necesario mantener condiciones en las que se tenga una hidrólisis rápida y una condensación lenta; esto se logra en un medio ácido. Por el contrario, en la etapa que

precede a la transición sol-gel, la condensación debe ser rápida para promover un alto grado de entrecruzamiento de las cadenas; esto requiere un medio neutro o ligeramente alcalino²⁷.

Por otra parte, la pérdida de actividad de las biomoléculas durante el encapsulamiento sol-gel no sólo puede ocurrir en la etapa de maduración y secado por el colapso de los poros, sino también antes de la gelación, por la gran concentración de alcohol presente en el medio. Algunos autores han propuesto llevar a cabo la síntesis del material utilizando silicato de sodio como precursor²⁸. De esta manera se evita la generación de alcohol y al mismo tiempo se mantiene un pH neutro, ideal para el encapsulamiento de la proteína. La desventaja de este procedimiento es que la nucleación inicial produce pequeñas partículas elementales que conllevan a la formación de una estructura frágil. Otra alternativa propuesta para minimizar el efecto desnaturante del alcohol sobre las biomoléculas consiste en promover una gelificación muy rápida justo después de añadir la proteína al sol^{23,24}. Para ello, se provoca una desestabilización del sistema coloidal por un cambio abrupto de pH y fuerza iónica mediante la adición de PBS, antes de o junto con la proteína. La rápida gelificación encierra a las biomoléculas en poros individuales evitando su agregación y dificultando su desplegamiento.

El modelo propuesto para explicar el atrapamiento permanente de las biomoléculas en los poros del gel, manteniendo sin embargo su funcionalidad biológica es el siguiente^{20,25,29,30}:

- 1) La especie biológica reside en una cavidad del polímero cuyo interior ha sido estructurado de tal forma que se adapta física y químicamente a las características superficiales de la molécula dopante.
- 2) Existe una interpenetración sustancial de segmentos de la biomolécula y el esqueleto del polímero sol-gel dando como resultado grados variables de inmersión.
- 3) La molécula se encuentra rodeada o solvatada por una capa de disolvente que la separa de la pared del poro.
- 4) La rotación y transiciones conformacionales globales de la biomolécula están más o menos restringidas dependiendo del grado de contracción del poro durante la maduración y secado del gel y de las interacciones dopante-polímero que se establecieron.
- 5) La accesibilidad al sitio activo de la biomolécula y la libertad para que ésta efectúe algunos rearrreglos conformacionales locales son suficientes para permitir la entrada, reconocimiento y procesamiento de sustratos, de manera similar a como actúa la biomolécula libre en solución.

En resumen, mediante la técnica sol-gel las biomoléculas son encapsuladas dentro de los poros de un soporte sólido donde pueden moverse de manera restringida, dependiendo del tamaño de poro y las interacciones que tengan con los grupos silanol dentro de los poros.

Este método de inmovilización tiene algunas ventajas con respecto a los otros métodos como son:

- Es compatible con muchos reactivos orgánicos e inorgánicos, por lo que puede usarse para encapsular varios ligandos.
- Se obtienen materiales químicamente, fotoquímicamente, térmicamente y mecánicamente estables, los cuales pueden usarse en aplicaciones más rígidas.
- Los vidrios sol-gel son ópticamente transparentes y por lo tanto, permiten mediciones espectrofotométricas y espectrofluorimétricas.
- El vidrio sol-gel se forma a bajas temperaturas y bajo condiciones químicas suaves permitiendo de esta manera, el encapsulamiento de moléculas con poca estabilidad térmica y química (proteínas y enzimas).
- En general, las moléculas atrapadas dentro de un material sol-gel preservan por más tiempo su actividad que en solución, esto es debido al efecto de estabilización de la matriz sólida y las interacciones que existen entre la molécula y los grupos silanol^{12,21}.
- El sol-gel puede tomar la forma de monolitos, películas delgadas, fibras o polvos. Esto permite tener varias configuraciones para diferentes aplicaciones¹⁹.

A pesar de las ventajas que tiene sobre los otros métodos, la técnica sol-gel presenta también algunas desventajas como las que se mencionan a continuación:

- Cuando se usan películas delgadas o monolitos se puede tener una respuesta lenta en medios acuosos. Esta respuesta es limitada por los procesos de difusión que ocurren en el material, los cuales dependen del tamaño de poro, ancho de la película y tamaño y concentración del analito.
- Los vidrios sol-gel preparados a partir de precursores tetrafuncionales siguen llevando a cabo reacciones de condensación aun después de gelificar, lo que provoca un encogimiento progresivo del material. Esto ocasiona una disminución en el tamaño de poro con el tiempo y afecta la difusión de los analitos dentro del material.
- Este método puede alterar las propiedades químicas y espectroscópicas, así como también la actividad biológica de los ligandos de afinidad debido al reducido espacio que tienen para moverse libremente y a las interacciones con la superficie interior de los poros¹⁹.

3.5 PLAGUICIDAS

Los plaguicidas son productos químicos cuyo uso se ha incrementado notablemente en las últimas décadas con el fin de controlar las plagas, malezas y enfermedades que afectan a los cultivos. El comportamiento de los plaguicidas en la biosfera está relacionado con su origen y fuente.

El uso indiscriminado de estas sustancias se ha convertido en un riesgo potencial como fuente de contaminación de las aguas superficiales, del suelo y napas subterráneas, e incluso se han encontrado plaguicidas en muestras de aire presentes en la fase de vapor. El transporte global de plaguicidas volátiles y estables, ha sido demostrado por su presencia en zonas remotas (circulo ártico) y en el aire de océanos del mundo.

Los plaguicidas pueden clasificarse según el tipo de organismos que controlan, su modo de acción o por su composición química. Dentro de la primera clasificación se encuentran los insecticidas (insectos), fungicidas (hongos), herbicidas (malezas o plantas nocivas), acaricidas (ácaros), rodenticidas (roedores), moluscocidas (caracoles) y nematocidas (nemátodos)³¹⁻³³. Según su modo de acción, se clasifican en sistémicos y no sistémicos. Los sistémicos se absorben en las partes vegetativas de la planta y se incorporan en la savia, transportándose con ella y metabolizándose en parte de la misma; su acción química la ejercen sobre insectos chupadores, hongos y ácaros. Los no sistémicos no se absorben por las partes vegetativas y su acción la ejercen sobre plagas ya sea por contacto o por ingestión. La clasificación química se basa en los grupos funcionales o en determinados elementos químicos presentes; aquí se encuentran las triazinas, organoclorados, organofosforados, fenilureas y carbamatos, entre otros^{32,33}.

Los plaguicidas sufren tres tipos de degradación: microbiológica, química y fotoquímica. La degradación por microorganismos se debe a hongos y bacterias que se encuentran en el suelo. La degradación química ocurre por influencia de la temperatura o por defensa de las propias plagas mediante descomposición enzimática. La fotodegradación ocurre cuando los plaguicidas no son adsorbidos por la plaga o plantas y quedan expuestos a la luz del sol en el suelo o en las fuentes de agua.

Últimamente, el análisis de plaguicidas ha recibido especial atención debido a los problemas asociados con la contaminación ambiental y a las estrictas normas establecidas para garantizar la calidad de los alimentos y del agua potable³¹.

En México, los plaguicidas no son determinados de manera rutinaria y, aunque se encuentran generalmente en concentraciones traza, representan un riesgo potencial debido

a su toxicidad. Por tal razón, es primordial desarrollar técnicas analíticas rápidas, selectivas, baratas, reproducibles y robustas para este tipo de compuestos.

3.5.1 Carbamatos

Su importancia e incidencia ambiental y para la salud humana reside en que los carbamatos actúan inhibiendo la acción de la enzima acetilcolinesterasa, llevando a una acumulación de la acetilcolina en las sinapsis nerviosas y desencadenando una serie de efectos parasimpáticos. Inhiben a dicha enzima también en los glóbulos rojos, en el plasma y en otros órganos. El efecto es similar al de los insecticidas organofosforados pero, a diferencia de estos últimos, los carbamatos tienen un efecto menos dañino, ya que la unión enzima-carbamil es reversible, lo que origina un síndrome clínico más leve con una duración más corta. De todas formas, tienen alta penetración en el sistema nervioso central, pudiendo llegar a ser igualmente tóxicos. Se introducen en el organismo por absorción por la piel, por ingestión y por inhalación. Los efectos indeseados producidos dependen de la clase, la dosis, la vía y el tiempo de exposición. Aunque su biotransformación es muy lenta, no provocan efectos acumulativos en las personas expuestas, sin embargo no hay suficiente evidencia para descartar su potencial carcinogénico³⁴.

En general, los carbamatos presentan baja persistencia en el ambiente, son relativamente solubles en agua. Moderadamente solubles en benceno y tolueno y solubles en metanol y acetona. Los carbamatos químicamente derivan del ácido carbámico. El metabolismo de los carbamatos puede darse por hidrólisis, hidroxilación u oxidación. La persistencia es variable, son fotosensibles y tienen alta presión de vapor. Se han encontrado productos de degradación de carbamatos en muestras de suelo y sedimentos, aire, agua, tejidos animales y muestras vegetales. Además, se han extraído de membranas gastrointestinales en humanos.

3.5.2 Carbofurano

Su nombre según IUPAC es 2,3-dihidro-2,2-dimetilbenzofuran-7-il metilcarbamato. Es un insecticida y nematicida sistémico y de contacto y es conocido con los nombres comerciales de Curaterr, Furadan y Carfuril. La exposición a éste plaguicida puede causar debilidad, sudor, náuseas y vómitos, dolor abdominal y visión borrosa. Niveles mayores pueden causar contracciones musculares, pérdida de la coordinación y paro respiratorio.

El carbofurano tiene la fórmula empírica $C_{12}H_{15}NO_3$ y su peso molecular es de 221.26 g/mol. Es un sólido blanco con un punto de fusión de 153-154 °C, su presión de vapor

(mm Hg) es de 2×10^{-5} a 33 °C y 1.1×10^{-4} a 50 °C. Es menos estable en medio alcalino que en medio ácido y se degrada a temperaturas superiores a 130 °C

El carbofurano es probablemente el N-metilcarbamato más usado en México. Se emplea como insecticida, nematicida y aracnicida en una gran variedad de cultivos como: maíz, alfalfa, arroz, algodón, trigo, papa, chile, cítricos, vid y algunos más.

El carbofurano, aplicado al suelo, tiene una baja constante de adsorción y moderada vida media lo que da como consecuencia su lavado hacia las napas de agua subterránea en algunos suelos. De hecho, en años recientes el carbofurano se ha visto involucrado en casos de envenenamiento de pájaros.

Este plaguicida experimenta rápidamente una hidrólisis química bajo condiciones fuertemente alcalinas para dar sus derivados fenólicos correspondientes. Los principales metabolitos del carbofurano en las plantas, animales y tierra son el 3-hidroxi-carbofurano y el 3-cetocarbofurano.

Existen varios métodos analíticos para la determinación de N-metilcarbamatos en muestras ambientales, pero hasta ahora pocos han sido aplicados en muestras biológicas (generalmente frutas y legumbres)^{21,22}. La técnica analítica preferida ha sido la cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR) debido a que la mayoría de los carbamatos son térmicamente lábiles³¹.

Entre los métodos para la determinación de N-metilcarbamatos en agua^{32,35}, el más aceptado es el método EPA 531.1, el cual se basa en el uso de CLAR con un detector de fluorescencia que proporciona alta sensibilidad y selectividad. La separación de los carbamatos se realiza en una columna de fase reversa y es seguida por un derivatización postcolumna de dos etapas para la formación del derivado fluorescente. Este método requiere de instrumentación especializada y de alto costo; además, para su aplicación en matrices biológicas, se necesita una exhaustiva limpieza previa de la muestra, a pesar de la gran selectividad del método de detección^{32,34}.

En general, el análisis de carbamatos en matrices biológicas involucra un tiempo de preparación de muestra muy largo, lo cual limita el número de muestras que pueden ser analizadas. Adicionalmente, algunos de los métodos reportados utilizan grandes cantidades de solventes orgánicos, lo que incrementa los costos de los análisis y los hace ambientalmente poco amigables³⁶. Estas desventajas muestran la necesidad de desarrollar técnicas más simples y robustas, así como menos costosas y contaminantes, para este tipo de muestras.

A continuación se mencionan algunas alternativas que se han propuesto para la determinación de carbamatos en muestras biológicas.

- Cromatografía de gases

Se ha determinado el etiofencarbamato en muestras de manzana mediante CG utilizando un detector de nitrógeno-fósforo. A pesar de que se ha demostrado, a través del estudio de fragmentos de patrones de algunos carbamatos, que la degradación térmica no se lleva a cabo bajo ciertas condiciones, los métodos propuestos para determinar carbamatos por cromatografía de gases involucran reacciones de derivatización. Por esta razón la cromatografía de líquidos sigue siendo una mejor opción para determinar carbamatos polares, no volátiles y/o termolábiles.

- Cromatografía de fluido supercrítico

La versatilidad que presenta esta técnica en cuanto a separación, la posibilidad de usar detectores tanto de CL como de CG y la posibilidad de acoplar una extracción de fluido supercrítico al sistema, hacen de ella una técnica atractiva para el análisis de carbamatos. Sin embargo, no es usada comúnmente debido a la limitada disponibilidad de estos equipos en laboratorios para el control de alimentos.

- Cromatografía de líquidos

Varios de los métodos estándar que han sido desarrollados para la determinación de carbamatos en frutas y vegetales están basados en el método de Krause que fundamentalmente consiste de un gradiente de elución en fase reversa seguido de una reacción post-columna para obtener especies fluorescentes. Los carbamatos son hidrolizados con una solución alcalina a una metilamina que es derivatizada en presencia de dicarboxaldehído o-ftálico y mercaptoetanol para crear el producto fluorescente. El método Krause involucra la extracción metanólica de los analitos a partir de la matriz, utilizando grandes cantidades de muestra y de disolvente. El paso de limpieza de muestra comienza con varias operaciones de extracción líquido-líquido sucesivas y termina con la percolación del extracto, que contiene a los compuestos de interés, a través de una columna de carbón Celite y su posterior elución mediante una serie de disolventes. La preparación de muestra por el método original de Krause es sumamente larga y tediosa, por lo que se han propuesto diversas modificaciones para reducir el tiempo de análisis, el consumo de disolventes y los costos asociados³¹.

Por otro lado, también se ha propuesto un método para la determinación de N-metilcarbamatos en frutas y vegetales en el cual los reactivos que se utilizan para la hidrólisis y derivatización están presentes en la fase móvil, en lugar de realizar la reacción postcolumna en la que se requieren bombas adicionales y reactores. En este caso se utilizó una columna Kromasil-100-C18 y un amortiguador de borato en la fase móvil³¹.

Minelli (1997), desarrolló otro método para determinar carbamatos en manzanas, peras y lechuga, que consiste de una extracción en fase sólida para la limpieza de la muestra disminuyendo de esta manera los volúmenes de muestra y disolvente³¹.

La selectividad y la sensibilidad dependen del tipo de detector que se utilice, por ejemplo, cuando se utilizan detectores UV, la presencia de especies coextraídas limitan la determinación del analito y por lo tanto la sensibilidad del método disminuye.

Para confirmar la presencia de carbamatos, se ha utilizado la técnica de cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR) acoplada a un espectrómetro de masas (EM) mediante diferentes interfaces. En la tabla III.2 se resumen las técnicas LC-MS aplicadas al análisis de plaguicidas, incluyendo carbamatos.

Tabla III.2 Interfases para análisis cromatográficos de plaguicidas³¹

Interfase	Plaguicidas	Tipo de muestra
APCI, ISP, TSP, y CI	N-metilcarbamatos	Soluciones acuosas Pimienta verde
APCI, TSP y PB-MS	17 plaguicidas de 5 clases químicas (triazinas, fenilureas, organofosforados carbamatos y misceláneos)	Agua subterránea
FIA-PB-PCI	14 carbamatos	Soluciones acuosas
FIA-PB-EII-CI	33 carbamatos y 14 productos de degradación	Agua superficial
APCI	11 carbamatos	Alimentos
ES	20 carbamatos	Frutas y vegetales
ES	Compuesto heterocíclicos, fenilureas y carbamatos	Frutas y vegetales

APCI, ionización química a presión atmosférica; CI, ionización química; EII, ionización por impacto electrónico; ES, electrospray; FIA-PB-PCI; análisis por inyección en flujo-bombardo de partículas-ionización química positiva; TSP, termospray; ISP, ionización por electrospray asistida neumáticamente.

En general, la interfase de ionización a presión atmosférica (APCI) es la que se utiliza con mayor frecuencia para confirmar la presencia de plaguicidas en alimentos y muestras ambientales, a pesar de que es poco sensible.

- Métodos multi-residuos

Uno de los métodos oficiales más utilizado para el análisis de plaguicidas en frutas y vegetales, es el de la AOAC (Association of Official Analytical Chemists). Los compuestos de interés son recuperados de la matriz por una extracción con acetona acuosa, la cual es seguida por un laborioso procedimiento de limpieza mediante extracciones líquido-líquido y/o extracciones en fase sólida con sílica o florisil, para remover los interferentes coextraídos. Para la determinación de los analitos se emplean las técnicas de cromatografía de gases ó CLAR con detectores selectivos. Sin embargo, este método también tiene las desventajas de que es muy laborioso, consume mucho tiempo y las cantidades de disolvente utilizadas son muy grandes.

- Inmunoafinidad

En años recientes, también se han desarrollado métodos basados en inmunoensayos (ELISA) para la determinación de plaguicidas. Estos métodos tienen la ventaja de poder reducir el tiempo de análisis y no requieren equipos sofisticados y caros, son sumamente sensibles y también se ha demostrado que pueden usarse confiablemente para el análisis cuantitativo³¹.

Moreno *et al.*³⁴ desarrollaron y validaron métodos por ELISA utilizando anticuerpos monoclonales para determinar carbofurano y carbaryl en frutas y vegetales. Los analitos fueron extraídos a partir de la muestra homogeneizada (15 g) a la que se añadió acetona, éter de petróleo y diclorometano (30 mL de cada uno); después de centrifugar, se separó la capa orgánica y una alícuota de 20 mL de ésta se evaporó a sequedad y se redisolvió en 10 mL de solución acuosa amortiguada a pH 3. Esta última solución, sin ningún otro paso de limpieza se sometió a inmunoensayo para determinar cuantitativamente el carbamato en estudio. Los autores demostraron que los resultados obtenidos por ELISA correlacionaban bien con los obtenidos por CLAR-fluorescencia, pero en estos últimos era indispensable limpiar el extracto de la muestra por EFS en un cartucho amino previo al análisis cromatográfico.

Las técnicas basadas en cromatografía de inmunoafinidad se han utilizado ampliamente en el área de medicina para determinar varios analitos, sin embargo el uso de anticuerpos inmovilizados en un soporte apropiado para preconcentrar plaguicidas de muestras ambientales es reciente.

Rule *et al.*³⁷ desarrollaron un inmunoabsorbente para carbofurano por anclaje químico de anticuerpos policlonales anticarbofurano en un soporte de sílica aldehído, previamente empacado en una precolumna. La precolumna de inmunoextracción se acopló en línea con una columna analítica de fase reversa para la determinación de trazas de carbofurano en agua de desecho y en extractos de papa. Como sistema de detección se utilizó un

espectrómetro de masas cuadrupolo-trampa de iones con una interfase APCI. El límite de detección de carbofurano en el sistema acoplado inmunoextracción-CLAR-EM fue de 2.5 ng/g para el caso de las muestras de papa.

Son muchos los trabajos que se han realizado para el análisis de carbamatos en muestras complejas como los alimentos, sin embargo, muchos de ellos utilizan equipos muy especializados y/o caros, a los cuales difícilmente pueden tener acceso la mayoría de los laboratorios analíticos en México. Adicionalmente, los métodos propuestos para la determinación de estos plaguicidas en matrices biológicas se han limitado al caso de frutas y legumbres y poco se ha reportado en lo que concierne a otro tipo de muestras como el tejido animal o humano.

Como ya se mencionó anteriormente, existe gran preocupación entre el personal médico de centros de salud localizados en algunas regiones agrícolas del país, por la elevada incidencia de cáncer cérvico-uterino en mujeres jóvenes, principalmente campesinas. En estas regiones se emplean abundantemente diversos productos plaguicidas destacando las formulaciones con carbofurano. La continua exposición de la población al contacto directo con dichos productos está sin duda relacionada con los problemas de salud observados. Sin embargo, no existe ningún programa para monitorear los cuerpos de agua que utiliza la población y determinar el grado de contaminación por plaguicidas en éstos. Menos aún se tienen los medios, a nivel local, para detectar la posible introducción de algunos plaguicidas en el organismo de las personas expuestas, puesto que este tipo de análisis son sumamente complicados.

Por estas razones, nuestro grupo de investigación ha estado interesado, desde hace varios años, en el problema de la determinación de carbofurano al nivel de trazas en muestras complejas. Se ha buscado desarrollar un método eficaz que sólo requiera instrumentación fácilmente accesible en los laboratorios analíticos (como CLAR-UV). En un trabajo anterior, se desarrolló un método por EFS-CLAR para determinar carbofurano y su metabolito 7-fenolcarbofurano en pequeñas biopsias de tejido cervical fortificadas; aunque se alcanzó una alta sensibilidad, no fue posible eliminar completamente las interferencias provenientes de la matriz y por lo tanto no fue posible determinar confiablemente al carbofurano^{32,38}. Posteriormente, se decidió ensayar la inmunoextracción, para lo cual fue necesario sintetizar el inmunoadsorbente. Como primera parte de la investigación se procedió a buscar proveedores de anticuerpos y realizar ensayos preliminares de encapsulamiento³³. En ese trabajo se probaron cuatro diferentes anticuerpos monoclonales anticarbofurano y un lote de anticuerpos policlonales, resultando que la molécula más viables para los fines deseados era el anticuerpo monoclonal LIB-BFNB-67. Este anticuerpo mostró una alta afinidad por el analito de interés y una menor fragilidad comparado con las demás moléculas probadas. Aún así, la pérdida de actividad durante el encapsulamiento

sol-gel, realizado según los procedimientos que se habían desarrollado y optimizado en el laboratorio para otros anticuerpos, resultó excesiva (>90%). La segunda parte de la investigación, de la que forma parte el presente trabajo, pretende lograr la preservación de una fracción mucho mayor de la actividad nativa del anticuerpo durante el proceso sol-gel y la aplicación del inmunoabsorbente resultante en el desarrollo de métodos analíticos efectivos para la determinación de trazas de carbofurano en muestras ambientales, incluyendo tejido biológico.

IV. OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GENERAL

Acoplar la selectividad propia de la inmunoextracción y la sensibilidad proporcionada por un sistema de preconcentración y análisis cromatográfico en línea, para el desarrollo de un método analítico altamente confiable, que permita determinar carbofurano al nivel de trazas en extractos de tejido biológico (biopsias de tejido epitelial cérvico-uterino).

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Preparar materiales sol-gel dopados con un anticuerpo anti-carbofurano y materiales idénticos no dopados (blanco de referencia). Optimizar algunas condiciones de la técnica de encapsulamiento para preservar en mayor medida la actividad de la biomolécula.
2. Determinar la actividad del anticuerpo utilizado LIB-BFNB-67 tanto en disolución como encapsulado.
3. Establecer las condiciones experimentales adecuadas para la extracción, lavado y elución del carbofurano en los cartuchos empacados con inmunoadsorbente.
4. Determinar la estabilidad y durabilidad de los inmunoadsorbentes sintetizados.
5. Aplicar el inmunoadsorbente para la recuperación cuantitativa de carbofurano a partir de extractos de tejido biológico.
6. Optimizar las condiciones de limpieza de la muestra, una vez cargada en la precolumna de concentración, para su posterior análisis en línea.

V. PARTE EXPERIMENTAL

5.1 EQUIPO Y MATERIAL

Equipo

- Bomba cuaternaria para cromatografía de líquidos, Polymer Laboratories modelo LC-1150
- Inyector Rheodyne 7125 con bucle de 26 μL
- Desgasificador Phenomenex modelo DG-4400
- Integrador y graficador Hewlett-Packard Modelo 3396 A
- Detector de UV de longitud de onda variable, Spectromonitor 5000 (Thermo Separation Products)
- Sistema de adquisición y tratamiento de datos cromatográficos constituido por: Computadora Dell Intel Pentium 4, software Eurochrom for Windows Basic Edition V3.05 e interfase Knauer.
- Sistema purificador y desionizador de agua NANOPURE, Barnstead Thermolyne Modelo 04747
- Baño de ultrasonido Sonicor Modelo SC-100
- Potenciómetro Corning Modelo 220 con electrodo combinado de vidrio calomel Cole-Parmer Modelo 60648
- Balanza Analítica Ohaus
- Sistema de empaado de columnas y precolumnas a alta presión Haskel Modelo 29426
- Agitador mecánico marca Burrel modelo 75
- Bombas isocráticas Eldex modelo CC-30-S y CC-100-S
- Bomba isocrática Beckman 1108

Material

- Tubos centricon YM-30, Amicon Bioseparations, Millipore
- Frascos de vidrio transparente con tapa de plástico (capacidad 20mL)
- Equipo de filtración de vidrio Millipore Modelo OM027
- Membranas de filtración de 47 mm de diámetro, con poro de 0.45 μm , Phenomenex AFO-0504
- Jeringas de plástico con capacidad de 3 mL
- Jeringa de 100 μL para cromatografía de líquidos, Hamilton 80665
- Columna analítica (150 x 4.6 mm, D.I.) empacada con fase reversa Hypersil ODS de 5 μm (Thermo Electron Corporation)
- Precolumna de concentración (20 x 2 mm D.I.), empacada en el laboratorio con fase reversa polimérica PLRP-S de 10-15 μm (proveedor Polymer Laboratories).

5.2 REACTIVOS Y DISOLVENTES

- Hidróxido de sodio en lentejas Grado Reactivo, J. T. Baker
- Cloruro de sodio Grado Reactivo, J. T. Baker
- Cloruro de potasio Grado Reactivo, J. T. Baker
- Fosfato de sodio dibásico, 12-Hidrato, Grado Reactivo, J. T. Baker
- Fosfato de sodio monobásico, Grado Reactivo, J. T. Baker
- Carbofurano (2,3-dihidro-2,2-dimetil-7-benzofuranil-N-metilcarbamato) 99% (Chem Service)
- Hidróxido de amonio 28-30%, J. T. Baker
- Tetraetoxisilano 99% (TEOS) Fluka
- Acetonitrilo Grado HPLC, Prolabo
- Metanol Grado HPLC, Fisher Scientific
- Acido clorhídrico 37% J. T. Baker

Disoluciones preparadas

- Disoluciones salinas amortiguadora de fosfatos (PBS) pH 7, 0.2 M, 0.1 M y 0.02 M
- Disolución estándar de carbofurano 500 µg/mL, en ACN
- Disolución estándar de carbofurano 10 µg/mL, en ACN
- Disolución estándar de carbofurano 2 y 4 µg/mL, en H₂O
- Disolución de NH₄OH pH 11 0.01 M
- Disolución de anticuerpo en PBS 0.02 M (1 mg/mL)

Biomolécula

- Anticuerpo anti-carbofurano LIB-BFNB-67

5.3 PREPARACIÓN DE MUESTRAS

Los tejidos de epitelio cervical se conservaron a -20 °C hasta su análisis. Estas muestras fueron proporcionadas por el Hospital General de Subzona No. 4 del IMSS, Tecomán, Colima. Las muestras, tanto de tejido blanco (provenientes de personas no expuestas a los plaguicidas), como las de tejido de personas expuestas a los plaguicidas se cortaron en trozos muy pequeños y se pesaron. Posteriormente, cada muestra fue sometida a ultrasonido en metanol durante 45 minutos con el fin de extraer solamente la fracción polar. El disolvente se recuperó cuantitativamente y se redujo por evaporación a temperatura ambiente, casi a sequedad. El residuo se resuspendió en 1 mL de agua-metanol 1:1 (v/v) y se añadió una alícuota de 100 µl de ácido fórmico. La porción soluble

se separó de las partículas sólidas remanentes por filtración; el recipiente que contenía la mezcla se lavó sucesivamente con 1 mL agua-metanol 1:1 (v/v) y 2 mL de agua, pasando todos los lavados a través del mismo filtro. El filtrado fue recuperado en un vial, obteniendo un volumen final de muestra de 4 mL aproximadamente.

5.4 PREPARACIÓN DEL INMUNOADSORBENTE POR EL MÉTODO SOL-GEL

En un frasco de vidrio se adicionan TEOS (2.5 mL), HCl (0.1 mL) y H₂O (0.4 mL). La solución se mezcla agitándola manualmente. El frasco tapado se somete a ultrasonido en un baño de hielo durante 30 minutos. Después de esta etapa la mezcla se coloca en un agitador mecánico a velocidad constante durante tres horas. Transcurrido este tiempo de agitación se adicionan 2 mL de la solución salina amortiguadora de fosfatos (PBS) 0.1 M y el anticuerpo (500 µL) a inmovilizar. La gelificación ocurre en menos de dos minutos. El gel se deja en reposo por 10 minutos. Posteriormente se adiciona PBS 0.02 M hasta cubrir el gel y se deja reposar otros 10 minutos. El gel formado se desprende de las paredes del frasco con una espátula y se corta en pequeñas partículas, las cuales se colocan en un dispositivo de filtración en donde se lava con diferentes disoluciones. El gel se seca a una temperatura de 4 °C hasta perder el 50 % del peso con respecto al peso del gel húmedo inicial. El gel seco se muele, se resuspende en PBS y se deja decantar para retirar las partículas más finas que permanecen flotando en la superficie del líquido. Finalmente el gel se empaqueta en cartuchos de plástico, colocando dos filtros de acero inoxidable, uno en el fondo del cartucho y otro en la parte superior del lecho empacado después de verter la suspensión del gel. Los cartuchos se mantienen en refrigeración (4 °C), con el empaque completamente sumergido en PBS 0.02 M, hasta su empleo en los ensayos (ver figura V.1).

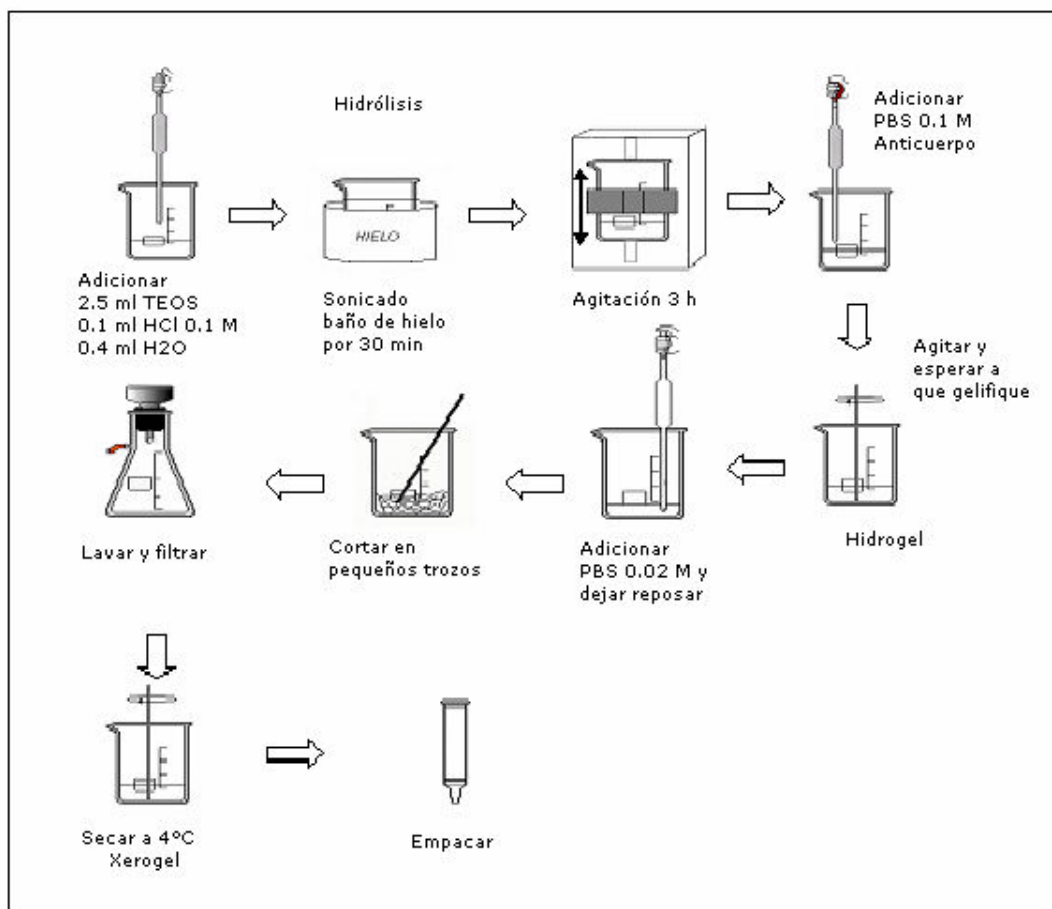


Figura V.1 Proceso de inmovilización por el método sol-gel

5.4.1 Optimización del lavado en el proceso de inmovilización

A medida que se iban realizando ensayos de inmovilización del anticuerpo, se fue refinando el proceso de lavado con el fin de preservar en mayor medida la actividad de la biomolécula durante el proceso de encapsulamiento. Se probaron diferentes disoluciones y volúmenes en la etapa de lavado: mezclas agua-disolvente orgánico en diferentes proporciones, glicerina, PBS y agua desionizada. Las condiciones finalmente establecidas para el lavado fueron:

1. 10 mL PBS 0.02 M
2. 5 mL H₂O
3. 5 mL MeOH-agua 60:40 (v/v)
4. 10 mL Glicerina al 5% en agua
5. 5 mL H₂O
6. 20 mL PBS 0.02 M

5.5 DETERMINACIÓN DE ACTIVIDAD DEL ANTICUERPO MONOCLONAL (MAB) LIB-BFNB-67

Se evaluó la actividad del MAb libre (en solución) mediante un procedimiento reportado en la literatura²¹ con ligeras modificaciones. El procedimiento se basa en la ultrafiltración de soluciones que contienen la biomolécula sola o complejada con el analito de interés, utilizando tubos Centricon YM-30. Estos tubos tienen una membrana de celulosa con un poro muy fino que impide el paso de solutos de tamaño mayor a 30,000 Da.

En dos tubos Centricon se coloca una alícuota de 50 μ L de la disolución del MAb (50 μ g), 1 mL de PBS con 2% (v/v) de ACN y 70 μ L ó 140 μ L de una solución de carbofurano de 1 μ g/mL en PBS. La mezcla se agita ligeramente para homogeneizar y se deja incubar por 15 min a temperatura ambiente. Posteriormente, los tubos se someten a centrifugación a 2500 g por 15 min, con ello la mayor parte del líquido con el carbofurano no complejado disuelto atraviesa la membrana, quedando retenidos en la parte superior del tubo el anticuerpo libre y el complejo MAb-carbofurano formado. El retenido se lava dos veces con 350 μ L de la solución de PBS con 2 % de ACN, y se centrifuga a la misma velocidad por 10 min después de cada lavado. Todos los filtrados, recogidos en la sección inferior del tubo, se transfieren a un vaso de precipitados de 25 mL, se enjuaga varias veces el tubo con agua para recuperar cuantitativamente el carbofurano no retenido por el anticuerpo. La mezcla anterior se carga en la precolumna de fase reversa y ésta se lava haciendo pasar 2 mL de agua-ACN 98:2 (v/v) y 10 mL de agua. Finalmente, se realiza el análisis cromatográfico en línea (descrito en una sección posterior) para determinar la cantidad de carbofurano no retenido por el anticuerpo. El plaguicida complejado se calcula por diferencia con la cantidad adicionada. La actividad del anticuerpo se reporta como ng de carbofurano (retenido) por mg de MAb.

La medida de actividad del anticuerpo encapsulado se realiza por el proceso de inmunoextracción, descrito detalladamente en el siguiente inciso. En este caso se prepara una muestra sintética de carbofurano en 25 mL de PBS 0.02 M con 2% (v/v) de metanol, la cual se somete a un tratamiento similar al aplicado a las muestras de extracto de tejido.

5.6 ESTUDIO DE LA INMUNOEXTRACCIÓN DE CARBOFURANO EN LOS CARTUCHOS CON INMUNOADSORBENTE (IA)

Para generar los sitios de reconocimiento específico en el adsorbente de inmunoextracción se utilizó el anticuerpo monoclonal anti-carbofurano BFNB-67, el cual fue inmovilizado en un soporte de sílice mediante la técnica de encapsulamiento sol-gel desarrollada en trabajos anteriores^{12,13,30}, con algunas modificaciones introducidas en el actual trabajo.

El método analítico que se desarrolló en este trabajo consiste de dos etapas:

- a) Inmunoextracción
- b) Concentración del extracto, limpieza y análisis en línea

Inmunoextracción

La muestra a analizar, previamente preparada para favorecer las interacciones analito-anticuerpo y disminuir la retención no específica de otros compuestos presentes en ella, se percola a través del cartucho de inmunoextracción; el cartucho se lava para eliminar impurezas que hayan podido quedar adsorbidas en el soporte de sílice y finalmente, el carbofurano retenido se eluye con un disolvente capaz de disociar el complejo analito-anticuerpo sin provocar un daño irreversible a la biomolécula. En esta etapa se colectan, tanto, los efluentes del cartucho durante la carga de muestra y el lavado, como el eluato que contiene al carbofurano que fue extraído. Estas fracciones son posteriormente analizadas con el objeto, en el caso de los efluentes, de dar un seguimiento lo más completo posible al proceso (Figura V.2).

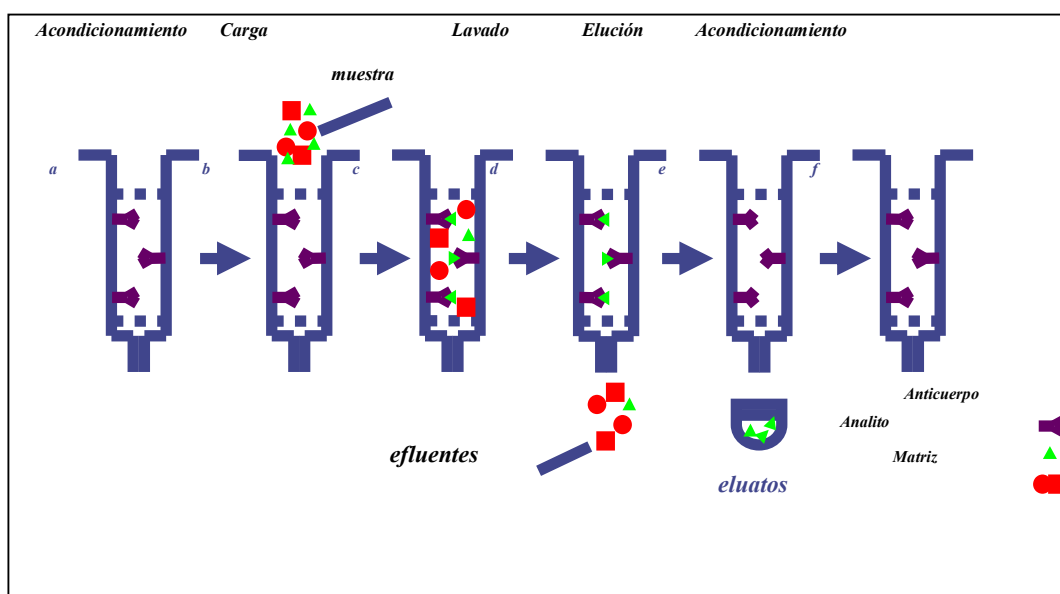


Figura V.2 Etapas de la inmunoextracción.

La figura V.2 muestra la forma convencional en que se realiza un proceso de extracción en fase sólida fuera de línea. En éste, las soluciones son percoladas a través del cartucho por aplicación de una fuerza (p. ej. con el émbolo de la jeringa) o bien, por succión de vacío (se requiere una cámara especial para colocar los cartuchos de EFS y los tubos de colección de fracciones). Debido a que los biomateriales sol-gel no están consolidados, la

aplicación de una fuerza provoca compactación del empaque, aumento de presión y ruptura de las aristas más expuestas de algunas partículas. El problema se agrava paulatinamente pues los polvos finos disgregados migran hacia el filtro inferior ocluyendo sus poros y haciendo necesaria la aplicación de una fuerza cada vez mayor para percolar las disoluciones. Por otra parte, no es posible mantener un flujo continuo y controlado en un cartucho tipo jeringa cuando la solución es empujada por el émbolo.

Por las razones mencionadas, en este trabajo se optó por pasar el flujo en sentido inverso, colocando un adaptador en el vástago de la jeringa y conectándolo a una bomba isocrática. En la parte superior del cartucho se fijó un tubo delgado de teflón para enviar el líquido saliente al recipiente de recolección el cual fue colocado a una altura conveniente respecto al cartucho, para provocar un efecto sifón. El volumen de disolución percolada en cada paso del proceso de inmuoextracción fue controlado utilizando matraces aforados de la capacidad requerida como recipientes de recolección. Con estas modificaciones se pudo evitar la pérdida de permeabilidad del cartucho durante su uso y se tuvo un buen control de la velocidad de flujo y de los volúmenes percolados.

5.6.1 Optimización de la elución

El paso más crítico en el proceso de inmuoextracción fue la elución del carbofurano retenido en el IA, ya que se tenía el compromiso de desadsorber todo el analito sin causar daño a la biomolécula. Primero se probaron eluyentes relativamente suaves, como la mezcla de ácido cítrico a pH 2 con metanol al 10 %. Luego, se ensayaron mezclas de agua con MeOH en diferentes proporciones. Finalmente, la mezcla MeOH-H₂O 64:36 (v/v) mostró ser la más adecuada para cumplir con los objetivos propuestos.

5.6.2 Condiciones finales

Las condiciones experimentales finalmente establecidas para la etapa de inmuoextracción se detallan a continuación:

1. Acondicionamiento del cartucho de IA: 10 mL PBS 0.02 M a pH 7.
2. Carga: 2 mL del extracto de tejido biológico se llevan a un volumen de 25 mL con PBS 0.02 M. Esta solución tiene un contenido de 2 % (v/v) del disolvente orgánico, en este caso metanol.
3. Lavado: 5 mL mezcla MeOH-PBS 4:96 (v/v)
4. Elución: 8 mL mezcla MeOH-agua 64:36 (v/v). El eluato obtenido se diluye con agua hasta un volumen de 50 mL antes de pasar a la etapa de análisis. El contenido de MeOH en la solución diluida es de 10.2 % (v/v).
5. Reacondicionamiento del cartucho: 10 mL agua pura y 15 mL PBS 0.02 M, y se almacena en el refrigerador a 4 °C.

5.7 CONCENTRACIÓN, LIMPIEZA Y ANÁLISIS EN LÍNEA

En esta etapa se utilizó el montaje mostrado en la figura 5.3. La parte fundamental para el acoplamiento en línea es una válvula de conmutación de 6 puertos colocada entre el inyector y la columna analítica del cromatógrafo de líquidos. A esta válvula se conectaron una bomba isocrática auxiliar, la precolumna y una salida de desechos. La fracción colectada en la etapa de inmunoestracción (efluentes o eluato previamente diluido con agua) se cargó en la precolumna mediante la bomba auxiliar. Luego se hicieron pasar diferentes soluciones de lavado y, finalmente, la válvula se rotó a la posición de inyección (ver Figura V.3 (b)). En esta posición, la fase móvil enviada por la bomba del cromatógrafo eluye los compuestos retenidos en la precolumna transfiriéndolos directamente a la columna para su separación y análisis.

Al terminar la corrida cromatográfica de la fracción en estudio, se inyectó un estándar de carbofurano como referencia para la cuantificación. En este paso la precolumna se mantuvo en línea con la columna analítica (posición b de la válvula de conmutación) para tener condiciones similares en el análisis de la muestra y del estándar. La cuantificación se hizo por comparación de áreas de pico.

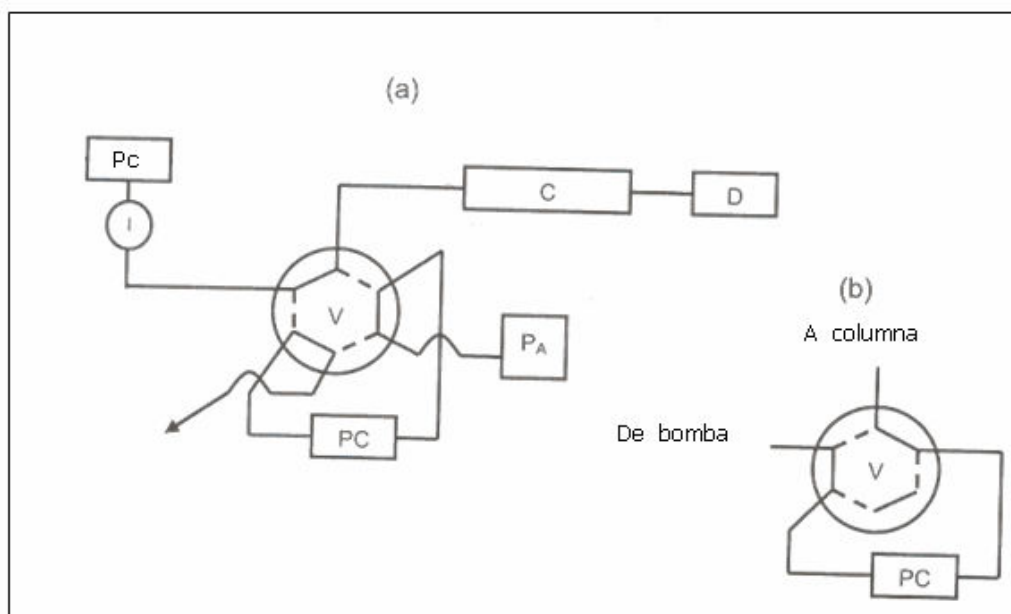


Figura V.3 Esquema del sistema en línea EFS-CL.

Pc: bomba del cromatógrafo, I: Inyector, V: válvula de conmutación. P_A: bomba auxiliar, PC: precolumna, C: columna analítica, D: detector UV. El esquema (a) muestra el sistema en la posición de carga de la precolumna y el esquema (b) muestra el camino que sigue la fase móvil en la posición inyección de la válvula de conmutación.

Finalmente, todo el sistema se lavó y acondicionó para el siguiente análisis. Con la válvula de conmutación en la posición (a) y utilizando ambas bombas, se pasó acetonitrilo puro a través de la precolumna y la columna. El lavado por separado evita que impurezas de la matriz de la muestra que hayan quedado retenidas en la precolumna, sean desadsorbidas por el acetonitrilo y se transfieran a la columna, donde podrían quedar atrapadas y acumularse. Después del lavado, la precolumna se acondiciona con agua pura (15 mL enviados por la bomba auxiliar) y la columna se equilibra con la fase móvil (15-20 mL, proveniente de la bomba del cromatógrafo).

5.7.1 Comprobación de la ausencia de fuga en la precolumna durante la carga

Las disoluciones ensayadas para eluir el carbofurano del cartucho de inmunoextracción contenían diversas proporciones de metanol. Puesto que estas soluciones debían ser posteriormente cargadas en la precolumna para la concentración y análisis en línea del plaguicida, fue necesario verificar que no ocurrieran pérdidas de éste durante la carga. En efecto, el volumen de fuga de un analito en una precolumna de fase reversa es fuertemente dependiente del contenido de disolvente orgánico en la solución de carga.

Se prepararon disoluciones acuosas de ácido cítrico 0.01 M con 10 % de MeOH y se doparon con carbofurano. La concentración de este último se ajustó de modo que el volumen cargado en la precolumna (25 y 50 mL) contuviera la misma cantidad de carbofurano (100 ng). Después de la carga, la precolumna se lavó y se eluyó en línea. La cantidad de carbofurano recuperada se determinó por comparación de áreas de pico con un estándar inyectado.

Las mezclas MeOH-H₂O, que también fueron ensayadas para la elución en el inmunoadsorbente tenían un contenido demasiado elevado de disolvente orgánico. Por ello fue necesario buscar el grado de dilución adecuado, de modo que el contenido de metanol y el volumen resultante de la solución diluida no dieran lugar a la pérdida de analito durante la carga de la precolumna. Estos ensayos se realizaron de manera similar a lo anteriormente descrito.

5.7.2 Optimización del paso de limpieza de muestra

Los primeros cromatogramas obtenidos al analizar extractos de tejido fortificados con carbofurano mostraron que se requerían pasos adicionales de limpieza, ya que la señal de la matriz era tan grande que no permitía detectar al analito de interés. Por lo tanto, se realizaron ensayos de extracción en geles blanco (geles sin anticuerpo) siguiendo la metodología descrita en la sección de inmunoextracción. El eluato obtenido se cargó en la precolumna y se probaron diferentes disoluciones de lavado buscando eliminar al máximo

las interferencias de matriz sin que ocurriera la fuga del analito. Se ensayaron diferentes volúmenes de mezclas agua-ACN en varias proporciones, así como soluciones básicas. La apariencia del cromatograma obtenido, la observación de la región cercana al pico del carbofurano y la cuantificación de éste, sirvieron de guía para establecer la composición y volúmenes de lavado más apropiados.

5.7.3 Condiciones finales para la preconcentración, limpieza de muestra y análisis en línea

Carga. La fracción a estudiar (efluentes directamente obtenidos del cartucho de inmunoextracción, o el eluato diluido hasta 50 mL con agua) se carga en una precolumna (20 x 2 mm D.I.) empacada con fase reversa polimérica (PLRP-S) a flujo de 1 mL/min.

Lavados. La precolumna se lava sucesivamente con los siguientes disolventes a flujo de 1 mL/min:

1. 5 mL ACN-H₂O 5:95 (v/v)
2. 2 mL NH₄OH 0.01 M, pH 11
3. 5 mL de agua

Condiciones cromatográficas:

- Columna (150 x 4.6 mm D.I) empacada con fase reversa Hypersil ODS de 5 µm
- Fase móvil: acetonitrilo-agua 21:79 (v/v)
- Flujo: 1 mL/min
- Detección UV a 280 nm

En la tabla V.1 se resumen las operaciones realizadas en esta etapa, indicando las soluciones que se hacen pasar por la columna y la precolumna, las posiciones de las válvulas y el estado de las bombas.

Tabla V.1 Operación del sistema en la etapa de preconcentración, limpieza y análisis en línea

Operación	Soluciones (volumen, mL)	Inyector	Válvula de conmutación	Bomba auxiliar	Bombar CLAR
1) Acondicionar precolumna	Agua (15)	C	a	+	+
1') Equilibrar columna	Fase móvil (15)				
2) Cargar muestra	Efluentes (30) o eluato (50)	C	a	+	-
3) Limpieza de muestra	ACN-H ₂ O 5:95 (5) + NH ₄ OH 0.01 M, pH 11 (2) + agua (5)	C	a	+	+
3') Restablecer flujo en columna	Fase móvil				
4) Análisis de muestra	Fase móvil	C	b	-	+
5) Análisis estándar	Fase móvil	I	b	-	+
6) Lavado columna	ACN	I	a	+	+
6') Lavado precolumna	ACN				

Inyector: (C) posición de carga, (I) posición de inyección

Válvula de conmutación: (a) no acoplada a columna, (b) acoplada a la columna

Bombas: (+) en marcha, (-) parada

Las operaciones (1) y (1'), (3) y (3'), (6) y (6'), se realizan simultáneamente.

VI. RESULTADOS

A pesar de los avances en el desarrollo de instrumentación analítica altamente sensible y selectiva, en el caso de la determinación de contaminantes orgánicos en muestras ambientales o biológicas, un pretratamiento de la muestra es casi siempre necesario para extraer, aislar y concentrar los analitos de interés, que se encuentran al nivel de trazas en esas muestras complejas.

En los últimos años, la extracción en fase sólida ha sustituido a métodos tradicionales que involucran una serie de operaciones eminentemente manuales como extracciones líquido-líquido, evaporación de disolvente, formación eventual de derivados, entre otros y que por lo tanto requieren de un tiempo de análisis muy largo y una continua manipulación de la muestra.

Una variante de la EFS, conocida como inmunoextracción, se basa en el empleo de los inmunoabsorbentes, los cuales, como ya se comentó en el capítulo de Antecedentes, son fases muy selectivas con anticuerpos inmovilizados en un soporte sólido. Por sus características, la inmunoextracción es actualmente el método de elección para la preparación de muestras complejas en las que se desea determinar un analito único o unos pocos analitos estructuralmente relacionados.

Considerando lo anterior, el objetivo de este trabajo fue desarrollar un método para la determinación selectiva de carbofurano en extractos de tejido biológico por inmunoextracción acoplada a la cromatografía de líquidos.

6.1 PREPARACIÓN DEL INMUNOADSORBENTE POR EL MÉTODO SOL-GEL

Como ya se describió en la parte experimental, la inmovilización del MAb anti-carbofurano BFNB-67 en un soporte de sílice se llevó a cabo por el método sol-gel, utilizando tetraetoxisilano (TEOS) como precursor y catálisis ácida. La cantidad de anticuerpo utilizado para la preparación de estos inmunoabsorbentes fue de 500 µg, mientras que las proporciones del precursor (2.5 mL), agua (0.4 mL) y catalizador (0.1 mL) se tomaron de trabajos anteriores.

El proceso sol-gel consta de varias etapas como son:

- 1) Mezclado
- 2) Hidrólisis-condensación
- 3) Gelificación
- 4) Maduración

- 5) Secado
- 6) Secado Intensivo
- 7) Densificación

Para el encapsulamiento de biomoléculas, como los anticuerpos, sólo se toman en cuenta las primeras 5 etapas, ya que las dos restantes se realizan a alta temperatura y conllevan a la evaporación total del agua, lo que originaría la pérdida de actividad del anticuerpo.

Las condiciones experimentales utilizadas en el proceso de inmovilización permitieron obtener un gel suficientemente rígido, con porosidad adecuada y eficiente en el encapsulamiento del anticuerpo, esto es, conservando la actividad de la biomolécula. En efecto, la molécula queda permanentemente atrapada en los poros del gel, por lo que no se presenta fuga de ésta ni durante los lavados del material preparado, ni durante su uso posterior en ciclos repetidos de IE.

Cabe mencionar que el recipiente donde se efectúa la reacción debe ser de un material de vidrio de buena calidad, con paredes internas bien lisas y perfectamente limpio, de lo contrario, las propiedades del gel finalmente obtenido son afectadas.

Para llevar a cabo un buen mezclado del TEOS y la fase acuosa la solución se puso en ultrasonido por media hora, generándose en esta etapa suficiente alcohol (cosolvente) para permitir que continúen las reacciones de hidrólisis y condensación. Sin embargo, debido a que las reacciones por sí solas proceden muy lentamente, la mezcla se puso en agitación mecánica durante tres horas ya que era la única manera de lograr que ambas fases estuvieran en contacto íntimo y se pudiera acortar el tiempo requerido para la hidrólisis del precursor. Durante el periodo de agitación, a la mezcla se le supervisa su consistencia, homogeneidad y olor. Cuando estos parámetros son adecuados, es decir cuando se obtiene una solución ligeramente viscosa, sin olor a TEOS y homogénea, se procede a añadir el amortiguador.

En los ensayos iniciales de encapsulamiento del MAb se utilizaba PBS 0.2 M pH 7 (2 mL) después de la agitación mecánica, para desestabilizar el sistema coloidal, neutralizar el medio ácido y por lo tanto proveer un medio favorable para el anticuerpo, el cual se agregaba inmediatamente después. Esta concentración de PBS se cambió a 0.1 M posteriormente debido a que en uno de los ensayos se observó un precipitado blanco al agregar la biomolécula. Este fenómeno se atribuyó a que la concentración del PBS, y por lo tanto la fuerza iónica, eran demasiado altas lo que originaba una gelificación tan rápida que no permitía al anticuerpo repartirse homogéneamente dentro de la red del gel.

Este cambio dio resultados favorables para los siguientes inmunoabsorbentes, por lo que se quedó como condición final. Todos los geles que se obtuvieron después, fueron de aspecto cristalino, transparentes y duros. Es necesario señalar que el anticuerpo debe agregarse inmediatamente después del PBS, agitando vigorosamente la solución para que se reparta homogéneamente y que quede perfectamente encapsulado. Esto es debido a que el tiempo de gelificación, es decir, el tiempo en el que la viscosidad del sol aumenta para formar un gel insoluble, es entre 1 y 2 minutos aproximadamente.

Los geles sintetizados se lavaron y secaron como se indica en la parte experimental. El secado lento a una temperatura de 4 °C y hasta la pérdida del 50 % de su peso original permite evitar un excesivo encogimiento del material, y un fuerte colapso de los poros que podría dañar al anticuerpo. En trabajos anteriores se observó que si el gel se empaqueta sin secar, la permeabilidad de los cartuchos disminuye considerablemente con su uso, hasta que resulta imposible percolar la muestra. Esto indica que la etapa de secado, durante la cual el gel madura y el esqueleto sólido se refuerza y consolida, es indispensable para obtener un material con mejores propiedades mecánicas. De hecho, la experiencia ha mostrado que los cartuchos empacados con geles previamente secados permiten realizar un mayor número de ciclos de EFS sin que aumente demasiado la caída de presión. Aunque la resistencia de los geles aumenta con el grado de secado, este parámetro debe ser estrictamente controlado para preservar la actividad del anticuerpo y, de acuerdo a lo observado, no debe sobrepasar el 50 % de pérdida de peso. El tiempo y la uniformidad de secado de las partículas del gel fragmentado son también parámetros importantes que se reflejan en la actividad final del material.

El tiempo de secado de los primeros geles preparados fue muy variable. Para controlar mejor este parámetro se cubrió el recipiente que contenía el gel húmedo con una tela de malla abierta (tul), para hacer más lenta la disipación de humedad en el refrigerador. Además, diariamente se revolvió las partículas de gel con una espátula para evitar un secado más intenso de los fragmentos que quedaban en la capa superficial. Con estas precauciones el tiempo de secado fue más constante (5-6 días).

Bajo las condiciones finalmente establecidas para todo el proceso sol-gel, se obtuvieron entre 2 y 2.5 g de producto seco en un tiempo de preparación de 6 a 7 días (desde la mezcla de reacción inicial hasta la obtención del gel seco). Los cartuchos empacados con estos inmunoabsorbentes, preparados en diferentes fechas, presentaron un comportamiento de retención similar y dieron resultados satisfactorios.

6.1.1 Optimización del lavado en el proceso de inmovilización

El lavado del hidrogel recién formado tuvo por objeto eliminar el etanol y los posibles rastros de alcóxido sin reaccionar. El TEOS no es soluble en soluciones acuosas, por lo que se tuvo que utilizar una mezcla de metanol-agua, rica en disolvente orgánico, para la completa eliminación de ese agente nocivo para las biomoléculas. Sin embargo, los medios alcohólicos tampoco son favorables y tienden a provocar el desplegamiento de la proteína. Por ello, se incluyó un lavado con solución diluida de glicerina en agua, la cual propicia el plegamiento del anticuerpo ayudándolo a preservar su estructura terciaria. La viscosidad de las soluciones de glicerol, aunada a la capacidad de esta sustancia para formar puentes de hidrógeno, provocan una reestructuración de la capa de solvatación que rodea a la biomolécula resultando en el efecto benéfico ya mencionado. Posteriormente, se realizó un lavado con agua para desalojar residuos de disolventes orgánicos que podrían provocar, en el siguiente paso, la precipitación de sales de fosfato. Finalmente, el gel se lavó con PBS 0.02 M, pH 7, para asegurar que el anticuerpo encapsulado tuviera las condiciones óptimas de pH y fuerza iónica, que mantienen estabilizada su conformación nativa.

Cabe mencionar que las pruebas de lavado se hicieron en un gel blanco y ya optimizadas las condiciones se aplicaron a los geles con anticuerpo; esto se hizo para no poner en riesgo la actividad del IA.

6.2 DETERMINACIÓN DE ACTIVIDAD DEL ANTICUERPO MONOCLONAL (MAB) LIB-BFNB-67

Uno de los parámetros que sirvió de referencia para evaluar el comportamiento del anticuerpo monoclonal, tanto en solución como encapsulado, fue la determinación de la capacidad de enlazamiento del analito-antígeno (carbofurano).

La reacción del antígeno con el anticuerpo se realizó en condiciones parecidas a las fisiológicas: pH 7 a 7.4 y concentración salina equivalente a NaCl 0.15 M. Sin embargo, se trabajó a temperatura ambiente y además, se añadió una pequeña fracción de disolvente orgánico a las soluciones (2 %) para minimizar la interacción no específica del carbofurano con las paredes y membrana del tubo centricon (prueba con el MAb libre) o con el soporte de sílice del IA.

Bajo estas condiciones, la determinación de actividad se efectuó ya sea por ultrafiltración o por el proceso de inmuoextracción. Los anticuerpos en solución son termodinámicamente poco estables y sólo pueden ser utilizados una vez. En cambio, si se inmovilizan su

estabilidad se prolonga por más tiempo y es posible reutilizarlos ampliando sus perspectivas de aplicación.

Los resultados de la determinación de actividad de los anticuerpos, tanto en solución como encapsulados (en este caso nos referimos a la actividad inicial de los cartuchos) se presentan en las tablas VI.1 y VI.2

Tabla VI.1 Actividad del anticuerpo anti-carbofurano LIB-BFNB-67 en solución

Cantidad de MAb ($\mu\text{g-nmol}$)	Cbf* adicionado (ng-nmol)	Cbf complejoado (ng-nmol)	Capacidad relativa ($\text{ng/mg}^+ - \text{mol/mol}^{**}$)
50 - 0.333	70 - 0.316	53.2 - 0.240	1064 - 0.72
50 - 0.333	140 - 0.633	67.9 - 0.307	1358 - 0.92

*Cbf = carbofurano, ⁺ ng de carbofurano por mg de MAb, ^{**} mol de carbofurano por mol de MAb; P.M. Cbf = 221.26 g/mol, P.M. MAb = 150,000 g/mol

Las cantidades de MAb y carbofurano utilizadas para evaluar la actividad del anticuerpo libre (Tabla VI.1), fueron cercanas a las relaciones molares 1:1 y 1:2, asumiendo un peso molecular de 150,000 g/mol para el MAb. La capacidad relativa determinada, expresada en mol/mol, fue cercana a uno, lo que indicaría que casi toda la fracción inmunoglobulínica utilizada correspondía a anticuerpo anticarbofurano activo, si se considera un solo sitio de unión por molécula de MAb. Teóricamente una IgG presenta dos sitios de unión con su antígeno por lo que, bajo esta consideración, solo ~50% del anticuerpo estaría activo. No obstante, como la ocupación de un sitio activo en una molécula de IgG debilita la energía de interacción del segundo sitio, no es posible saber con certeza, a partir de las pruebas realizadas, el porcentaje de anticuerpo efectivamente activo. Desafortunadamente, no se realizó una prueba en presencia de un gran exceso de carbofurano para promover la ocupación del sitio de menor energía.

Para los propósitos de este trabajo los resultados de la Tabla VI.1 son suficientes y muy útiles, pues sirven como referencia para evaluar el grado de preservación de actividad del anticuerpo durante el encapsulamiento. Esta evaluación, a su vez, nos sirvió de guía para ir mejorando progresivamente las condiciones del proceso sol-gel, como se muestra en la Tabla VI.2.

Tabla VI.2. Comparación de actividad inicial de los inmunoabsorbentes preparados en diferentes fechas. (Orden cronológico progresivo).

IA con MAb LIB-BFNB-67	1	2	3	4	5	6
Capacidad relativa (ng/mg)	74	30	240	220	558	584
Porcentaje de actividad preservada*	7.0	2.8	22.6	20.7	52.4	54.9

* Referencia: capacidad relativa del anticuerpo libre 1064 ng/mg

En el caso de los inmunoabsorbentes, la solución de carbofurano se percola a través del lecho empacado. El analito difunde por los canales y poros de la estructura de sílice y eventualmente entra a un poro con anticuerpo activo, cuyos sitios no han sido aún ocupados, quedando retenido. La cantidad de anticuerpo presente en cada cartucho fue de 500 µg (esto comprende al MAb que quedó activo y al que se desnaturalizó durante el proceso de encapsulamiento). Para la prueba de actividad se percolaron en total 300 ng de carbofurano en 25 mL de PBS al 2 % (v/v) de metanol. Esta cantidad de analito fue cercana a lo retenido en el caso de los inmunoabsorbentes 5 y 6 (279 y 292 ng). Por lo tanto, el antígeno no estuvo en exceso notable con respecto al anticuerpo que aparentemente quedó activo en estos ensayos. Por esta razón se optó por tomar como referencia de actividad del anticuerpo libre el valor de 1064 ng/mg (Tabla VI.1), que corresponde a condiciones similares (es decir, cantidad de antígeno adicionado cercana a la cantidad retenida).

Como se observa, conforme se iban modificando algunas de las condiciones en el proceso de encapsulamiento, se obtenían IAs con mayor capacidad de retención. Cabe señalar que para el IA 2, se observó la formación de un precipitado blanco al momento de encapsular el MAb, lo que probablemente ocasionó la elevada pérdida de actividad detectada. Por ello, se decidió no trabajar con este gel.

Durante este trabajo, el anticuerpo monoclonal LIB-BFNB-67 inicialmente adquirido se terminó y fue necesario utilizar diferentes lotes. Afortunadamente estos lotes se comportaron de manera similar en cuanto a actividad del anticuerpo libre en solución. Este hecho es importante ya que una de las mayores preocupaciones cuando se trabaja con anticuerpos es la falta de reproducibilidad de lote a lote. Las diferencias de actividad inicial y de durabilidad entre los IAs fueron debidas a que en cada uno se probaron condiciones diferentes (Tabla VI.3).

Tabla VI.3. Características del proceso sol-gel en la preparación de IAs.

Inmunoadsorbente	Tiempo de hidrólisis (h) *	Tiempo de gelificación (min)	Tiempo de secado (días)
1	3	3	9
3	3	2	6
4	4	< 1	6
5	4	< 1	5
6	4	< 1	5

* Este tiempo no incluye los 30 minutos de sonicación inicial de la mezcla.

La pérdida de actividad de los IAs durante su uso se atribuye principalmente a las soluciones de elución utilizadas ya que, para disociar el complejo antígeno-anticuerpo, éstas inducen cambios en la conformación de la biomolécula, la cual no se recupera al 100 % cuando el cartucho se lava con agua y se regenera con PBS.

En la Figura VI.1 se muestra la gráfica que representa la estabilidad del último IA preparado. Sólo se presentan los resultados del último ya que fue el que más tiempo duró y con el que se aplicaron las condiciones finales de cada parte del presente estudio (síntesis e inmunoeextracción). Se hace notar que, entre cada par de medidas de actividad, el cartucho se estuvo utilizando en varios ciclos de IE. En la figura VI.2 se ilustra la pérdida de actividad en función del uso del cartucho.

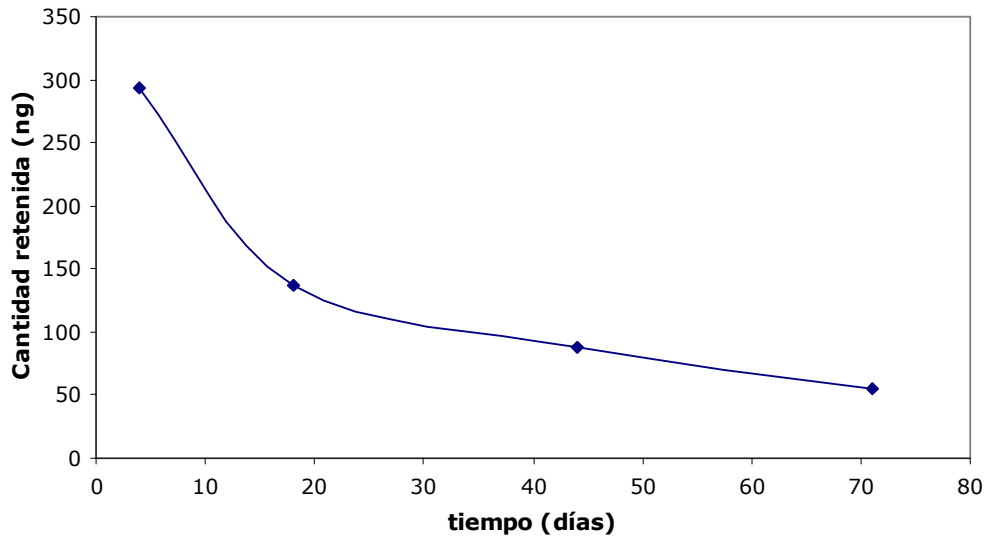


Figura VI.1. Estabilidad en función del tiempo para el último IA dopado con 500 μg de anti-carbofurano.

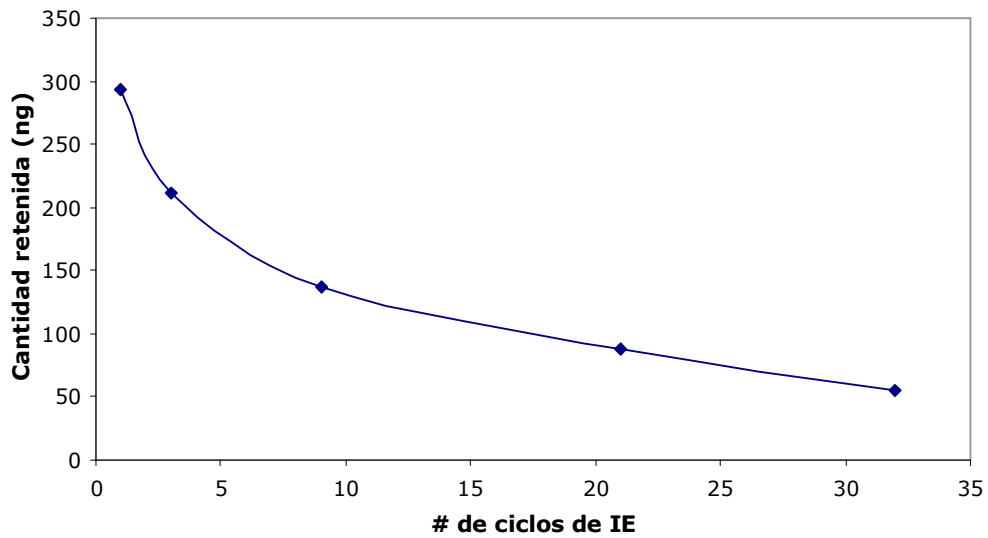


Figura VI.2. Estabilidad en función del número de ciclos de IE para el último IA dopado con 500 μg de anti-carbofurano.

6.3 ESTUDIO DE LA INMUNOEXTRACCIÓN DE CARBOFURANO EN LOS CARTUCHOS CON INMUNOADSORBENTE

En el acondicionamiento, carga y lavado del proceso de inmunoextracción se utilizó PBS 0.02 M, ya que en estudios anteriores se observó que a concentraciones de amortiguador entre 0.01 y 0.15 M, la retención del antígeno para formar el complejo con su respectivo anticuerpo es máxima y permanece constante¹². Los anticuerpos requieren condiciones similares a las de su medio natural (pH cercano a 7 y fuerza iónica elevada) para desplegar su actividad biológica.

Debido a la limitada disponibilidad de la muestra, los ensayos que se realizaron para la optimización de condiciones y para el tratamiento estadístico fueron con 2 mL de extracto en la solución de carga, en lugar de utilizar un extracto completo (4 mL) para cada experimento. Es importante mencionar que, al utilizar un extracto de tejido blanco dopado con carbofurano en el proceso de inmunoextracción, se observó una disminución en la capacidad de retención del IA, comparada con lo obtenido usando muestras sintéticas (con sólo agua, amortiguador y 2 % de MeOH). Es evidente que, a pesar de la proclamada selectividad de los MAbs, cuando se tratan muestras complejas que contienen una gran cantidad y variedad de compuestos, algunos de éstos pueden bloquear los sitios activos o inducir cambios conformacionales en la biomolécula, provocando la disminución de los sitios de interacción disponibles para el analito-antígeno.

Durante la etapa de carga de la muestra ocurre un proceso conocido como análisis frontal. A medida que la muestra es percolada por el IA, el analito disuelto va ocupando los sitios de adsorción disponibles. Las moléculas que no encuentran un sitio libre continúan avanzando a lo largo del lecho empacado, generándose así un frente de migración del soluto, el cual se dispersa o ensancha a medida que avanza. En el caso de los IAs, la velocidad de migración del frente depende fundamentalmente de la cantidad de sitios de adsorción. Cuando el frente emerge del cartucho tiene una forma sigmoideal que se caracteriza por tres puntos: el punto de fuga (V_f), que corresponde al volumen en el cual el soluto comienza a emerger del cartucho; el punto estequiométrico (V_e), indicador del número de sitios activos de adsorción que existen en el IA; y por último el punto de saturación (V_s) que corresponde a un volumen de muestra después del cual ya no se retiene soluto en el IA porque todos los sitios activos están ocupados (ver Fig. VI.3).

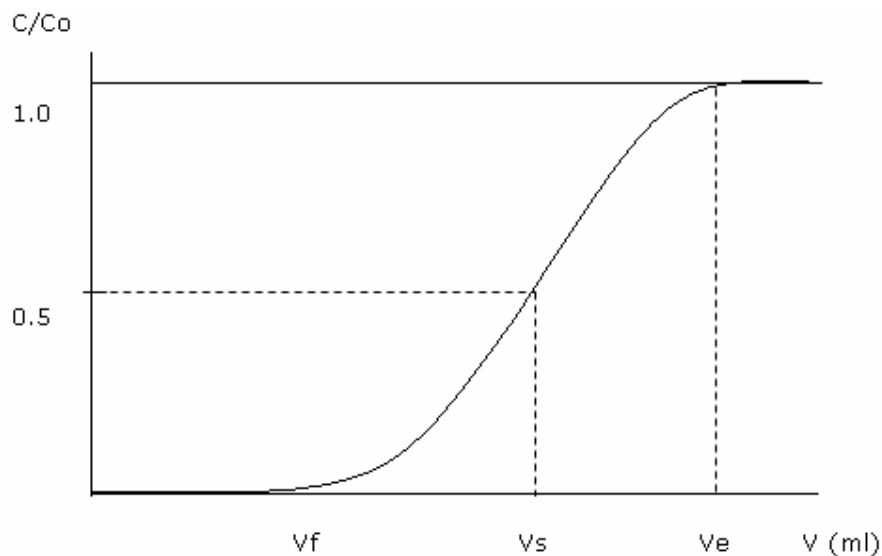


Figura VI.3 Análisis Frontal

En este trabajo no se trazaron los frentes de migración del analito durante la carga porque hubiera sido necesario percolar una solución mucho más concentrada del analito (del orden de $\mu\text{g/mL}$) para poder detectar el frente. Además si consideramos que el volumen de fuga depende de la concentración del compuesto en el influente, es obvio que este método no es representativo de una muestra real en la cual se esperan muy bajas concentraciones del carbofurano (ng/mL)

El lavado tiene como función tanto eliminar compuestos residuales de la matriz de la muestra, como iones inorgánicos provenientes del PBS de la solución de carga que hayan quedado adsorbidos no específicamente en la superficie del soporte o en alguna parte del anticuerpo que no sea el sitio activo. Es importante mencionar que el lavado debe eluir estos compuestos sin provocar la disociación del complejo formado por el anticuerpo y el antígeno. Otra función del lavado es evitar que las sales de fosfato precipiten debido al disolvente orgánico en el eluyente, ya que estos precipitados pueden provocar que los filtros que retienen el empaque se tapen ocasionando pérdida de permeabilidad.

En esta etapa se probaron mezclas MeOH-agua (5 mL) desde 15 hasta 35 % de disolvente orgánico con el fin de obtener, en el paso siguiente, un eluato más limpio y por lo tanto cromatogramas con menos interferencias; sin embargo, las diferencias entre los cromatogramas no fueron notorias. Un punto importante fue que, a pesar del alto porcentaje de metanol, no se produjo fuga del carbofurano utilizando soluciones de lavado con una concentración menor al 35 % de disolvente orgánico. Por otra parte, se decidió

incluir un lavado con agua (2 mL) antes del lavado con la mezcla MeOH-agua, para desalojar primeramente a las especies iónicas.

El inmunoadsorbente con el que se probaron los lavados mostró una pérdida de actividad muy rápida, por lo que se optó por hacer lavados con PBS 0.02 M – MeOH 80:20 (v/v) y con agua pero los resultados no fueron satisfactorios. También se probaron lavados con mezclas de PBS-MeOH 96:4 (v/v) y lavados con solo PBS (30 y 60 mL), sin embargo, a pesar de los diferentes volúmenes usados en los lavados, los resultados no presentaban mucha diferencia. Finalmente, se decidió dejar el lavado con 5 mL PBS – MeOH 96:4 (v/v) para no alargar demasiado el tiempo de análisis con grandes volúmenes de lavado y para no someter al anticuerpo a condiciones más agresivas durante esta etapa.

La etapa de la elución es la más crítica, por lo que posteriormente se presentarán y discutirán los resultados. Después de la elución, los cartuchos de IA se lavaron con 10 mL de agua para eliminar residuos de disolvente orgánico proveniente de la solución de elución y 15 mL de PBS 0.02 M para dejar al anticuerpo en un estado favorable.

Todas las etapas del proceso de inmunoeextracción se llevaron a cabo a una velocidad de flujo de 1 mL/min, ya que se ha observado en trabajos anteriores que la retención disminuye si se utilizan flujos mayores en la etapa de carga. Esto significa que probablemente la cinética de formación del complejo anticuerpo-antígeno no es muy rápida.

El IA se dejó en PBS 0.02 M después de cada uso, ya que durante el proceso de inmunoeextracción la biomolécula sufre cambios en su configuración y debe recuperar su forma activa para poder retener al carbofurano en un nuevo ciclo de adsorción-desadsorción. Manteniendo el IA en reposo durante la noche se asegura un funcionamiento adecuado. Si el IA se usa continuamente sin reposo, la respuesta ante el antígeno varía, esto es, se observa la disminución en la retención del analito.

Con la optimización del proceso de inmunoeextracción se buscó asegurar que el antígeno (carbofurano) formara el complejo con el anticuerpo bajo las mejores condiciones y eliminar las interacciones no específicas con el soporte de sílice. Para corroborar que efectivamente no había interacción entre analito-soporte se realizaron ensayos en geles blanco. En lo que se refiere a la caracterización del comportamiento de los IAs, se puede decir que los factores que limitan la retención específica del analito son: la actividad inicial del anticuerpo, el grado de desnaturalización de esta biomolécula en el IA, la estructura porosa del material y la homogeneidad del empaque. Las dos últimas determinan la velocidad de difusión del soluto en el gel y por lo tanto contribuyen a la cinética del proceso adsorción-desadsorción.

6.3.1 Optimización de la elución

Para disociar el complejo antígeno-anticuerpo y recuperar cuantitativamente al analito, es necesario alterar drásticamente el medio en el que se encuentra la biomolécula y así inducir un cambio temporal en su conformación.

Primero se probaron eluyentes poco agresivos, como la mezcla de ácido cítrico a pH 2 con metanol al 10 % (50 mL). En este caso, el analito sólo pudo ser recuperado cuantitativamente cuando la actividad del anticuerpo encapsulado había decaído notablemente por el uso repetido del cartucho en múltiples ciclos de adsorción-desadsorción; sin embargo, al ensayar un cartucho recién preparado, la recuperación del carbofurano fue sólo parcial.

Posteriormente, se ensayaron mezclas de agua con MeOH aumentando progresivamente la concentración de disolvente orgánico. Se observó que a partir de un contenido de 64 % de MeOH la cantidad de carbofurano recuperado permanecía constante, por lo que esta composición fue el mejor compromiso, ya que permitió la desadsorción total del analito y el anticuerpo mantuvo suficiente actividad para poder seguir utilizando el mismo cartucho por al menos 33 ciclos más.

6.4 CONCENTRACIÓN, LIMPIEZA Y ANÁLISIS EN LÍNEA DEL ELUATO OBTENIDO EN LA INMUNOEXTRACCIÓN

La determinación de compuestos traza en muestras biológicas es uno de los más grandes retos para el químico analítico. En primer lugar, la cantidad de muestra disponible puede ser muy limitada, lo que significa que la cantidad absoluta de analito es muy pequeña y por lo tanto se requiere un método muy sensible para su determinación. Este es el caso en el presente trabajo, donde la muestra es un pequeño corte o cono de tejido epitelial cérvico-uterino.

En segundo lugar, las muestras biológicas son sumamente complejas ya que están constituidas por una gran cantidad y variedad de compuestos, que cubren una gama amplia de polaridades, tamaños e hidrofobicidad. De hecho, la limpieza de la muestra empieza desde la obtención del extracto, pues dependiendo del disolvente utilizado se extraerán una mayor o menor cantidad de compuestos. Las condiciones utilizadas para la obtención del extracto de tejido permitieron aislar solamente la fracción más polar (soluble en metanol); aún así, la solución resultante era todavía demasiado compleja para su análisis directo por cromatografía de líquidos. Estas condiciones fueron establecidas en un trabajo anterior^{32,38} donde ya se había abordado el problema objeto de esta investigación;

sin embargo, en dicho trabajo no se logró alcanzar la selectividad necesaria y no fue posible determinar confiablemente al carbofurano en las muestras (ver sección 3.5.2 del capítulo de Antecedentes). Para solucionar este problema, hemos incluido en la presente propuesta el paso de inmunoextracción como parte integral del procedimiento de preparación de muestra.

Aunque idealmente el inmunoadsorbente debería sólo retener al analito, la alta concentración de muchos otros compuestos en el extracto de tejido promovió la adsorción no específica de una fracción de ellos en el soporte de sílice o sobre las propias moléculas de anticuerpo. Como se mencionó en una sección anterior, el lavado del cartucho no permitió eliminar completamente esas interferencias. Cabe señalar que el lavado de un IA tiene la limitante de que sólo pueden utilizarse soluciones no agresivas para la biomolécula, lo que hace que sea poco eficaz cuando existen interacciones no específicas relativamente fuertes entre algunos compuestos de la muestra y el soporte.

Por otra parte, para recuperar cuantitativamente al analito retenido en el IA, fue necesario un volumen de 8 mL del disolvente de elución. Suponiendo que las muestras de tejido estuvieran contaminadas con carbofurano, la cantidad esperada no rebasaría más allá de unas decenas de nanogramos, por lo que la concentración de plaguicida en el eluato sería sumamente baja. Esto descartaba la posibilidad de analizarlo por inyección directa en el sistema CLAR-UV. Para alcanzar la sensibilidad requerida en el análisis de estas muestras era necesario trabajar con todo el eluato.

Por las razones antes expuestas se decidió complementar la inmunoextracción con una EFS en línea, utilizando una precolumna de fase reversa polimérica. Bajo condiciones apropiadas, el eluato completo puede cargarse en la precolumna para reconcentrar el analito. Además se pueden incluir lavados adicionales de ésta para continuar eliminando interferentes de la matriz de la muestra. Finalmente, la precolumna se acopla en línea con la columna analítica para la separación y el análisis de la muestra concentrada y purificada.

Los sistema EFS-CLAR en línea son una de las soluciones más poderosas para el enriquecimiento de compuestos traza y permiten alcanza una gran sensibilidad en los análisis. En los incisos siguientes se describen los ensayos realizados para poner a punto esta metodología y los resultados obtenidos.

6.4.1 Comprobación de la ausencia de fuga en la precolumna durante la carga

Para determinar el volumen de fuga del carbofurano en la precolumna, se utilizó el método basado en cargas sucesivas de una cantidad constante del analito disuelto en volúmenes

crecientes de las disoluciones de elución que se utilizaron en la etapa de inmunoeextracción. Las soluciones que se probaron fueron:

1. Acido cítrico (pH=2.0) – MeOH (90:10 v/v)
2. MeOH – H₂O (64:36 v/v)

Esta última solución (8 mL) fue previamente diluida con agua para reducir la concentración del disolvente orgánico hasta aproximadamente 10 % (v/v).

Inicialmente se inyectó un estándar de carbofurano de concentración conocida, el cual sirvió de referencia para los ensayos posteriores. La disminución en el área del pico obtenido al eluir la precolumna cargada indica que se ha rebasado el volumen de fuga.

Los ensayos realizados mostraron que el volumen de fuga del carbofurano en las dos disoluciones era mayor a 50 mL. No se probaron volúmenes mayores ya que para los fines de este trabajo, sólo se requería comprobar la ausencia de fuga durante la carga de los eluatos completos en la precolumna.

6.4.2 Optimización del paso de limpieza de muestra

Como ya se ha comentado, la inmunoeextracción permite eliminar muchos de los interferentes presentes en las muestras, pero puede no ser suficiente en el caso de muestras muy complejas. En efecto, entre la gran variedad de componentes de dichas muestras, algunos pueden establecer interacciones muy fuertes con el soporte del IA por lo que no alcanzan a ser desorbidos durante el lavado del cartucho. Estos interferentes se encontrarán entonces presentes en el eluato junto con el compuesto de interés.

Cuando el eluato es cargado en la precolumna de fase reversa, con el objeto de concentrar al analito, también se concentrarán los compuestos que lo acompañan. En consecuencia, el cromatograma obtenido al eluir la precolumna en línea con la columna analítica, puede presentar una serie de picos debidos a esos compuestos que dificultarán o impedirán la detección y la cuantificación del compuesto de interés. Para estimar en qué medida se presentaban estos problemas con las muestras en estudio, se realizó un ensayo con 1 mL de extracto de tejido biológico blanco. La inmunoeextracción se llevó a cabo de acuerdo con las condiciones finales establecidas (detalladas en la parte experimental de este trabajo). Los efluentes (carga + lavado) y el eluato del cartucho fueron colectados y ambos se cargaron en precolumnas de fase reversa y se analizaron en línea. La figura VI.4 muestra los cromatogramas obtenidos. Cabe mencionar que en este caso las precolumnas sólo fueron lavadas con 6 mL de agua después de la carga de los efluentes o el eluato.

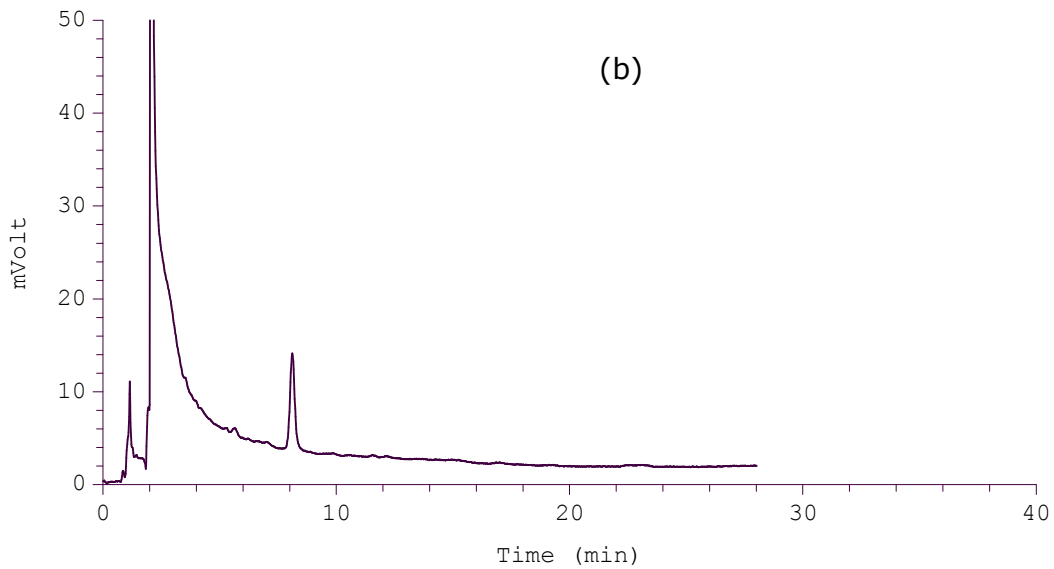
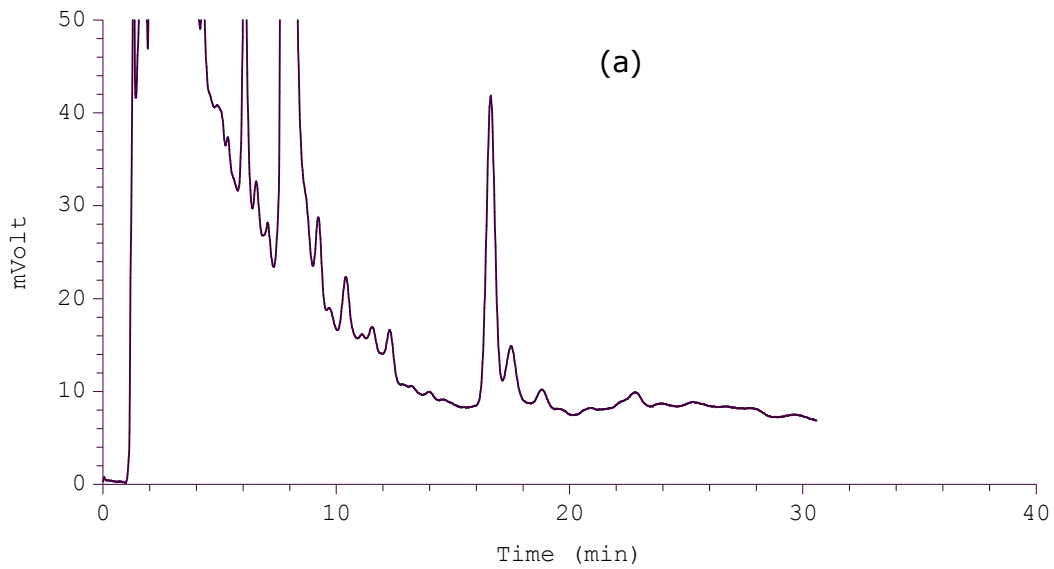


Figura VI.4. Cromatogramas obtenidos del análisis de los efluentes (a) y el eluato (b) del cartucho de inmunoeextracción. Muestra: 1 mL de extracto de tejido epitelial cérvico-uterino. Condiciones de análisis: carga de efluentes, o eluato diluido con agua, en precolumna (20 x 2 mm D.I.) de fase reversa PLRP-S, 5 μ m; lavado con 6 mL de agua; elución en línea con la columna (150 x 4.6 mm D.I.) de fase reversa Hypersil ODS, 5 μ m, usando la fase móvil ACN-H₂O 23:77 (v/v) a flujo de 1 mL/min; detección UV a 280 nm.

El cromatograma de los efluentes muestra claramente la complejidad del tejido biológico, que genera señales muy grandes a lo largo del cromatograma, pero sobre todo al inicio. Por las propiedades de la columna utilizada (fase reversa) se deduce que los interferentes más importantes son compuestos de polaridades media y alta, con hidrofobicidad entre baja y media. El cromatograma del eluato es un buen ejemplo de la selectividad de la inmunoextracción. En éste sólo se observa una señal muy disminuida de uno de los picos principales de los efluentes, pero aún persiste un pico de matriz importante al inicio del cromatograma.

Cabe señalar que para apreciar los grandes picos del cromatograma de los efluentes, en la Fig. VI.4 se utilizó una escala muy comprimida, es decir, una muy baja sensibilidad. Por ello, aunque aparentemente el cromatograma del eluato es muy limpio a los altos tiempos de análisis, donde eluye el carbofurano, esto no era suficiente para alcanzar a detectar inequívocamente y cuantificar con precisión cantidades del plaguicida inferiores a la centena de nanogramos. Para ilustrar esto, en la Figura VI.5 se presenta el mismo cromatograma del eluato en una escala expandida y se compara con el cromatograma de un estándar de carbofurano inyectado directamente (cantidad inyectada ~100 ng)

Con el fin de incrementar el grado de limpieza de la muestra, se decidió hacer lavados más enérgicos de la precolumna, una vez cargado el eluato del cartucho de inmunoextracción. La fase reversa polimérica, con la que está empacada la precolumna, es un material muy resistente que tolera soluciones de pH extremo (desde 0 a 14). Considerando que los carbamatos no son estables en medios muy básicos o muy ácidos, pero resisten bien un pH moderadamente alcalino, se optó por utilizar una solución de amoníaco en el lavado.

El protocolo de lavado finalmente establecido para la precolumna fue el siguiente:

- 5 mL de ACN-H₂O 5:95 (v/v)
- 2 mL de NH₄OH 0.01 M ajustado a pH 11
- 3 mL de agua

El lavado final con agua tuvo por objeto eliminar la solución básica del volumen intersticial de la precolumna, para evitar que pudiera ocasionar daños a la columna analítica en la etapa del acoplamiento y en el análisis en línea. En la Figura VI.6 se muestra el cromatograma obtenido del análisis de 2 mL de extracto de tejido blanco sometido a inmunoextracción, carga en precolumna con los correspondientes lavados y elución en línea. Se incluye también el cromatograma del estándar de carbofurano inyectado (~100 ng) como referencia de comparación.

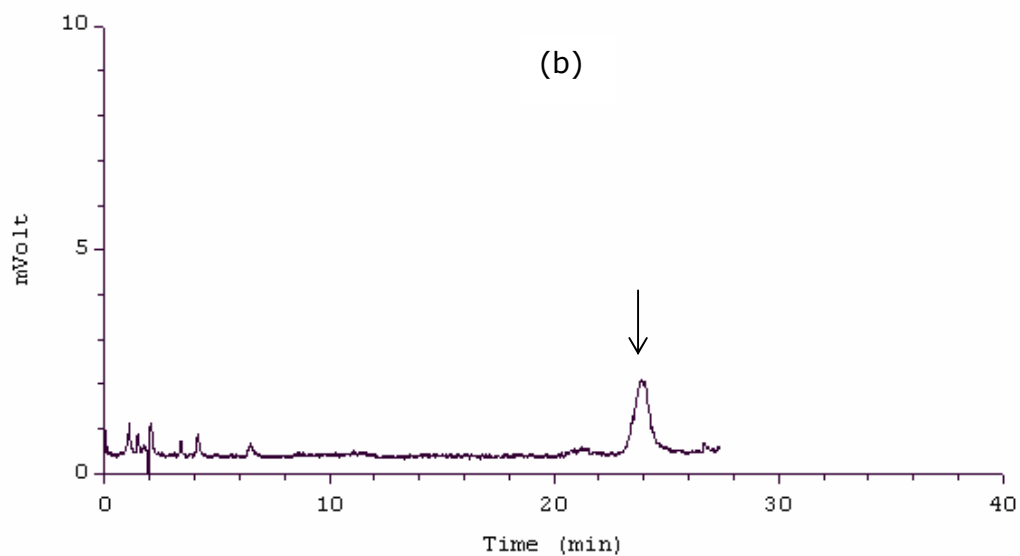
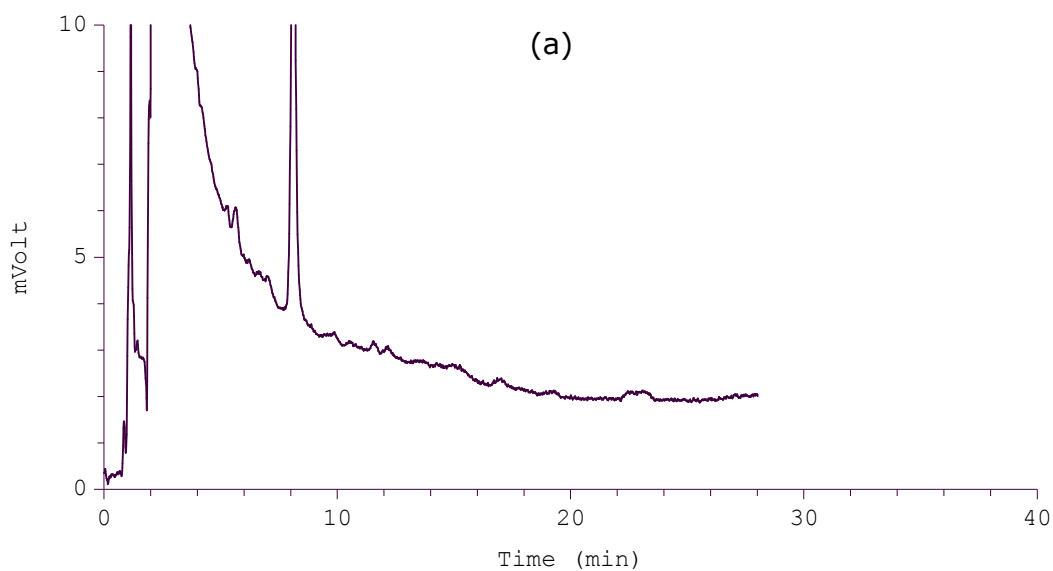


Figura VI.5. Cromatograma obtenido del análisis del eluato del cartucho de inmunoprecipitación en una escala expandida (a) y, como referencia, cromatograma del análisis de un estándar de carbofurano inyectado directamente (104 ng) (b). Otras condiciones como en la Fig. VI.4.

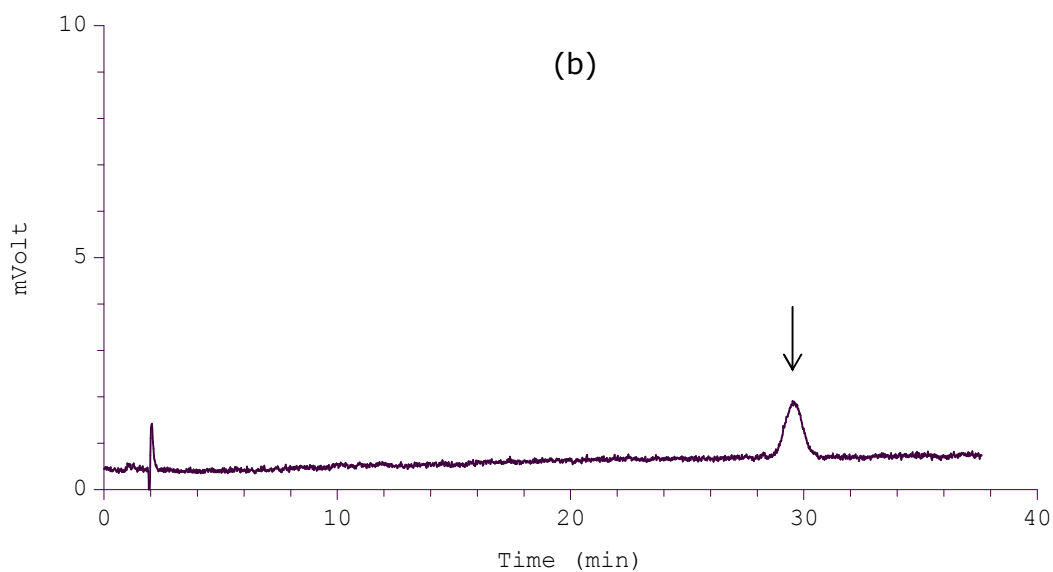
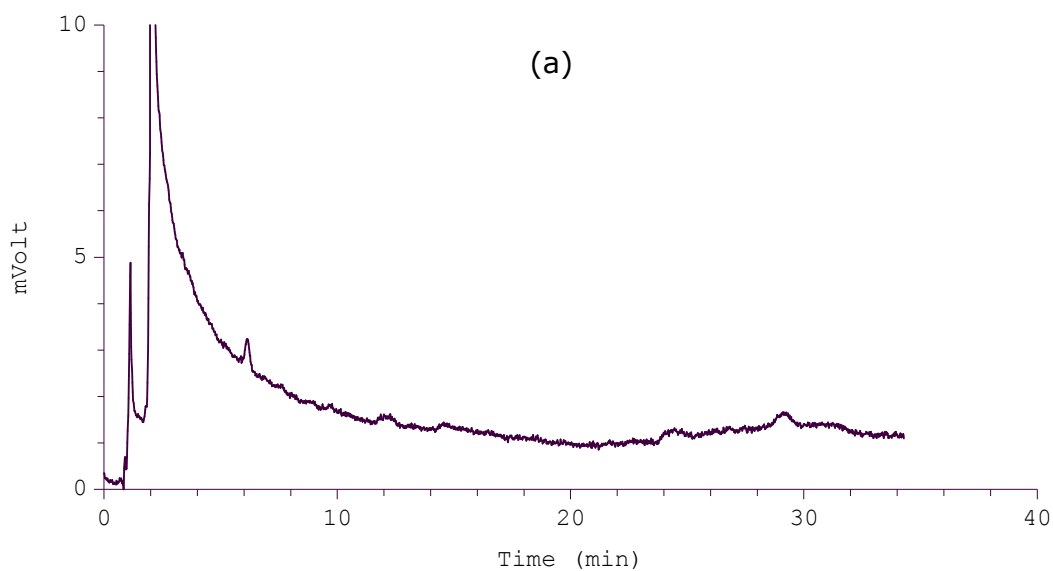


Figura VI.6. Cromatograma obtenido del análisis del eluato de un extracto de tejido blanco (a) y de un estándar de carbofurano inyectado (b). Otras condiciones como en la figura VI.4, excepto: muestra 2 mL de extracto y fase móvil ACN-H₂O 21:79 (v/v)

En la Fig. VI.6 el volumen de extracto de tejido analizado fue el doble que en la Fig. VI.5; a pesar de ello, el cromatograma es mucho más limpio y el pico de matriz inicial es considerablemente más pequeño, gracias al lavado de la precolumna con las soluciones antes indicadas. La consecuencia importante de ello es que la señal de fondo a los tiempos de análisis mayores es menos intensa, lo que hace factible la detección de cantidades más pequeñas de analito.

6.5 EVALUACIÓN ESTADÍSTICA DEL MÉTODO ANALÍTICO DESARROLLADO PARA DETERMINAR CARBOFURANO EN MUESTRAS DE TEJIDO DE EPITELIO CERVICAL

Una vez establecido el método, se realizó la validación del mismo. Para ello se utilizaron muestras de tejido provenientes de personas no expuestas al plaguicida. Los extractos metanólicos se doparon con diferentes cantidades del analito en el intervalo de 20-150 ng. Luego se sometieron a una filtración previa para eliminar cualquier partícula sólida suspendida, que podría ocasionar la oclusión de los filtros del cartucho de inmunoextracción o de la precolumna. Para esta operación se utilizaron filtros desechables para muestra con membrana de nylon. Finalmente se aplicó el tratamiento descrito en las secciones anteriores a cada muestra.

6.5.1 Linealidad del método

En la Fig. VI.7 se presentan los resultados del análisis de los extractos de tejido blanco dopados con diferentes cantidades de carbofurano. La gráfica de Cantidad recuperada Vs cantidad adicionada muestra claramente que el último punto no está comprendido en el intervalo de linealidad del método. Esto se debe a que el cartucho de inmunoextracción con el que se realizaron estos experimentos ya había sido usado previamente en varios ciclos de adsorción-desadsorción (aproximadamente 10); en consecuencia, su capacidad de enlazamiento ya había disminuido debajo de 150 ng. El problema no se consideró grave pues difícilmente podría esperarse que una muestra "real" (tejido de persona expuesta al plaguicida) estuviera contaminada con cantidades de carbofurano superiores a la centena de nanogramos.

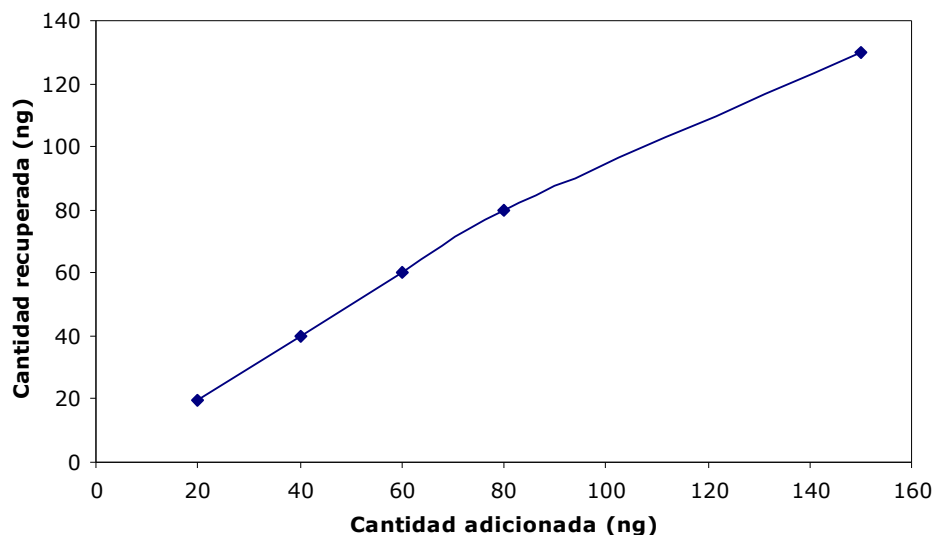


Figura VI.7 Resultados del análisis de extractos de tejido blanco dopados con diferentes cantidades de carbofurano.

Para el tratamiento estadístico de los datos se descartó el punto que corresponde a la muestra dopada con 150 ng de carbofurano. La ecuación de regresión lineal y el coeficiente de correlación obtenidos con los 4 datos restantes fueron:

$$y = 0.990 x + 0.955 \quad (E-1)$$

$$r^2 = 0.998$$

Donde "y" es la cantidad recuperada y "x" es la cantidad adicionada. La ordenada al origen y la pendiente de la ecuación E-1 son buenos indicadores de la calidad del método analítico desarrollado. Una ordenada al origen estadísticamente igual a cero indica que el método no presenta errores sistemáticos. Una pendiente estadísticamente igual a uno demuestra que no hay pérdidas (o ganancias) de analito durante las diferentes etapas del método y por lo tanto éste es exacto. Con base en lo anterior, las pruebas de hipótesis realizadas sobre la ordenada al origen (a) y la pendiente (b) de la recta de regresión fueron:

Ordenada al origen

$$\text{Hipótesis nula } H_0: a=0$$

$$\text{Hipótesis alterna } H_1: a \neq 0$$

Pendiente

$$\text{Hipótesis nula } H_0: b=1$$

$$\text{Hipótesis alterna } H_1: b \neq 1$$

Los resultados del análisis estadístico se presentan en la tabla VI.5

Tabla VI.5 Resultados de las pruebas de hipótesis sobre la ordenada al origen y la pendiente de la recta de cantidad recuperada Vs Cantidad analizada (n=4). Nivel de confianza $\alpha = 0.05$

Parámetro	t calculada	t crítica	Decisión
a	0.62	3.18	Aceptar Ho
b	-0.34	3.18	Aceptar Ho

Los resultados anteriores demuestran que existe una relación lineal entre la cantidad de analito presente en la muestra y la cantidad determinada por el método en el intervalo de 20 a 80 ng de carbofurano. En este intervalo, el método no presenta errores sistemáticos y es exacto.

Con el fin de confirmar la exactitud del método y evaluar su precisión a bajos contenidos de analito en las muestras, se realizó el análisis de 7 porciones de 2 mL de extracto de tejido cervical dopadas con 40 ng de carbofurano. Los análisis se efectuaron en diferentes días. Los resultados obtenidos se presentan en la Tabla VI.6

Como se mencionó en la parte experimental, debido a la limitada disponibilidad de muestras (cortes de tejido cérvico-uterino), el extracto obtenido de cada una se dividió en dos partes, con el fin de contar con suficiente material para llevar a cabo todo el trabajo que implicó esta investigación: establecimiento del método, optimización y evaluación. Por esta razón, los 7 análisis reportados en la Tabla VI.6 no corresponden a 7 tejidos diferentes, sino a 5.

Se realizó la prueba de hipótesis sobre la media con el fin de avalar la exactitud del método en el análisis de muestras conteniendo la misma cantidad de carbofurano (40 ng)

Hipótesis nula $H_0: x = \mu$

Hipótesis alterna $H_1: x \neq \mu$

En la Tabla VI.7 se presenta el resultado de la prueba de hipótesis y en la Tabla VI.8 se reporta el intervalo de confianza para este análisis

Tabla VI.6 Estudio de repetibilidad del método.

Análisis de 7 fracciones de 2 mL de extracto de tejido blanco fortificadas con carbofurano (40ng).

No. de muestra *	ng recuperados Carbofurano
1	42.04
2	41.65
2a	35.75
3	45.33
4	37.50
4a	42.06
5	37.47
X	40.26
s	3.41
CV	8.47
% R	100.65 %

s = desviación estándar; CV = Coeficiente de variación; % R = Recuperación promedio

* La notación "a" para un mismo número de muestra indica una segunda fracción de extracto del mismo tejido analizada.

Tabla VI.7 Análisis estadístico de la exactitud del método.

Donde n=7 y Nivel de confianza $\alpha=0.05$

Parámetro	T calculada	T crítica	Decisión
X	0.20	2.45	Aceptar H_0

Tabla VI.8 Intervalo de confianza para la determinación de carbofurano (40 ng) en extractos de tejido cérvico-uterino. Nivel de confianza $\alpha=0.05$

Analito	Intervalo de confianza	Intervalo de confianza % recuperación
Carbofurano	37.1 < ng recuperados < 43.4	92.8 < %R < 108

Estos resultados demuestran que el método permite cuantificar con exactitud cantidades del orden de 40 ng de carbofurano en 2 mL de extracto de tejido cérvico-uterino, lo que equivale a una concentración de carbofurano de 20 ng/mL (ó 20 ppb) en el extracto. En lo que se refiere a la precisión, el coeficiente de variación obtenido se considera excelente para un análisis tan complicado como es la determinación de trazas de un plaguicida en muestras biológicas.

Los resultados de la Tabla VI.6 permitieron estimar estadísticamente el Límite de Detección del Método (LDM). La estimación del LDM se basó en el criterio recomendado por la EPA para el análisis de contaminantes en muestras ambientales (muestras de agua principalmente). Según este criterio, el LDM se calcula por la siguiente relación:

$$\text{LDM} = t_{(0.01, n-1)} * s$$

Donde: " $t_{(0.01, n-1)}$ " es la "t" de Student (prueba de una cola) para un nivel de confianza del 1 % con n-1 grados de libertad y "s" es la desviación estándar obtenida en el análisis de al menos 7 muestras blanco, fortificadas con el analito a niveles no superiores a 10 veces el valor del LDM esperado. El LDM estimado con los resultados de la Tabla VI.6 es:

$$\text{LDM} = 3.14 * 3.41 = 11 \text{ ng}$$

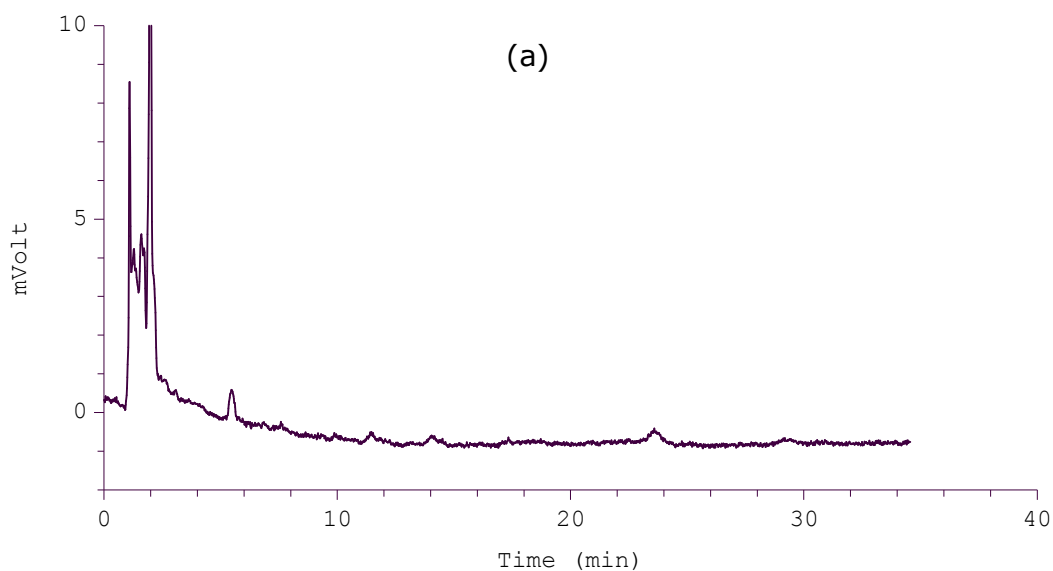
Esta cantidad equivale a una concentración de carbofurano de 5.5 ng/mL en el extracto de tejido. Cabe señalar que no se llevó a cabo un análisis de muestra dopada con carbofurano a estos niveles de concentración, por lo que el valor obtenido para el LDM debe considerarse sólo como una estimación.

6.5.2 Aplicación del método

El carbofurano, como ya se ha mencionado anteriormente, es un plaguicida de la familia de los carbamatos ampliamente utilizado en México como insecticida, nematicida y acaricida en una gran variedad de cultivos. Este plaguicida actúa como inhibidor de la acetilcolinesterasa y aunque no presenta bioacumulación, sus efectos tóxicos en mamíferos por inhalación, ingestión o contacto directo a través de la piel, han sido bien documentados. A pesar de que no se ha establecido un efecto mutagénico o carcinógeno del carbofurano, se sospecha que esta sustancia pueda estar relacionada con la alta incidencia de cáncer cérvico-uterino observada en mujeres campesinas de algunas regiones del país.

Por esta razón, el método desarrollado se aplicó en el análisis de algunas muestras de tejido provenientes de mujeres expuestas al plaguicida, a las cuales se les habían detectado anomalías en el epitelio cérvico-uterino mediante análisis clínicos.

Se analizaron 8 muestras y en ninguna se confirmó la presencia de carbofurano. En la figura VI.8 (a), (b) y (c), se presentan algunos de los cromatogramas obtenidos. La composición de la fase móvil empleada fue la misma que en los experimentos de la Fig. VI.6 y bajo estas condiciones el carbofurano eluye en un tiempo de retención cercano a los 30 min. En estos análisis, como en el resto del trabajo, se utilizó sólo la mitad del extracto metanólico obtenido del tejido. La segunda fracción fue reservada para poder realizar un análisis confirmatorio en caso necesario.



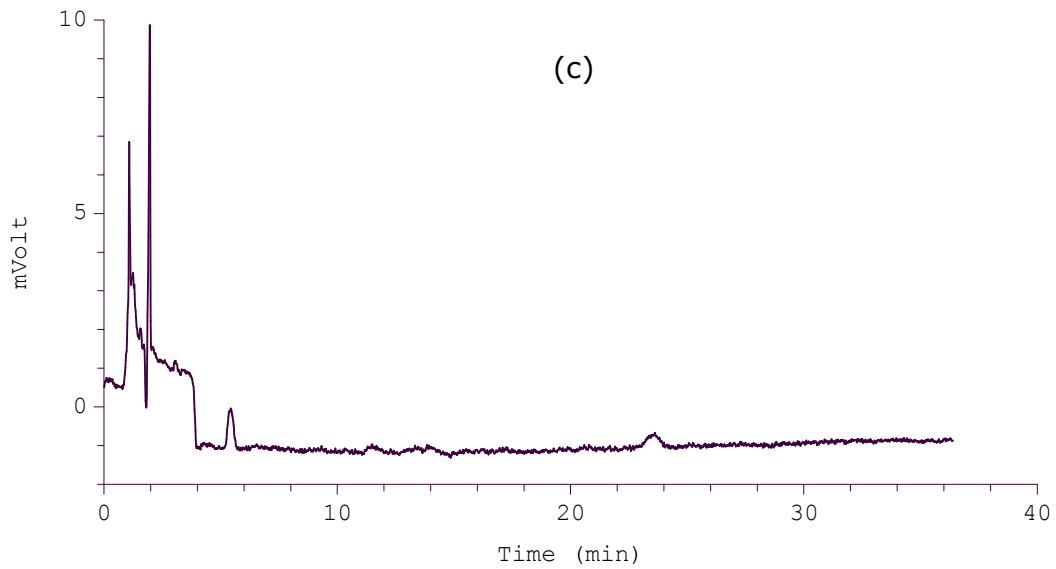
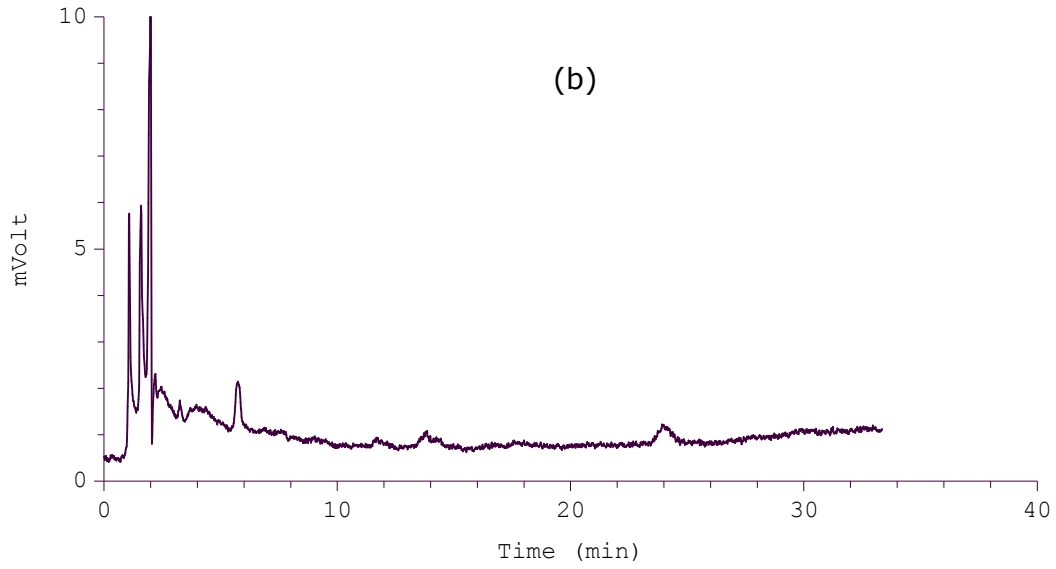
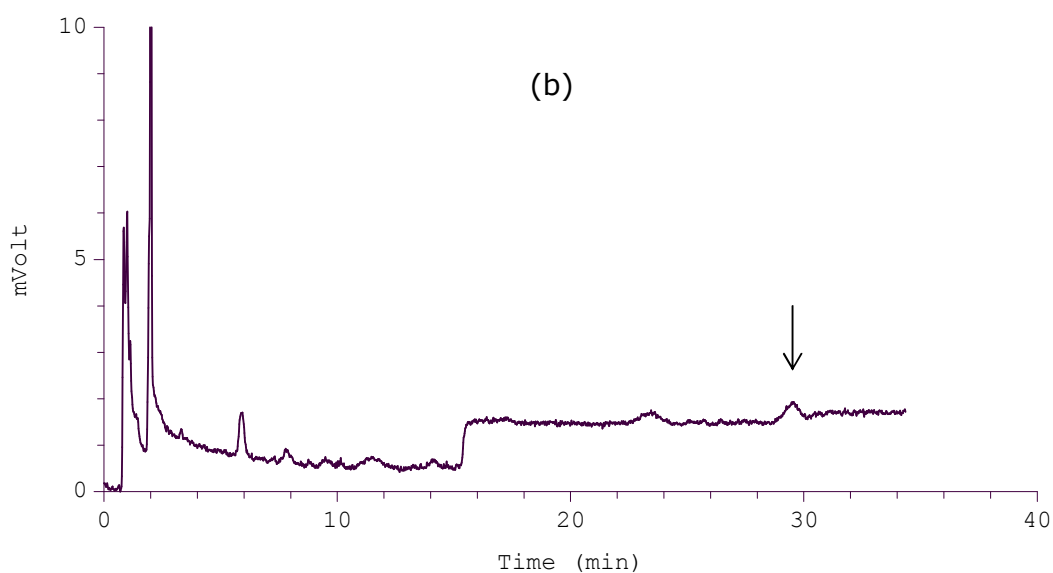
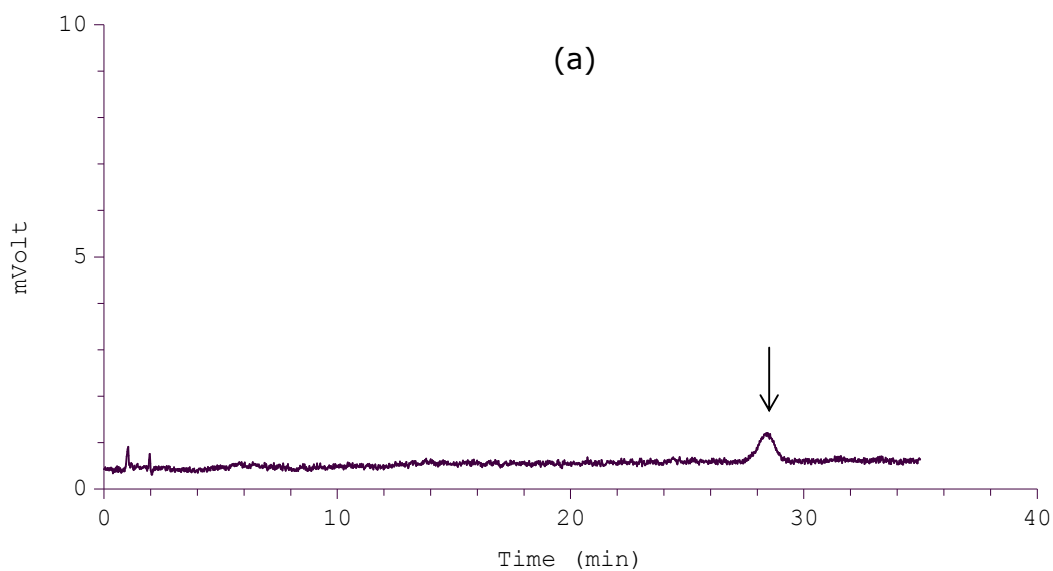


Figura VI.8 (a) (b) (c). Cromatogramas obtenidos del análisis de 3 extractos de tejido cérvico-uterino. Las muestras provenían de tres mujeres expuestas al plaguicida en las que se detectaron anomalías por análisis clínicos. Condiciones experimentales como en la Fig. VI.6

En el análisis de una de las 8 muestras se observó una señal definida en la zona de elución del carbofurano, por lo que se decidió repetir el ensayo pero ahora dopando la segunda fracción del extracto con 40 ng del analito. Al analizar la misma muestra dopada se observaron dos picos en la zona de interés, en vez de un incremento en el tamaño del pico original como se esperaba. Por lo tanto, se puede afirmar que la señal inicialmente observada en la muestra sin dopar no correspondía al carbofurano. En la Fig. VI.9 se muestran los cromatogramas correspondientes incluyendo el de un estándar de carbofurano inyectado como referencia.



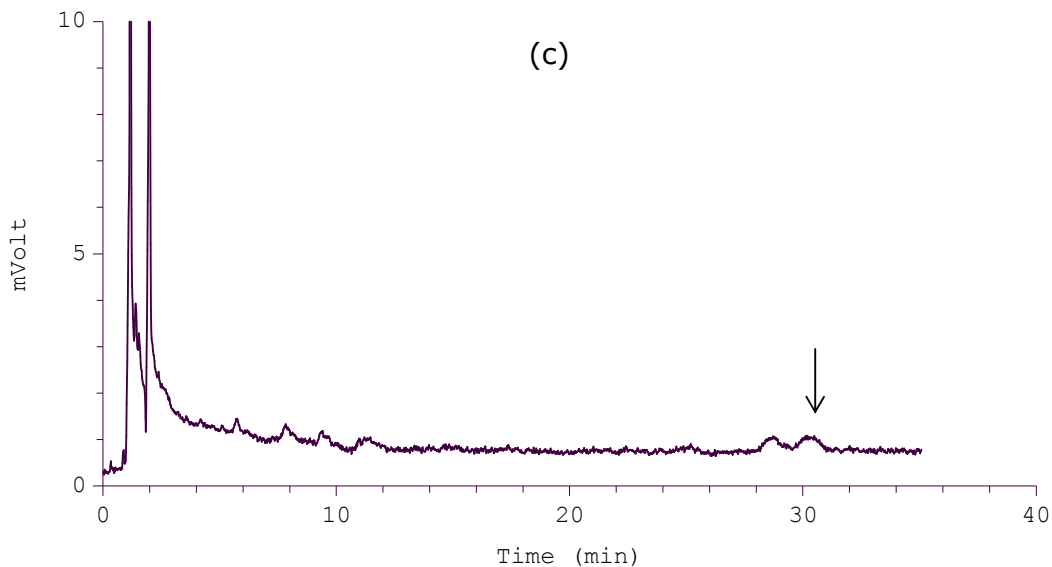


Figura VI.9 Análisis de una muestra de tejido cérvico-uterino y verificación de la presencia o ausencia de carbofurano por adición patrón. (a) estándar de carbofurano, 2 ppm (52 ng inyectados), (b) muestra sin dopar, (c) muestra dopada con 40 ng de carbofurano. Condiciones experimentales como en la Fig. VI.6. En los cromatogramas del extracto (b) y (c), la flecha señala el pico sospechoso, en el cromatograma del estándar (a), se señala al pico del carbofurano.

Es importante hacer notar que el análisis de las 8 muestras mediante el método desarrollado no permite, de ninguna manera, descartar una relación entre el cáncer cérvico-uterino detectado en las mujeres campesinas y la presencia del carbofurano en el epitelio cervical. En primer lugar, estas muestras habían sido tomadas mucho tiempo atrás por lo que, aún si hubieran estado inicialmente contaminadas con el plaguicida, éste ya se habría degradado. En segundo lugar, para descartar o establecer una relación causa-efecto como la mencionada, se requiere un estudio diseñado científicamente con un número muy importante de muestras control y muestras de la población investigada, lo que obviamente está fuera de los objetivos y alcances del presente proyecto.

La importancia principal de los resultados obtenidos en el análisis de las 8 muestras radica en la impresionante similitud de sus correspondientes cromatogramas. Considerando la enorme diversidad que existe entre individuos, se podrían esperar notables diferencias en las señales observadas. Sin embargo, la gran limpieza de muestra que se logra conjuntando la inmuoextracción y los lavados de la precolumna durante la etapa de EFS,

lleva a la eliminación de la inmensa mayoría de los componentes de la matriz, quedando muy pocas señales residuales. Por ello, se puede decir que el método desarrollado es bastante confiable y muy robusto.

En el caso de muestras sospechosas, como la que se presentó al final, el método de adición patrón de carbofurano a una fracción del extracto y repetición del análisis es una buena ayuda para descartar falsos positivos, pero no es infalible. Una alternativa que eliminaría cualquier posibilidad de error sería el uso de un equipo acoplado CL-EM (cromatografía de líquidos - espectrometría de masas) en vez de un CLAR-UV. No obstante, dicho equipo tiene un alto costo, requiere de personal altamente especializado para operarlo y, en consecuencia, muy pocos laboratorios en México cuentan con él. Por otra parte, las muestras biológicas son en general tan complejas que, aún con un CL-EM, seguiría siendo necesaria una buena limpieza previa del extracto antes del análisis.

El método de preparación de muestra, desarrollado y propuesto en este trabajo, es sin duda una de las mejores opciones para el tratamiento de cualquier tejido biológico, previo a la determinación del analito de interés por un método instrumental.

VII. CONCLUSIONES

La optimización del método de inmovilización del anticuerpo monoclonal LIB-BFNB-67 por la técnica sol-gel, permitió preservar más del 50 % de la actividad nativa de esta biomolécula. Considerando la gran fragilidad de los anticuerpos monoclonales, este resultado es un logro notable, gracias al cual se pudieron sintetizar inmunoadsorbentes con una alta capacidad de enlazamiento del analito.

Comparado con el método más común de inmovilización del anticuerpo por anclaje químico, el procedimiento de encapsulamiento sol-gel propuesto es más sencillo, reproducible y eficaz. Por ello, requiere una menor cantidad de materia prima (500 µg de anticuerpo), lo que permite reducir considerablemente el costo de preparación de los inmunoadsorbentes.

La posibilidad de reuso de los cartuchos de inmunoextracción compensa también, en cierta medida, el alto costo de los anticuerpos. En el presente trabajo, se realizaron 33 experimentos de inmunoextracción, tanto de muestras sintéticas como de muestras biológicas, con un mismo cartucho a lo largo de un periodo de dos meses. Al final del estudio, el inmunoadsorbente todavía era capaz de retener un poco más de 50 ng de carbofurano, pese a haber perdido 80% de su capacidad de enlazamiento inicial.

La inmunoextracción demostró ser una de las mejores opciones para la preparación de muestras ambientales de alta complejidad. Su gran selectividad, basada en el reconocimiento molecular, permitió eliminar muchos interferentes de la matriz biológica estudiada, haciendo factible la detección del contaminante de interés. No obstante, la adsorción no específica de algunos componentes de la muestra sobre el soporte de sílice es inevitable y difícil de eliminar durante la etapa de lavado. Además, por la fragilidad de los anticuerpos monoclonales, no es posible usar un eluyente muy fuerte para recuperar al analito en un pequeño volumen. Estos factores tienen como consecuencia una disminución en la selectividad y sensibilidad.

El método propuesto en este trabajo permitió superar las limitaciones mencionadas, pues acopla la inmunoextracción fuera de línea con un sistema de EFS-CLAR en línea. De esta manera, se logró determinar carbofurano al nivel de trazas en una matriz muy compleja (extractos de tejido epitelial cérvico-uterino) con buena precisión y exactitud. El límite estimado de detección del método fue de 11 ng de carbofurano en 2 mL de extracto.

Este método puede ser fácilmente implementado en cualquier laboratorio analítico, pues sólo requiere de instrumentación convencional (CLAR-UV). Sin embargo, la falta de cartuchos de inmunoextracción disponibles comercialmente es la mayor limitante para su

posible aplicación en un programa de monitoreo rutinario de carbofurano en muestras de tejido de personas expuestas.

Los excelentes resultados que se obtienen al incluir la inmunoextracción como parte de las metodologías analíticas pueden contribuir a cambiar la situación mencionada, si se logra atraer el interés tanto de los potenciales usuarios de los métodos (laboratorios analíticos ambientales y clínicos) como de los fabricantes de fases estacionarias y cartuchos para EFS.

VIII. BIBLIOGRAFIA

1. Thurman, E.M., Mills, M.S. *Solid-Phase Extraction (Principles and Practice)*. John Wiley & Sons, N.Y., 1998.
2. Hennion M.-C. 1999. *Solid-phase extraction: method development, sorbents and coupling with liquid chromatography*. **J. Chromatogr. A** 856: 3-54.
3. Caballo A., Luque de Castro M.D. 2003. *Continuous ultrasound-assisted extraction coupled to on line filtration-solid-phase extraction-column liquid chromatography-post column derivatisation-fluorescence detection for the determination of N-methylcarbamates in soil and food*. **J. Chromatogr. A** 998: 51-59.
4. Martín-Esteban A., Fernández P., Cámara C. 1997. *Immunsorbents: A new tool for pesticide handling in environmental analysis*. **J. Anal. Chem.** 357: 927-933.
5. Pichon V., Bouzige M., Hennion M.C. 1998. *New trends in environmental trace-analysis of organic pollutants: class-selective immunoextraction and clean-up in one step using immunsorbents*. **Anal. Chim. Acta** 376: 21-35.
6. Pichon V., Bouzige M., Miége C., Hennion M.-C. 1999. *Immunsorbents: natural recognition materials for sample preparation of complex environmental matrices*. **Trends Anal. Chem.** 18: 219-235.
7. Delaunay N., Pichon V., Hennion M.-C. 2000. *Inmmunoaffinity solid-phase extraction for the trace analysis of low-molecular-mass analytes in complex sample matrices*. **J. Chromatogr. B** 745: 15-37.
8. Hennion M.-C., Pichon V. 2003. *Immuno-based sample preparation for trace analysis*. **J. Chromatogr. A** 1000: 29-52.
9. Porath J. 1981. *Development of modern bioaffinity chromatography (A review)*. **J. Chromatogr.** 218: 241-259.
10. Rodney R.W. 1985. *Affinity Chromatography*. **Anal. Chem.** 57: 998-1114.
11. Hage D. 2002. *High-performance affinity chromatography: a powerful tool for studying serum protein binding*. **J. Chromatogr. B** 768: 3-30.

12. Vázquez Lira J.C. 2003. *Desarrollo, evaluación y caracterización de inmoadsorbentes para la extracción en fase sólida de pesticidas a partir de muestras acuosas y su determinación por cromatografía de líquidos. Tesis de Doctorado.* Facultad de Química, UNAM, México.
13. García Salgado E. 2005. *Preparación y caracterización de un biogel con albúmina de suero bovino inmovilizada por el método sol-gel y su estudio preliminar en sistemas en flujo por CLAR. Tesis de Maestría.* Facultad de Química, UNAM, México.
14. Hage D., Nelson M.A. 2001. *Chromatographic Immunoassays.* **Anal. Chem.** 25: 199-206.
15. Stalikas C., Knopp D., Niessner R. 2002. *Sol-gel glass immunosorbent-based determination of s-triazines in water and soil samples using gas chromatography with a nitrogen phosphorus detection system.* **Environ. Sci. Technol.** 36: 3372-3377.
16. Livage J., Roux C., Farhati K., Monjour L. 1997. *Antibody-antigen reactions in porous sol-gel matrices.* **J. Sol-Gel Sci. Technol.** 8: 663-666.
17. Abad A., Moreno J., Montoya A.. 1999. *Development of monoclonal antibody-based immunoassays to the N-methylcarbamate pesticide carbofuran.* **J. Agric. Food Chem.** 47: 2475-2485.
18. Wang R., Narang U., Prasad P., Bright F. 1993. *Affinity of antiluorescein antibodies encapsulated within a transparent sol-gel glass.* **Anal. Chem.** 65: 2671-2675.
19. Lin J, Brown C. 1997. *Sol-gel glass as a matrix for chemical and biochemical sensing.* **Trends Anal. Chem.** 16: 200-211.
20. Gill I., Ballesteros A. 2000. *Bioencapsulation within synthetic polymers (Part I): sol-gel encapsulated biologicals.* **Trends Biotechnol.** 18: 282-296.
21. Bronshtein A., Aharonson N., Avnir D., Turniansky A., Altstein M. 1997. *Sol-gel matrixes doped with atrazine antibodies: Atrazine binding properties.* **Chem. Mater.** 9: 2632-2639.
22. Turniansky A., Avnir D., Bronshtein A., Aharonson N., Altstein M. 1996. *Sol-gel entrapment of monoclonal anti-atrazine antibodies.* **J. Sol-gel Sci. Technol.** 7: 135-143.

23. Vázquez Lira J.C., Camacho Frías E., Peña Álvarez A., Vera Avila L.E. 2003. *Preparation and characterization of a sol-gel immunosorbent doped with 2,4-D antibodies.* **Chem. Mater.** 15: 154-161.
24. Vera Avila. L.E., Vázquez Lira J.C., García de Llasera M., Covarrubias Herrera R. 2005. *Sol-gel immunosorbents doped with polyclonal antibodies for the selective extraction of malathion and triazines from aqueous samples.* **Environ. Sci. Technol.** 39: 5421-5426.
25. Dunn B., Miller J.M., Dave B.C., Valentine J.S., Zink J. I. 1998. *Strategies for encapsulating biomolecules in sol-gel matrices.* **Acta Mater.** 46: 737-741.
26. Jin W., Brenna J. 2002. *Properties and applications of proteins encapsulated within sol-gel derived materials.* **Anal. Chim. Acta** 461: 1-36.
27. Lecloux A. J., Pirard J. P. 1998. *High-temperature catalysts through sol-gel synthesis.* **J. Non-Cryst. Solids** 225: 146-152.
28. Bhatia R., Brinker C., Gupta A., Singh A. 2000. *Aqueous sol-gel process for protein encapsulation.* **Chem. Mater.** 12: 2434-2441.
29. Dunn B., Zink J. 1997. *Probes of pore environment and molecule-matrix interactions in sol-gel materials.* **Chem. Mater.** 9: 2280-2291.
30. Morales E. 2003. *Preparación de sensores químicos y bioquímicos por la técnica sol-gel.* **Tesis de Maestría.** Facultad de Química, UNAM, México.
31. Nunes G.S., Barceló D. 1999. *Analysis of carbamate insecticides in foodstuffs using chromatography and immunoassay techniques.* **Trends Anal. Chem.** 18: 99-107.
32. Macías Mendoza D. 2005. *Desarrollo de un método para la determinación de trazas de carbofurano y 7-fenolcarbofurano en tejido biológico mediante un sistema de preconcentración y análisis cromatográfico en línea.* **Tesis de Maestría.** Facultad de Química, UNAM, México.
33. Zelada Guillén G. 2006. *Preparación de inmunoabsorbentes sol-gel a partir de diferentes anticuerpos monoclonales anti-carbofurano y su evaluación por cromatografía de líquidos.* **Tesis de Licenciatura.** Facultad de Química, UNAM, México.

34. Moreno M.J., Abad A., Pelegrí R., Martínez M.I., Sáez A., Gamón M., Montoya A. 2001. *Validation of a monoclonal enzyme immunoassay for the determination of carbofuran in fruits and vegetables.* **J. Agric. Food Chem.** 49: 1713-1719.
35. López Blanco M.C., Cancho Grande, B., Simal-Gándara J. 2002. *Comparison of solid-phase extraction and solid-phase microextraction for carbofuran in water analyzed by high performance liquid chromatography-photodiode-array detection.* **J. Chromatogr. A** 963: 117-123.
36. Nunes G.S., Ribeiro M.L., Polese L., Barceló, D. 1998. *Comparison of different clean-up procedures for the determination of N-methylcarbamates insecticides in vegetable matrices by high performance liquid chromatography with UV detection.* **J. Chromatogr. A** 795: 43-51.
37. Rule G., Mordehal A., Henion J. 1994. *Determination of carbofuran by on-line immunoaffinity chromatography with coupled-column liquid chromatography/mass spectrometry.* **Anal. Chem.** 66: 230-235
38. Vera Avila L.E., Macías Mendoza D., Covarrubias Herrera R., Velásquez Ramírez J. G. 2005. *On-line solid phase extraction-liquid chromatographic method for the determination of carbofuran and 7-phenolcarbofuran in cervical-uterine epithelial tissue.* **J. Mex. Chem. Soc.** 49 (1): 32-38.