



IMTA<sup>®</sup>

Instituto Mexicano de Tecnología del Agua

Programa de Posgrado

Tesis

ADAPTACION DE UNA TECNICA DE ELISA  
PARA LA DETECCION DE ATRAZINA EN AGUA

que para obtener el grado de  
Maestría en Ciencias y Tecnología del Agua  
(Sistemas Ambientales)

presenta

Dalia Vanessa Millán Gómez

Tutora: Dra. Silvia L. Gelover Santiago

Cuertepec, Morelos

2009



**Instituto Mexicano de Tecnología del Agua**

**Programa de Posgrado**

## **Tesis**

**ADAPTACIÓN DE UNA TÉCNICA DE ELISA  
PARA LA DETECCIÓN DE ATRAZINA EN AGUA**

que para obtener el grado de  
**Maestría en Ciencias y Tecnología del Agua  
(Sistemas Ambientales)**

presenta  
**Dalia Vanessa Millán Gómez**

Tutora: Dra. Silvia L. Gelover Santiago

Con fundamento en los artículos 21 y 27 de la Ley Federal del Derecho de Autor y como titular de los derechos moral y patrimoniales de la obra titulada "ADAPTACIÓN DE UNA TÉCNICA DE ELISA PARA LA DETECCIÓN DE ATRAZINA EN AGUA", otorgo de manera gratuita y permanente al Instituto Mexicano de Tecnología del Agua, autorización para que fijen la obra en cualquier medio, incluido el electrónico, y la divulguen entre su personal, estudiantes o terceras personas, sin que pueda percibir por tal divulgación una contraprestación.

**DALIA VANESSA MILLÁN GÓMEZ**

Juetepec, Morelos a 23 de Octubre de 2009

Lugar y fecha

\_\_\_\_\_  
Firma

## ÍNDICE

<b>RESUMEN</b> .....	<b>4</b>
<b>1 INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>5</b>
<b>2 ANTECEDENTES</b> .....	<b>7</b>
2.1 El ambiente y los plaguicidas .....	7
2.2 La Atrazina .....	7
2.3 La Atrazina en el ambiente .....	8
2.3.1 Degradación en suelo .....	9
2.3.2 Degradación en agua .....	10
2.3.3 Efectos en el humano .....	10
2.4 Descripción general de los métodos para la detección de Atrazina .....	10
2.5 Inmunoensayos .....	12
2.5.1 Los anticuerpos .....	14
2.5.2 Los antígenos .....	17
2.5.3 Las enzimas .....	18
2.5.4 Sustratos y cromógenos .....	19
2.6 Fundamento del inmunoensayo .....	21
2.7 Ventajas del ELISA .....	25
<b>3 JUSTIFICACIÓN</b> .....	<b>26</b>
<b>4 HIPÓTESIS</b> .....	<b>27</b>
<b>5 OBJETIVO</b> .....	<b>27</b>
<b>GENERAL</b> .....	<b>27</b>
<b>PARTICULARES</b> .....	<b>27</b>
<b>6 MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	<b>28</b>
6.1 Síntesis y caracterización del hapteno .....	28
6.1.1 Síntesis del hapteno .....	29
6.1.2 Purificación del hapteno obtenido .....	30
6.1.3 Caracterización del hapteno sintetizado .....	30
6.2 Síntesis del marcador enzimático .....	30
6.3 Preparación de las placas de ELISA .....	31
6.4 Procedimiento del inmunoensayo competitivo .....	34
6.5 Tratamiento de los datos .....	36
6.6 Análisis estadístico .....	36
<b>7 RESULTADOS</b> .....	<b>38</b>
7.1 Síntesis y caracterización del hapteno .....	38
7.2 Evaluación del inmunoensayo .....	46
7.2.1 Análisis de los resultados .....	48
7.3 Evaluación del marcador enzimático con los anticuerpos monoclonales .....	54
<b>8 CONCLUSIONES</b> .....	<b>57</b>
<b>9 BIBLIOGRAFÍA</b> .....	<b>58</b>
<b>GLOSARIO</b> .....	<b>62</b>
<b>ANEXO A. Síntesis realizadas para la obtención del hapteno</b> .....	<b>64</b>
<b>ANEXO B. Datos experimentales obtenidos</b> .....	<b>66</b>
<b>ANEXO C. Modelo estadístico Distribución t</b> .....	<b>71</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 2.1</b> Estructura química de la Atrazina -----	7
<b>Figura 2.2</b> Modelo esquemático de una molécula de anticuerpo y un fragmento Fab (Mathews, 2003)-----	15
<b>Figura 2.3</b> Estructura del anticuerpo y sus regiones Fab y Fc -----	16
<b>Figura 2.4</b> Formación de colores por la acción enzimática sobre distintos cromógenos -----	20
<b>Figura 2.5</b> Estructura química del TMB-----	20
<b>Figura 2.6</b> Reacción química llevada a cabo por la peroxidasa y el TMB-----	21
<b>Figura 2.7</b> Fuerzas que participan en la interacción Antígeno-Anticuerpo-----	22
<b>Figura 2.8</b> Inmunoensayo enzimático heterogéneo competitivo (modificado de Danwardt, 1999) -----	24
<b>Figura 6.1</b> Metodología adaptada para la síntesis del hapteno -----	28
<b>Figura 6.2</b> Material utilizado para la síntesis del hapteno -----	29
<b>Figura 6.3</b> Diagrama de los pasos seguidos para realizar la cubierta de anticuerpos -----	32
<b>Figura 6.4</b> Procedimiento a seguir para el ELISA competitivo -----	34
<b>Figura 6.5</b> Esquema representativo de la placa de ELISA -----	35
<b>Figura 7.1</b> Estructura química de la Atrazina ácido caproico -----	38
<b>Figura 7.2</b> Síntesis del hapteno resumida -----	39
<b>Figura 7.3</b> Separación de la fase orgánica y acuosa de la primera etapa de reacción -----	40
<b>Figura 7.4</b> Cromatograma de la mezcla de reacción obtenida en la primera etapa de la reacción -----	40
<b>Figura 7.5</b> Estructura de la molécula esperada al final de la primera etapa de la reacción -----	41
<b>Figura 7.6</b> Espectro de masas de la molécula encontrada al tiempo 19.491 en el cromatograma mostrado en la figura 7.4 -----	42
<b>Figura 7.7</b> Final de la segunda fase de la reacción. a) Ajuste de pH a 3 para finalizar la reacción. b) Apariencia final del compuesto antes de ser filtrado -----	42
<b>Figura 7.8</b> Proceso de filtración del producto final-----	43
<b>Figura 7.9</b> Columna cromatográfica utilizada para la purificación del hapteno	43
<b>Figura 7.10</b> Cromatograma y espectro de masas obtenido para el <i>hapteno 1</i>	44
<b>Figura 7.11</b> Cromatograma y espectro de masas obtenido para el <i>hapteno 2</i>	45
<b>Figura 7.12</b> Matriz utilizada para establecer las condiciones idóneas del ELISA	46
<b>Figura 7.13</b> Reacción de la peroxidasa con el sustrato TMB. a) el primer paso es la adición del TMB dando como resultado una coloración azul que puede ser leído a 370 o 655 nm. b) la reacción se puede detener con H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 2 M dando una coloración amarilla que puede ser leída a 450 nm -----	47
<b>Figura 7.14</b> Curvas de absorbancias promedio de Atrazina -----	48
<b>Figura 7.15</b> Curvas de absorbancias normalizadas -----	49
<b>Figura 7.16</b> Linearización de las curvas de absorbancias -----	50
<b>Figura 7.17</b> Curva de calibración obtenida -----	52
<b>Figura 7.18</b> Dispersión de los valores de absorbancia entre el control negativo y los valores positivos -----	54

**Figura A.1** Síntesis del hapteno. a) Comparación de los productos obtenidos utilizando dos concentraciones de NaOH (60 mM y 120 mM). b) El producto después de evaporar el tolueno. En ningún caso el resultado correspondió con lo esperado

-----64

**Figura A.2** Estructura química de la Propazina -----65

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.1</b> Importaciones de Atrazina durante los últimos años -----	5
(valores en miles de dólares) -----	5
<b>Tabla 2.1</b> Propiedades físicas y químicas de la Atrazina (ATSDR, 2001)-----	8
<b>Tabla 2.2</b> Sistema de enzimas comúnmente utilizadas en los inmunoensayos (Danwardt, 1999) -----	19
<b>Tabla 6.1</b> Reactivos utilizados en la síntesis y purificación del hapteno-----	29
<b>Tabla 6.2</b> Componentes y preparación del buffer PBS para la diálisis-----	31
<b>Tabla 6.3</b> Componentes y preparación del buffer de cubierta-----	31
<b>Tabla 6.4</b> Preparación del buffer PBS-T-----	33
<b>Tabla 6.5</b> Distintos blancos utilizados-----	33
<b>Tabla 7.1</b> Resultados de las absorbancias obtenidas -----	47
<b>Tabla 7.2</b> Coeficiente de variación intraensayo -----	53
<b>Tabla 7.3</b> Absorbancias obtenidas para los diferentes blancos-----	55
<b>Tabla C.1</b> Valores utilizados en la evaluación estadística -----	71

## RESUMEN

Los problemas de contaminación del agua por plaguicidas representan un problema de salud muy grande para las poblaciones. Comúnmente, los métodos de análisis utilizados para su detección corresponden a aquellos de tipo cromatográfico, resultando costosos y complicados. En las últimas décadas se ha incrementado el uso de los inmunoensayos para el mismo propósito, representado una opción productiva y fácil de utilizar.

En este trabajo, se adaptó un método inmunológico ELISA (Análisis Inmunosorbente Ligado a Enzimas) para la detección de Atrazina en agua. La base de este estudio consistió en sintetizar un derivado de Atrazina (hapteno) con propiedades químicas que le permitieran ser utilizado para formar un complejo con una enzima peroxidasa. Este complejo se utilizó como marcador enzimático y su importancia radica en ser el componente que cuantifica la concentración de Atrazina en una muestra a analizar.

Para la síntesis del hapteno se propuso un método que consistió en dos etapas, hasta llegar a la molécula deseada, la 2 cloro-4-(isopropilamino)-6-[(carboxipentil)amino]-s-triazina, mejor conocida como Atrazina ácido caproico. Posteriormente se acopló el hapteno con una peroxidasa para formar el marcador enzimático. Utilizando anticuerpos monoclonales (Abcam®) se evaluó su afinidad como detector de Atrazina, por medio del montaje de la técnica de ELISA de tipo competitivo, donde se requirió evaluar diferentes concentraciones de anticuerpo y marcador enzimático. Con 1 µg/mL de anticuerpo y una dilución de 1:20000 de marcador enzimático, se obtuvieron los resultados más consistentes. Una vez identificadas estas concentraciones se elaboró una curva de calibración en el intervalo de 0.1 a 10 µg/L de Atrazina, atendiendo al límite máximo permitido de Atrazina en agua potable, según la Agencia de Protección al Ambiente de EUA (US EPA por sus siglas en inglés), de 3 µg/L y al valor incluido en la propuesta de modificación a la NOM-127-SSA1-1994 de 2 µg/L.

## 1 INTRODUCCIÓN

El incremento en el uso de plaguicidas, fertilizantes minerales, farmacéuticos, surfactantes y muchas otras sustancias biológicamente activas, termina siendo un problema ambiental. Entre los plaguicidas, aquellos que contienen cloro, se pueden acumular y contaminar los suelos, cuerpos de agua y productos alimentarios. Este tipo de compuestos ejercen efectos tóxicos en el organismo del humano y de animales, por lo que son considerados los contaminantes más importantes de ríos y agua subterránea (Ahmed, 2001).

Un ejemplo de ello es la Atrazina, que actualmente es el herbicida más utilizado en EUA y se utiliza para controlar tanto pastos como especies de plantas de hoja ancha (Trochimowics, 2001). La US EPA estimó que de 31 a 35 millones de kilogramos de Atrazina fueron empleados en cultivos agrícolas en los años 1987, 1993 y 1995 (IARC, 1999).

En México, la Atrazina tiene los siguientes usos registrados (CICOPLAFEST, 1998):

- Uso agrícola: autorizado para el control o combate de malezas en los cultivos de caña de azúcar, maíz, piña y sorgo.
- Uso industrial: exclusivamente para plantas formuladoras.

En la tabla 1.1 se muestra los valores de importación de la Atrazina, cuya fracción arancelaria es 2933.69.09 (SIAVI, 2004).

**Tabla 1.1** Importaciones de Atrazina durante los últimos años  
(valores en miles de dólares)

País de origen	Año						
	1995	1996	1997	1998	1999	2000	2001
<b>Estados Unidos</b>	1,130	140	373	356	437	554	66
<b>Israel</b>	0	0	0	0	0	166	0
<b>Total</b>	1,130	140	373	356	437	720	66

La Atrazina y sus metabolitos (desisopropilatrazina, desetilatrastina y dialkylatrastina) se consideran altamente contaminantes. En Alemania, Italia y otros países de Europa la Atrazina ha sido prohibida para cumplir con normas rigurosas de la Unión Europea sobre el agua potable. Está prohibida en Italia, Alemania, Suecia, Países Bajos, Austria, Hungría y severamente restringida en Reino Unido (OLCA, 2004).



Según la US EPA el límite máximo permisible para Atrazina en agua potable es 3 µg/L y su análisis es llevado a cabo por cromatografía de gases o HPLC (Cromatografía líquida de alta resolución). A pesar de que estos métodos son exactos, realizarlos requiere de tiempo y son costosos. Es por ello que la demanda de métodos eficientes, rápidos y confiables puede ser cubierta por los inmunoensayos. La EPA publicó en el 2007 un método para la cuantificación de Atrazina en agua por inmunoensayo (Método 4670) y cuyo contenido resultó de una evaluación hacia un producto de análisis. La propuesta de este estudio fue adaptar un inmunoensayo ELISA de tipo competitivo para la identificación y cuantificación de Atrazina utilizando un marcador enzimático proveniente de un hapteno sintetizado químicamente.

## 2 ANTECEDENTES

### 2.1 El ambiente y los plaguicidas

La contaminación ambiental es reconocida como un problema a nivel mundial. Parte de ese problema es causado por la aplicación de plaguicidas en el área de agricultura. El término plaguicida es utilizado para nombrar a productos químicos que controlan o eliminan plagas de plantas y animales. Por su uso, se pueden clasificar como herbicidas, insecticidas, fungicidas, biocidas, etc. (Nunes, 2004).

México, por su estructura cultural, es un país que a través del tiempo ha basado su alimentación en la agricultura, hecho que ha desembocado en la utilización de grandes cantidades de plaguicidas para protección de sus cosechas. El objetivo de ellos es mantener una productividad alta en las cosechas, pero como moléculas químicas, presentan cierto grado de toxicidad, además de ser poco degradables y persistentes, lo cual representa un problema de salud.

Existen investigaciones relacionadas con la contaminación ambiental por plaguicidas y sus efectos (Fernández *et al.*, 2004), tanto a nivel nacional como internacional, sin embargo esto no ha contribuido con la toma de medidas al respecto. En México, la legislación sobre el uso de plaguicidas sólo está planteada como iniciativas, las cuales en muchas ocasiones no son llevadas a cabo. Probablemente esa falta de interés se deba a que sus efectos no son notorios en la población o bien son ignorados.

### 2.2 La Atrazina

La Atrazina (figura 2.1) fue registrada por primera vez en 1958 (Ribaud y Bouzaher, 1994) y desde entonces ha sido ampliamente utilizada como un efectivo herbicida para controlar o evitar el crecimiento de malezas en cultivos de maíz, sorgo y caña de azúcar, entre otros; así como en plantaciones de pinos, en áreas reforestadas y a lo largo de carreteras o vías de ferrocarril.

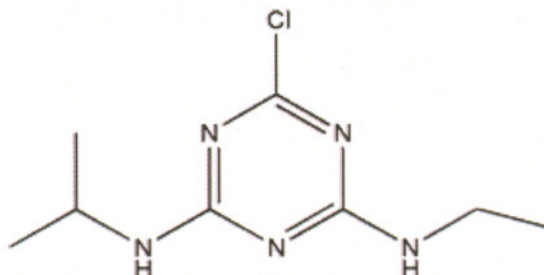
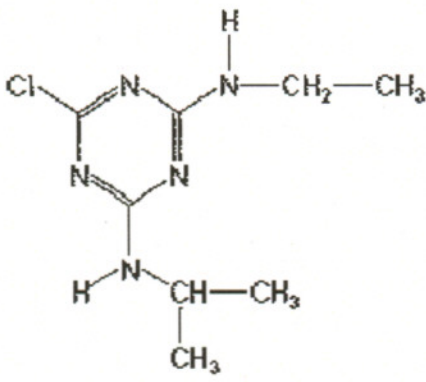


Figura 2.1 Estructura química de la Atrazina

La Atrazina es el herbicida más utilizado en los Estados Unidos con un promedio de 51 millones de libras del ingrediente activo aplicadas por año. El compuesto grado técnico se comercializa en forma de suspensión, polvo o gránulos y tiene una pureza de entre 92% y 99.9% (US EPA, 1983; IARC, 1999). Las impurezas presentes en estas formulaciones incluyen: diclorotriazinas, hidroxitriazinas y tris(alquil)aminotriazinas (ATSDR, 2001).

La Atrazina grado técnico es un polvo cristalino incoloro que fácilmente se disuelve en sulfóxido de metilo (183 g/L), es estable en estado seco, pero se hidroliza el análogo 2-hidroxiatrazina, inactivo desde el punto de vista herbicida, en ácido o en soluciones alcalinas y con más lentitud en soluciones acuosas neutras, aún con temperaturas elevadas (tabla 2.1).

**Tabla 2.1** Propiedades físicas y químicas de la Atrazina (ATSDR, 2001)

<b>Estructura química</b>		<b>Solubilidad en otros compuestos</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ En DMSO 183 g/kg</li> <li>▪ En cloroformo 52 g/kg</li> <li>▪ En acetato de etilo 28 g/kg</li> <li>▪ En metanol 18 g/kg</li> <li>▪ En dietil éter 12 g/kg</li> <li>▪ En pentano 0.36 g/kg</li> </ul>
<b>Fórmula química</b>	$C_8H_{14}ClN_5$	<b>Densidad específica</b>	1.23 g/cm <sup>3</sup> a 22°C
<b>Peso molecular</b>	215.69	<b>Presión de vapor</b>	$2.89 \times 10^{-7}$ mm Hg a 25°C
<b>Clasificación</b>	Triazina	<b>Solubilidad en agua</b>	34.7 mg/L a 26°C
<b>Tipo de plaguicida</b>	Herbicida	<b>Punto de fusión</b>	entre los 175 y 177°C
<b>Uso</b>	Agrícola e industrial	<b>Constante de la Ley de Henry</b> $2.96 \times 10^{-9}$ atm m <sup>3</sup> /mol a 25°C	
<b>Apariencia</b>	Polvo incoloro e inodoro.		
<b>Esta sustancia al calentarse se descompone produciendo gases tóxicos que incluyen el Cloruro de hidrógeno y óxidos de nitrógeno</b>			

### 2.3 La Atrazina en el ambiente

La Atrazina, como muchos otros herbicidas, puede incorporarse al ambiente de muchas maneras. Una vez aplicada en el suelo, la Atrazina puede ser incorporada a fuentes de aguas superficiales por medio del escurrimiento y también ser llevada a aguas

subterráneas por infiltración del suelo o permanecer en el suelo gracias a procesos de absorción.

La Atrazina es liberada al ambiente principalmente durante su aplicación en los campos de cultivo, terrenos en barbecho o a lo largo de las vías de comunicación; sin embargo, también puede liberarse durante su producción y distribución (ATSDR, 2001; TRI99, 2001). El compartimiento ambiental receptor más importante, en el caso de la Atrazina, es el suelo dada su aplicación directa sobre el mismo o sobre los cultivos. No obstante, una fracción entre 2.4 y 14% de la Atrazina aplicada se volatiliza a la atmósfera (Glotfelty *et al.*, 1989; Weinhold y Gish, 1994). Una vez en el aire, puede ser transportada hasta sitios lejanos y regresar nuevamente a la tierra con la lluvia. Con los escurrimientos provenientes de las zonas agrícolas o con las precipitaciones pluviales, la Atrazina puede llegar a ríos, corrientes, lagos, marismas y al océano, contaminando sus aguas y sedimentos (Bester y Huhnerfuss, 1993; Gaynor *et al.*, 1995; Meakins *et al.*, 1995). Este herbicida puede ser también transportado a través del suelo, llegando a las aguas subterráneas, contaminando pozos de agua para el consumo humano (Southwick *et al.*, 1995; Redondo *et al.*, 1997). Asimismo, existen evidencias de su absorción por las raíces de las plantas y por algunos animales del suelo como las lombrices de tierra (Koskinen y Clay, 1997).

La Atrazina presenta una persistencia superior a tres meses y su degradación química o biológica en los diferentes compartimientos del ambiente es muy lenta (Fernández *et al.*, 2004). Se ha demostrado que, prácticamente no sufre fotodescomposición en el aire o en el agua, aunque puede sufrir reacciones de oxidación con radicales hidroxilo en la atmósfera (Pellizzetti *et al.*, 1990). Este herbicida puede ser metabolizado por algunos microorganismos, sin embargo, este proceso suele ser lento (Mandelbaum *et al.*, 1993; Feakin *et al.*, 1994; Seybold *et al.*, 1999). Asimismo, su tendencia a adsorberse fuertemente al suelo puede limitar su biodisponibilidad para los microorganismos degradadores (Seybold *et al.*, 1999).

### 2.3.1 Degradación en suelo

En suelo, la Atrazina es degradada por distintas vías y procesos consecutivos, los cuales dealquilan (remoción de los grupos alquil de un compuesto) las cadenas laterales e hidrolizan sustituyendo al cloro. Los principales metabolitos son la de-etil-atrazina y la hidroxiatrazina, que usualmente se encuentran en niveles tan bajos como el 10% del material aplicado. Las propiedades específicas de cada suelo (naturaleza del material húmico, textura del suelo, composición mineral, actividad microbiana) determinan cuáles metabolitos predominan. Todos los demás metabolitos son de menor importancia y sólo están presentes en cantidades menores al 1% de la cantidad inicial. Además, los procedimientos de degradación vía hidrólisis de los grupos aminos, producen ammelina (4,6-Diamino-2-hidroxi-1,3,5-triazina), ammelida (6-Amino-2,4-Dihidroxi-1,3,5-triazina) y Ácido cianúrico, los cuales sufren la división del anillo y una mineralización subsiguiente (Maqbool, 2002).

La hidrólisis química de la Atrazina tiene lugar por catálisis en la superficie del suelo, hasta un punto que depende de las propiedades del suelo. La hidroxiatrazina es sólo un producto hidrolítico. La fotólisis directa de la Atrazina es lenta; la fotólisis indirecta inducida por compuestos fotosensibles tales como la humina, puede jugar un papel importante en la superficie.

### 2.3.2 Degradación en agua

La degradación de Atrazina en los sistemas acuáticos sigue una vía similar a la que se observa en la degradación en suelo ya que se lleva a cabo la dealquilación y la formación de hidroxiatrazina como procesos dominantes. La formación de los residuos unidos a sedimentos es muy importante. La hidrólisis no tiene lugar en grado apreciable en agua pura o solución buffer. Sin embargo la hidrólisis se lleva a cabo en presencia de sedimentos, por lo que la hidrólisis química sólo es un camino potencial del metabolismo en sistemas acuáticos si los sedimentos están presentes. Esto conduce exclusivamente a la hidroxiatrazina. Los procesos biológicos son importantes, sin embargo, la degradación microbiana no es el único proceso de degradación: la degradación bajo condiciones anaerobias y estériles es más lenta, pero importante (Hang y Nassetta, 2003).

### 2.3.3 Efectos en el humano

Aunque la US EPA (2009) ha clasificado a la Atrazina como un “no carcinógeno” en humanos, también lo ha catalogado como causante de afectaciones a la salud, sobre todo cuando las personas se encuentran expuestas a niveles altos del contaminante (mayores al Maximum Contaminant Level o MCL) por periodos relativamente cortos de tiempo. Esos efectos pueden ser: congestión de corazón, pulmones y riñones, baja presión sanguínea, espasmos musculares, pérdida de peso y daño a glándulas. La exposición a niveles más allá de los MCL puede causar la pérdida de peso, daño cardiovascular, degeneración de retina y muscular, así como cáncer.

## 2.4 Descripción general de los métodos para la detección de Atrazina

Según la US EPA, el MCL de Atrazina para agua potable es de 3 µg/L. Los niveles máximos de Atrazina que la EPA permite en alimentos varían entre 0.02 y 15 ppm. Para poder minimizar los riesgos de salud debido a la exposición a corto plazo, el agua potable debe estar en constante supervisión y monitoreo, para así responder con rapidez en caso de riesgo. Esto puede ser llevado a cabo por métodos convencionales tales como la cromatografía líquida de alta eficacia o HPLC, por sus siglas en inglés, cromatografía de gases o cromatografía de gases/espectrometría de masas (GC/MS). Sin embargo, esos métodos son costosos, sofisticados, gastan mucho tiempo de

análisis y requieren gases altamente purificados disolventes de alta pureza y en gran volumen. La cromatografía de gas-líquida o GLC (por sus siglas en inglés), es utilizada para determinar plaguicidas no polares, mientras que la cromatografía líquida es utilizada para determinar plaguicidas polares y no volátiles (Ahmed, 2001). La cromatografía de capa fina (Sherma, 2003), el análisis de inyección en flujo (Dunec *et al.*, 2003) y la electroforesis capilar (Picó *et al.*, 2003) son también utilizados.

El monitoreo frecuente de Atrazina puede resultar un método costoso y que requiere de mucho tiempo en laboratorio. A pesar de que la instrumentación cromatográfica está en continuo desarrollo, haciendo los procesos más sensibles y precisos, los costos continúan siendo elevados, con la limitante adicional de que las técnicas cromatográficas son inadecuadas para realizar monitoreos rápidos bajo condiciones de campo.

Otro tipo de técnicas utilizadas incluye un método basado en análisis de inyección de flujo con detección micelar de fluorescencia para la determinación del 2,4-D (García-Campaña *et al.*, 2001), así como un método que usa una membrana de electrodo PVC para el pentaclorofenolato (Abbas *et al.*, 2001). Estos métodos dan la oportunidad de determinar los contaminantes más rápidamente, sin embargo resultan ser inadecuados, hasta ahora, por su falta de sensibilidad y alto costo.

Recientes investigaciones se han encaminado en desarrollar métodos sencillos y rápidos, que posibiliten su uso en los lugares más apartados y con peores condiciones de trabajo, para así vencer las dificultades que se presentan en la actualidad con la adquisición de equipos y reactivos, encontrando a los inmunoensayos como la mejor alternativa. Las especificaciones de los inmunoensayos no sólo los colocan como técnicas poco costosas, sino que han sido usados desde hace muchos años, sobre todo en el área de medicina. Es por ello que hace más de una década se logró adaptar esta técnica para estudios ambientales. Los inmunoensayos son pruebas bioquímicas basadas en el reconocimiento de un antígeno o hapteno por anticuerpos.

La evaluación de las técnicas analíticas disponibles, comúnmente utilizadas en términos de productividad, costo y precisión, han demostrado que los métodos de análisis inmunoquímicos son más convenientes económicamente hablando, para procesar muestras ambientales (Meulenberg, 1999; Koester *et al.*, 2003; Richardson, 2003; Maqbool *et al.*, 2008). Sin embargo, dentro de las desventajas que los métodos inmunoquímicos presentan, se puede mencionar el efecto que cada componente puede tener, causado por efecto de la matriz. Al mismo tiempo, la determinación de un grupo de sustancias en lugar de un sólo compuesto, es ahora de gran interés en monitoreos ambientales. Los anticuerpos que se han producido y las técnicas de inmunoensayo que han sido desarrolladas en años recientes para análisis específicos de sustancias, hacen posible la determinación de las concentraciones de una clase entera de compuestos con estructuras y propiedades similares. Por ejemplo, plaguicidas del grupo triazina, herbicidas de los grupos de sulfonilurea (Kolar *et al.*, 2002) y benzoil-fenil urea (Wang *et al.*, 1998) en la muestra a analizar.

Los métodos inmunoquímicos son altamente confiables y no requieren de instrumentación costosa pues la mayoría de ellos están basados en la detección fotométrica, fluorimétrica, luminosa o electroquímica, que son evaluaciones meramente visuales (Morozova *et al.*, 2005). Los métodos inmunoquímicos son ampliamente utilizados en la práctica analítica, en varias ramas de la medicina y en las industrias microbiológicas y alimentaria (Luppa *et al.*, 2001; Liu *et al.*, 2003), tanto que han sido exitosamente aplicados para la detección de virus, hormonas y fármacos en diagnósticos médicos por años. Aproximadamente una década atrás, las técnicas cromatográficas dominaron esta área, sin embargo, un cromatógrafo es actualmente usado en laboratorios de diagnóstico médico sólo en casos específicos, cuando los resultados obtenidos por métodos inmunoquímicos requieren de confirmación. Los métodos inmunoquímicos han incrementado su uso para monitoreos ambientales, sin embargo no son tan utilizados como las técnicas cromatográficas.

El inmunoensayo enzimático de adsorción o ELISA (Enzyme-linked immuno-sorbent assay) ocupa una posición líder entre los métodos inmunoquímicos utilizados. Cerca del 90% de los métodos inmunoquímicos utilizados para detectar plaguicidas son de tipo ELISA (Gabaldon *et al.*, 1999). En el inmunoensayo enzimático, la especificidad única de los análisis inmunoquímicos está combinada con la alta sensibilidad de la detección de un marcador enzimático.

## 2.5 Inmunoensayos

El inmunoensayo es una prueba que usa complejos de anticuerpo y antígeno como medio para generar un resultado perceptible. Un complejo antígeno-anticuerpo también es conocido como inmuno-complejo. "Inmuno" se refiere a una respuesta inmunológica que hace que el cuerpo genere anticuerpos, y "ensayo" se refiere a una prueba. Entonces, un inmunoensayo es una prueba que utiliza inmunocomplejos cuando se unen los anticuerpos y los antígenos.

Los inmunoensayos se diferencian de otros tipos de pruebas de laboratorio, como las pruebas colorimétricas, ya que usan complejos anticuerpo-antígeno para generar una señal que pueda medirse. En oposición, la mayoría de las pruebas de rutina de química utilizan reacciones químicas entre el reactivo (solución de sustancias químicas u otros agentes) y la muestra para generar un resultado de la prueba.

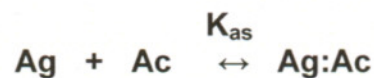
Existen diferentes técnicas de análisis basados en la unión de un antígeno (el plaguicida) a anticuerpos específicos. Los inmunoensayos son técnicas analíticas útiles para la separación, detección y cuantificación de analitos orgánicos e inorgánicos en diferentes ambientes y matrices.

Los procedimientos de inmunoensayos han sido desarrollados para un número de plaguicidas (Ercegovich *et al.*, 1981; Fatori y Hunter, 1980; Gee *et al.*, 1988; Newsome y Shields, 1981; Wie y Hammock, 1982; Wie *et al.*, 1982; Newsome, 1986). Además, el ELISA ha sido desarrollado para Atrazina y otros herbicidas triazínicos (Bushway *et al.*,

1988; Huber y Hock, 1985). Bushway *et al.* (1988) desarrolló un ensayo para Atrazina utilizando un conjugado hapteno/proteína que fue preparado primero derivatizando la Atrazina en la posición del cloro y después uniéndola covalentemente a una albúmina bovina (BSA). Otro ensayo es el desarrollado por Huber y Hock (1985), donde se muestra la síntesis de un hapteno a partir de terbutrina, convirtiéndola a terbutrina sulfóxido y uniéndola a proteínas acarreadoras (hemocianina y BSA). Los ensayos para el herbicida triazina citados con anterioridad mostraron reactividad cruzada para un número diferente de compuestos de triazina.

Los productos de evaluación (kits comerciales), presentan protocolos de inmunoensayo que son rápidos, simples y portátiles. Estos productos pueden ser utilizados exitosamente tanto en laboratorio como en campo, además de requerir un conocimiento limitado. Una ventaja que ofrecen está relacionada con la capacidad de analizar un mayor número de muestras de manera simultánea y en un corto periodo de tiempo.

Los productos de inmunoensayo utilizan una molécula de anticuerpo que detecta y cuantifica una sustancia en una muestra de prueba, haciendo uso de sus características de unión específica del anticuerpo con la detección química que produce una respuesta detectable utilizada para interpretar resultados. La naturaleza de este principio es la base de algunas de las técnicas analíticas más antiguas, como la inmunodifusión y la inmunoelectroforesis. Los métodos inmunoquímicos, incluido el ELISA, están basados en la unión reversible de un antígeno a un anticuerpo, el cual está especialmente hecho para un analito dado:



donde Ac es un anticuerpo específico, Ag es el antígeno, Ag:Ac es el complejo antígeno-anticuerpo y  $K_{as}$  es la constante de formación del complejo.

En la **inmunodifusión**, se llenan los pocillos excavados en una placa de agar con antígeno y anticuerpo, que difunden el uno hacia el otro en el agar. Cuando las sustancias se encuentran, una reacción de precipitina forma un precipitado insoluble, que puede observarse bien directamente o tras una tinción con azul de Coomassie o un colorante de proteínas similar. Esta técnica puede emplearse para comparar diferentes antígenos (Mathews *et al.*, 2003).

La **inmunoelectroforesis** permite el análisis de mezclas más complejas de antígenos y anticuerpos. Las proteínas de una mezcla compleja, como el suero, se someten a una electroforesis, tras lo cual se aplica un anticuerpo en una depresión o hueco. Este método produce múltiples reacciones de precipitina en un experimento, y con variaciones relativamente sencillas puede adaptarse para cuantificar los antígenos de una muestra (Mathews *et al.*, 2003).

Otra técnica analítica útil para caracterizar proteínas es la **transferencia Western**, denominada así por su semejanza superficial con una técnica analítica para ácidos nucleicos a la que se llama transferencia Southern. La transferencia Western



(denominada más recientemente inmunotransferencia) se emplea para detectar, en una mezcla de proteínas o fragmentos de proteínas, las que reaccionan con el mismo anticuerpo.

En la actualidad, el Análisis Inmunsorbente Ligado a Enzimas (**ELISA**) se utiliza de manera mucho más general para cuantificar las reacciones antígeno-anticuerpo. Se emplea un reactivo de entrecruzamiento para acoplar covalentemente una enzima a un anticuerpo que se utiliza para analizar una sustancia concreta. La enzima elegida es una cuya actividad pueda determinarse con facilidad con una técnica espectrofotométrica. Aunque este método tiene muchas variaciones, el principio es analizar los anticuerpos unidos midiendo la actividad de la enzima conjugada.

Para realizar un ELISA, uno de los componentes de la reacción inmune es usualmente inmovilizado en una fase sólida para la separación de las fracciones de antígeno libre y unidas; esto también es llamado método heterogéneo de análisis. Como acarreadores son usadas placas de 96 pozos principalmente de poliestireno (Kolar *et al.*, 2002). El uso de esferas de poliestireno, partículas magnéticas y tubos de vidrio modificado, también ha sido reportado. Esos materiales incrementaron la superficie y capacidad de sorción de una fase sólida y por eso incrementaron la sensibilidad del ELISA. Los principales tipos de acarreadores de fase sólida fueron caracterizados por Dankwardt (1999).

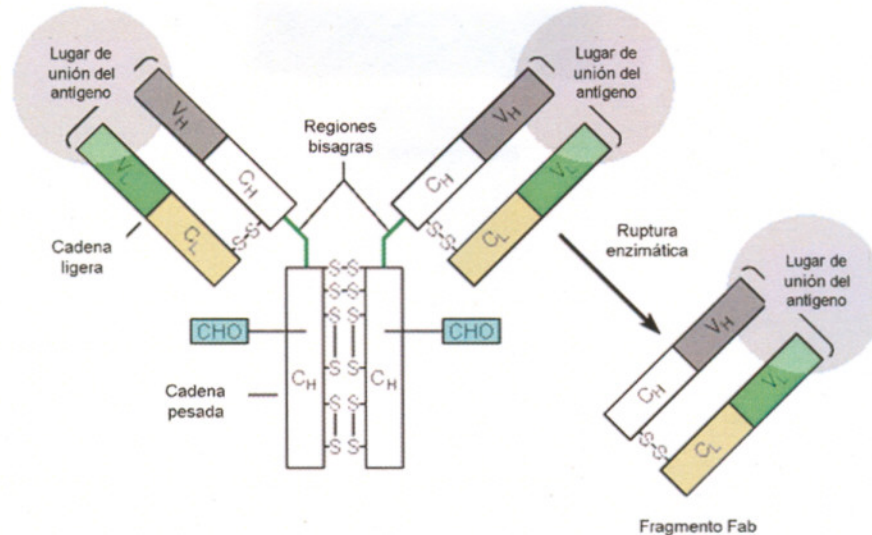
Existen muchos ejemplos de aplicaciones del ELISA para el monitoreo ambiental. Entre otros existen sistemas de análisis de plaguicidas, dioxinas, hormonas, etc. Los kits de ELISA para determinación de plaguicidas se producen comercialmente e incluyen todos los componentes que se requieren para la determinación de los mismos en laboratorio y en campo. Sin embargo, el ELISA exhibe algunos atributos negativos, entre los que se puede mencionar la posibilidad de uniones no específicas entre los componentes del ELISA a lo largo del tiempo de análisis, ya que la reacción antígeno-anticuerpo en la superficie toma mucho tiempo en completarse, aproximadamente una hora.

### 2.5.1 Los anticuerpos

Los anticuerpos son los componentes clave en los inmunoensayos, y éstos pueden ser de origen policlonal (derivados del suero de un animal después de haber sido inmunizado con un antígeno) o anticuerpos monoclonales (derivados de un cultivo celular) (Morozova *et al.*, 2005).

Los anticuerpos son parte del sistema defensivo de los vertebrados y son glicoproteínas del suero de la clase de las inmunoglobulinas (Ig) producidas por el sistema inmune contra materiales extraños tales como patógenos o xenobióticos y se unen a la sustancia blanco con gran afinidad y selectividad. En mamíferos superiores existen cinco clases distintas de anticuerpos (IgA, IgD, IgE, IgG, IgM), siendo las IgG quienes forman la mayor parte del suero en los humanos. La principal inmunoglobulina en los

inmunoensayos es la IgG. Sin embargo todas ellas se construyen a partir del mismo patrón de inmunoglobulina básica (figura 2.2).

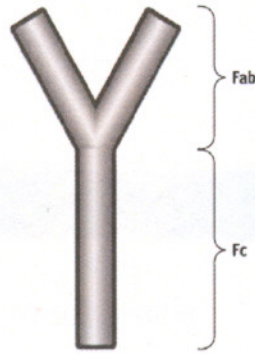


**Figura 2.2** Modelo esquemático de una molécula de anticuerpo y un fragmento Fab (Mathews, 2003)

Las distintas clases de anticuerpos pueden contener de una a cinco moléculas de inmunoglobulina; cuando hay más de una, los monómeros están unidos por un segundo tipo de polipéptido denominado cadena J. Cada monómero de inmunoglobulina está formado por cuatro cadenas, dos cadenas pesadas (H) y dos cadenas ligeras (L) que se mantienen unidas mediante enlaces disulfuro (figura 2.2). En cada cadena existen dominios constantes (idénticos para todos los anticuerpos de una clase determinada) y un dominio variable (son las variaciones de la secuencia de aminoácidos y confieren especificidad frente a un determinante antigénico concreto). Un dominio es una parte de una cadena polipeptídica que se pliega sobre sí misma para formar una unidad compacta que continúa siendo reconocible dentro de la estructura terciaria de toda la proteína.

Como se observa en la figura 2.2, los cuatro dominios variables ( $V_H$ ,  $C_H$ ,  $V_L$ ,  $C_L$ ) se encuentran en los extremos de la estructura del anticuerpo, donde forman dos lugares de unión para los determinantes antigénicos. Las proteínas poseen varios determinantes antigénicos, es decir, regiones que pueden ser reconocidas por los anticuerpos específicos para esa región.

La estructura del anticuerpo (figura 2.3) está dividida en región Fab (fragmento correspondiente a la región variable, explicada con anterioridad) y región Fc (región de estructura constante).



**Figura 2.3** Estructura del anticuerpo y sus regiones Fab y Fc

La producción de anticuerpos de alta afinidad es uno de los problemas más complicados en el desarrollo de los métodos inmunoquímicos, sobre todo si los anticuerpos hacia un plaguicida en particular son desconocidos.

Los anticuerpos producidos por los linfocitos B de los animales como una respuesta a la introducción de sustancias extrañas (antígenos) en el organismo, son llamados anticuerpos policlonales. Los anticuerpos policlonales son aislados del suero (antisuero) de animales inmunizados y son proteínas de la clase inmunoglobulinas, heterogéneas en sus propiedades fisicoquímicas, principalmente en su especificidad y afinidad. El éxito de la inmunización depende significativamente de las siguientes condiciones:

- La inmunogenicidad del conjugado, el cual depende de la solubilidad, el peso molecular y el hapteno.
- Procedimiento de inmunización
- Presentación del antígeno (con o sin adyuvante, una sustancia para realzar la respuesta inmune).
- Modo de introducción del antígeno al organismo, dosis y tiempos de inmunización.
- Especies de animales inmunizados.

En años recientes, se han obtenido anticuerpos policlonales de alta calidad para un número de plaguicidas, cuyo uso se ha enfocado principalmente en el desarrollo de ELISA.

Los antisueros policlonales para experimentos son obtenidos comúnmente de la inmunización de conejos, aunque recientemente se ha utilizado la inmunización en ovejas. La producción de anticuerpos policlonales no es una labor difícil y no requiere de fundamentos considerables, equipos sofisticados o reactivos especiales.

Junto con los antisueros policlonales, los anticuerpos monoclonales son utilizados en métodos inmunes para determinar plaguicidas. Los anticuerpos monoclonales son preparados utilizando el sistema inmune de ratón, seguido por la aplicación de

tecnologías de hibridomas. Los anticuerpos monoclonales son idénticos en sus propiedades fisicoquímicas y en su especificidad.

### 2.5.2 Los antígenos

Se le llama antígeno a toda sustancia que después de haber sido inyectada en el cuerpo de un animal induce la síntesis específica de anticuerpos. Principalmente, los antígenos son macromoléculas, por ejemplo las proteínas, polisacáridos o ácidos nucleicos. Sin embargo, existen otro tipo de sustancias que son moléculas pequeñas llamadas **haptenos** (por ejemplo, los plaguicidas y aflatoxinas). Para generar una respuesta con anticuerpos, las moléculas pequeñas tienen que ser acopladas a un acarreador macromolecular (una proteína como la albúmina bovina).

La síntesis de haptenos para el desarrollo de un inmunoensayo fue estudiada por Harrison *et al.* (1991). Ellos observaron que la producción de anticuerpos específicos requiere de la presentación en forma conjugada (con una proteína acarreadora) del plaguicida a un sistema inmune animal. Para lograrlo, se necesita del diseño de una estructura química apropiada (en este caso un hapteno modificado) el cual pueda ser acoplado covalentemente a un acarreador y que pueda llevar a cabo la producción de anticuerpos. Si los haptenos contienen grupos activos tales como  $-\text{COOH}$ ,  $-\text{NH}_2$ ,  $-\text{OH}$ , pueden reaccionar directamente con las proteínas acarreadoras para formar los antígenos artificiales deseados. Es posible también hacer modificaciones estructurales para introducir grupos activos en posiciones apropiadas a las estructuras, según sea requerido. Se puede obtener una mayor especificidad acoplando el hapteno a su acarreador por medio de un brazo espaciador, por lo que se obtiene una mayor exposición del hapteno en la superficie del acarreador.

Muchos son los haptenos que han sido producidos para ser utilizados como compuesto blanco, construyéndose así moléculas con estructuras adecuadas para ser reconocidas por un sistema inmune.

Dentro de los inmunoensayos, el componente más importante son los anticuerpos, los cuales deben presentar una máxima especificidad y sensibilidad para un hapteno blanco. Dentro de la inmunología, los haptenos no permiten por si mismos obtener una respuesta inmune, ya que su peso molecular es muy bajo ( $<1000$  Da). Es por eso que deben ser unidos de forma covalente a acarreadores apropiados y formar así conjugados inmunogénicos artificiales que induzcan indirectamente a las células B (linfocitos B, los encargados de la respuesta inmunitaria en mamíferos) y así producir anticuerpos hapteno-específico.

Los haptenos ideales son aquellos que al formar un conjugado con una proteína son capaces de inducir una respuesta inmune y como resultado producen anticuerpos de alta calidad y especificidad. Al ser diseñados, la estructura química final y su estereoquímica podrían ser idénticas o al menos similares a los haptenos originales. La mayoría de los haptenos ideales se caracterizan por lo siguiente: un grupo amino, un carboxilo o ambos.

### 2.5.3 Las enzimas

Con el fin de desarrollar un método cuantitativo o semicuantitativo, los inmunoensayos requieren el uso de material marcado para así medir la concentración del antígeno presente. Estas marcas son moléculas que reaccionan como parte del ensayo y generan un cambio de señal que puede ser medido. Las enzimas son un ejemplo de compuesto que hace que haya un cambio de color de una solución o sustancia, permitiéndoles ser utilizadas en los ELISA (Maqbool, 2002). Ejemplo de ello son la peroxidasa de rábano (HRP), la fosfatasa alcalina (AP) y la  $\beta$ -galactosidasa. La peroxidasa es comúnmente usada como marcador enzimático o trazador; la fosfatasa alcalina es utilizada en raras ocasiones y otras enzimas tales como la  $\beta$ -galactosidasa (Dankwardt, 1999, tabla 2.2) y la glucosa oxidasa (Benkert *et al.*, 2000) son usadas sólo ocasionalmente. Varias técnicas son utilizadas en ELISA para evaluar la actividad enzimática: la espectrofotometría es la técnica más difundida; las técnicas de quimioluminiscencia y fluorescencia (las cuales son más sensibles) son también utilizadas.

Los factores como la pureza, la actividad específica, la sensibilidad en la detección del sustrato, la conjugación, eficacia después de la conjugación y la estabilidad del conjugado afectan la elección del marcador para el ensayo. Las enzimas se encuentran unidas a uno de los componentes del inmunoensayo.

**Tabla 2.2** Sistema de enzimas comúnmente utilizadas en los inmunoensayos  
(Danwardt, 1999)

Enzima	Fuente	Peso molecular	pH óptimo	Sustratos colorimétricos	Sustratos fluorométricos	Sustratos luminométricos
Fosfatasa alcalina	Intestino de ternera	100 000	9-10	<i>p</i> -Nitrofenilfosfatasa	4-Metilumbeliferilfosfatasa	Adamantil-1,2-dioxietano  Fenilfosfato-dioxietano sustituido
$\beta$ -galactosidasa	<i>Escherichia coli</i>	540 000	6-8	<i>o</i> -Nitrofenil- $\beta$ -D-galactopiranosida  Rojo clorofenólico- $\beta$ -D-galactopiranosida	4-Metilumbeliferil- $\beta$ -D-galactopiranosida	-
Peroxidasa	Rábano	40 000	5-7	2,2'-azino-di(3-etil-benzotiazolina ácido sulfónico-6)(ABTS)/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>  3,3'-5,5'-tetrametil-benzidina (TMB)/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>  <i>o</i> -fenilendiamina (OPD)/H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	<i>p</i> -hidroxifenil-ácido acético  <i>p</i> -hidroxifenil-ácido propionico	Luminol

Los factores como la pureza, la actividad específica, la sensibilidad en la detección del sustrato, la conjugación, eficacia después de la conjugación y la estabilidad del conjugado afectan la elección del marcador para el ensayo. Las enzimas se encuentran unidas a uno de los componentes del inmunoensayo.

#### 2.5.4 Sustratos y cromógenos

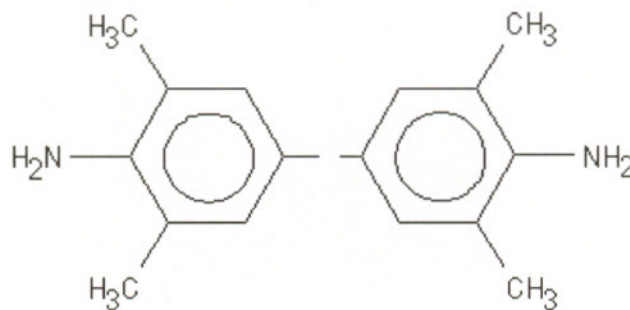
Las enzimas utilizadas en los inmunoensayos no podrían producir color alguno en ausencia de un sustrato. Diferentes tipos de sustratos y cromógenos han sido utilizados para reaccionar con una variedad de enzimas (Maqbool, 2002). Por ejemplo, los sustratos más utilizados son el peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) para la HRP, *para*-nitrofenil fosfato para AP y  $\beta$ -galactosa para  $\beta$ -galactosidasa. Los sustratos

comúnmente usados son el ABTS, el 5-AS, el OPD y el 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB) (figura 2.4).



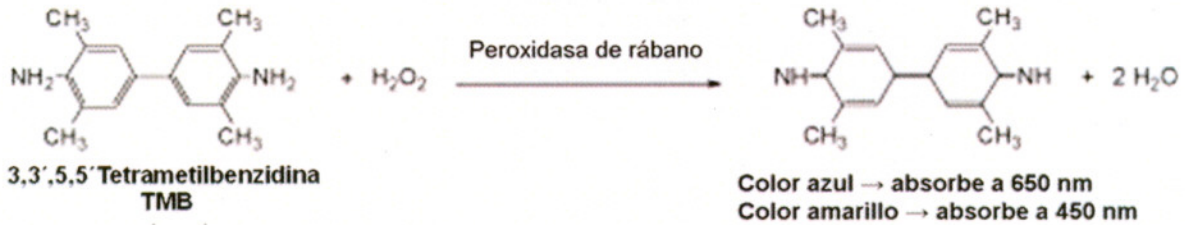
**Figura 2.4** Formación de colores por la acción enzimática sobre distintos cromógenos

Para el caso de la peroxidasa, cuyo sustrato es TMB (figura 2.5), se produce un color azul que puede ser medido espectrofotométricamente a 650 nm. Además, la reacción puede ser detenida con Ácido sulfúrico 2M y leerse a 450 nm, en este caso el producto de la reacción se convierte en amarillo, esto realza la sensibilidad de la reacción de 2 a 4 veces.



**Figura 2.5** Estructura química del TMB

El TMB es oxidado durante la degradación enzimática del  $H_2O_2$  por la peroxidasa (figura 2.6). El producto oxidado del TMB tiene un color azul. El color amarillo se forma después de la adición de la solución de paro (en este caso del Ácido sulfúrico). La concentración de las muestras desconocidas se determinará por medio de una curva de calibración.



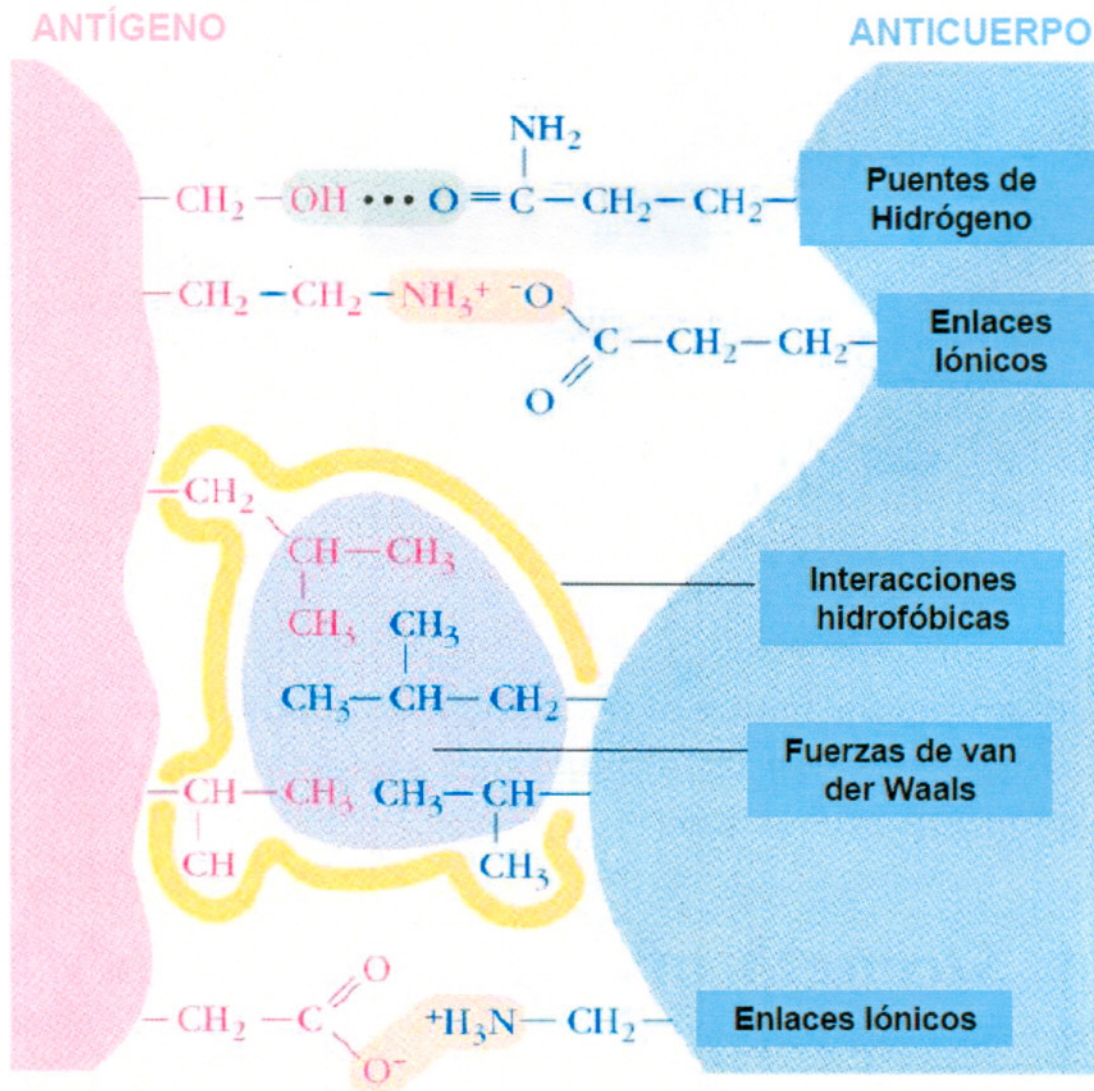
**Figura 2.6** Reacción química llevada a cabo por la peroxidasa y el TMB

## 2.6 Fundamento del inmunoensayo

El análisis inmunoquímico está basado en la reacción específica entre un anticuerpo (Ac) y su antígeno correspondiente (Ag). La habilidad de una molécula de anticuerpo para unirse específicamente a un antígeno es controlada por las interacciones químicas y estructurales entre el ligando y los anticuerpos en el sitio de combinación.

La interacción Ag-Ac es reversible y no involucra formación alguna de uniones covalentes (figura 2.7). La unión se da como resultado de una variedad de interacciones tales como hidrofóbicas, iónicas y fuerzas de Van der Waals. La energía de unión se incrementa con el número de interacciones químicas específicas entre el analito y los residuos de aminoácidos en el sitio de unión del Ac, por lo que la selectividad y sensibilidad de un inmunoensayo están controladas por la naturaleza del proceso de unión Ag-Ac.





**Figura 2.7** Fuerzas que participan en la interacción Antígeno-Anticuerpo

Las técnicas de inmunoensayos se clasifican como competitivos y no competitivos, y como homogéneos y heterogéneos. La medición del analito en un inmunoensayo se logra usando el formato tanto competitivo como el no competitivo. En los formatos competitivos, el analito sin marcar en la muestra (generalmente antígeno) se mide por su capacidad para competir con un antígeno marcado en el inmunoensayo. El antígeno sin marcar bloquea la capacidad del antígeno marcado a unirse, puesto que ese punto de unión en el anticuerpo ya se encuentra ocupado. Para analitos de bajo peso molecular (haptenos) tales como plaguicidas en disolución, se deben emplear análisis de tipo competitivo, utilizando concentraciones de anticuerpos muy bajas.

Los formatos de ensayo no competitivos generalmente proporcionan el nivel más alto de sensibilidad y especificidad del ensayo y se aplican a la medición de analitos críticos en el área médica. Este tipo de formato es conocido como ensayo "sandwich" ya que el analito está unido (como un sandwich) entre dos reactivos de anticuerpo muy específicos.

El análisis puede realizarse como un ensayo homogéneo sin la separación de los reactivos, pero los más comunes son los análisis heterogéneos donde los reactivos sin reaccionar son eliminados antes de la medición.

El fundamento de un inmunoensayo competitivo, se basa en el uso de una cubierta de anticuerpos. En el primer paso, los anticuerpos deben ser adsorbidos a una fase sólida (por ejemplo a los pozos de las microplacas), lo cual se conoce como paso de cubierta. La inmovilización está basada en la adsorción pasiva de los anticuerpos a una superficie plástica (por ejemplo poliestireno). La adición del analito (hapteno) a los anticuerpos unidos a la placa de ELISA, es la fase del proceso que está determinada por la especificidad de los componentes que interaccionan. La posterior adición del trazador, obliga a ambos componentes a competir (de acuerdo a su concentración) por los sitios de unión libres de los anticuerpos. Después de remover los reactivos sin unir, se adiciona el sustrato que reaccionará con la enzima que forma parte del trazador, así producirá una señal que es inversamente proporcional a la concentración del analito.

El inmunoensayo de tipo competitivo también presenta el formato de inmovilización del analito en una fase sólida en la cual se adiciona los anticuerpos y posteriormente los anticuerpos marcados enzimáticamente. Los analitos se unen a los anticuerpos libres de acuerdo a la concentración de los reactivos (tanto analito como trazador). Si se utiliza un anticuerpo marcado, la cantidad de anticuerpo unido a la fase sólida puede ser determinado directamente después del paso de lavado. De manera alternativa, se puede utilizar un anticuerpo secundario marcado, esto para detectar al anticuerpo que ha sido unido a la fase sólida. La señal será inversamente proporcional a la cantidad de analito libre en la muestra.

Una vez iniciado un inmunoensayo de tipo competitivo, pueden darse tres situaciones posibles (figura 2.8): a) en ausencia de plaguicida en la muestra a analizar (columna izquierda), sólo el marcador enzimático se puede unir a los anticuerpos; b) en presencia del plaguicida y marcador enzimático (columna media), ambos pueden reaccionar con los sitios de unión de los anticuerpos disponibles; y c) el exceso de plaguicida (columna derecha) reemplaza al marcador enzimático del sitio de unión del anticuerpo. Por tanto, si la concentración de plaguicida en la muestra a analizar es menor que la concentración de marcador enzimático adicionado, este último estará unido en su mayoría a los anticuerpos. Posteriormente, se hace la adición del sustrato enzimático, con lo que ocurre una reacción que produce un color cuya medición se hace por absorbancia. Si la concentración de plaguicida a medir es menor que la del marcador enzimático, la absorbancia obtenida será alta (columna a). Caso contrario, si la concentración de plaguicida fuese alta, la absorbancia medida tendría valores bajos (columna c).

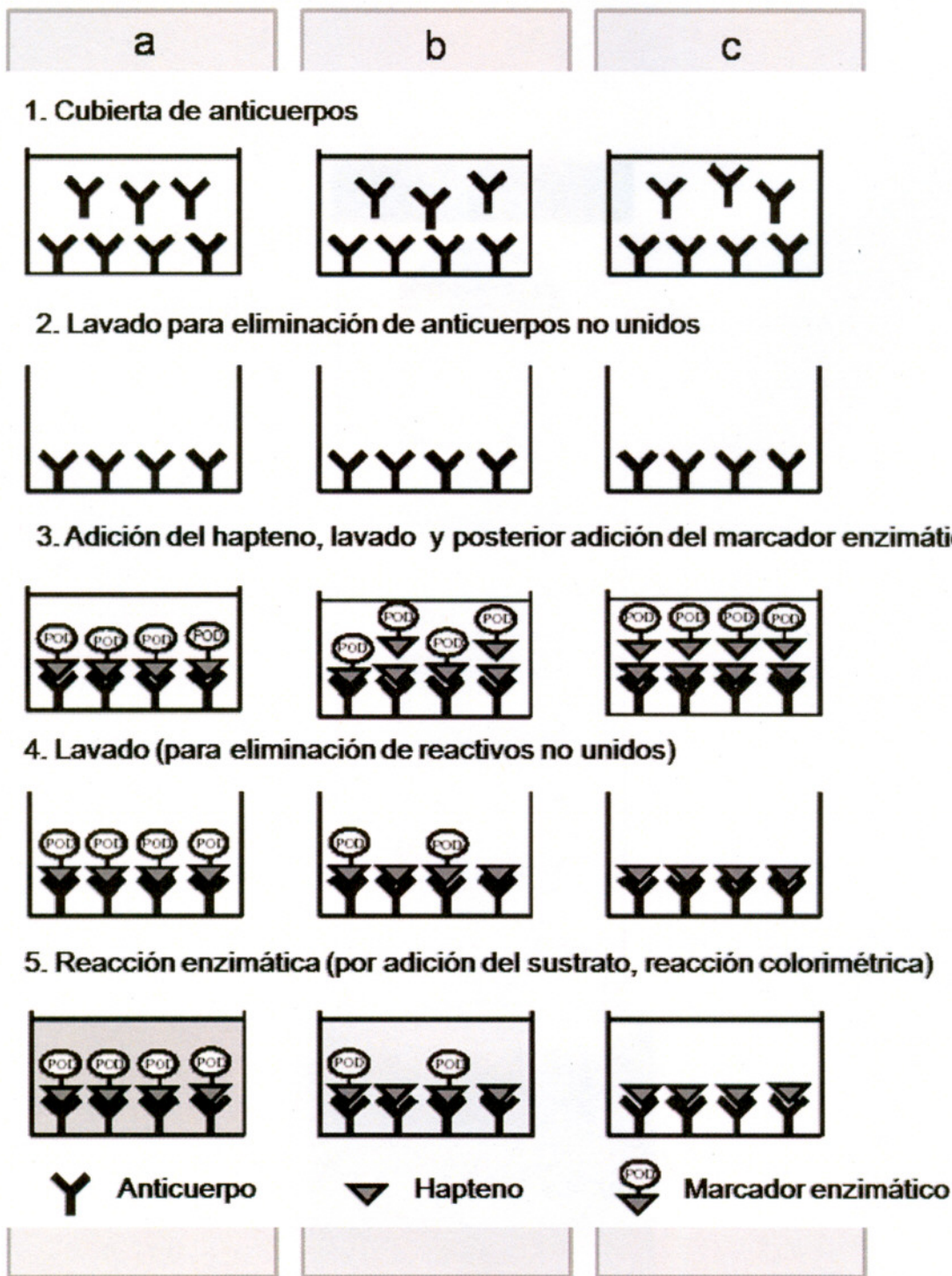


Figura 2.8 Inmunoensayo enzimático heterogéneo competitivo (modificado de Danwardt, 1999)

## 2.7 Ventajas del ELISA

Los autores Hennion y Barceló (1998) hicieron una comparación de costos del ELISA haciendo la determinación de plaguicidas (molinato, metalaxil, clorosulfuron y diflubenzuron) como ejemplo. Las características específicas del ELISA permitieron llevar a cabo la realización del análisis de más de 100 muestras por día sin un considerable incremento de los costos del análisis. Además hay que tomar en cuenta el trabajo del operador que es de cerca de 2 horas, ya que se requiere un tiempo considerable para la incubación de los reactivos. Es importante tomar en cuenta que en muchos laboratorios se utilizan placas de 384 y 1536 pozos, en lugar de las placas de 96 pozos, lo que incrementa notablemente la productividad del ensayo, permitiendo analizar miles de muestras al día. Si se compara esta cantidad con las analizadas con HPLC (sólo puede analizar unas 4 al día) entonces es posible establecer la eficacia del ELISA. Además, hay que tener en cuenta que los reactivos para ELISA son menos costosos que los utilizados en GLC o HPLC.

La gran mayoría de los inmunoensayos comerciales para plaguicidas (o kits de análisis) presentan un formato competitivo. Una de las grandes ventajas de su uso, es la rapidez, la sensibilidad y la posibilidad de efectuarse *in situ* con una gran cantidad de muestras por día. Con todo lo anterior y a pesar de estas ventajas, la acertada aplicación de estos métodos en monitoreos rápidos, depende de varios factores que incluyen entre otros, la calidad del analito, que considera parámetros como la repetitibilidad y reproducibilidad, y de su validación en comparación con aquellos resultados obtenidos mediante técnicas convencionales (Gabaldon *et al.*, 1999).

### 3 JUSTIFICACIÓN

Los plaguicidas son sustancias químicas que permiten controlar plagas y vectores de enfermedades, pero son una de las principales causas de contaminación del agua. La Atrazina es un herbicida ampliamente utilizado, y aunque sólo es ligeramente tóxico, puede actuar como disruptor endócrino, afectando la función reproductiva de los vertebrados. Las técnicas utilizadas para la detección de Atrazina incluyen a la cromatografía de gases, la cromatografía líquida y espectroscopía infrarroja, sin embargo son procedimientos que requieren de equipos costosos e insumos de adquisición frecuente, así como de personal altamente capacitado en el uso de esos equipos y consumo de tiempo. Los kits ELISA se emplean en la cuantificación y detección rápida, específica y sensible de residuos de plaguicidas tales como la Atrazina en agua, sin embargo en México no existen a la venta excepto por importación, que elevaría los costos. Es por ello que se propone la adaptación de una técnica de ELISA, empleando componentes sintetizados en el laboratorio.

Los plaguicidas son moléculas pequeñas que no causan respuesta inmunológica ni tampoco presentan grupos funcionales que posibiliten su acoplamiento o conjugación a una proteína. Por esta razón es necesario realizar la síntesis de un hapteno con esas características y posteriormente enlazarlo covalentemente a las proteínas acarreadoras, siendo esto un aspecto clave en el reconocimiento y cuantificación de moléculas pequeñas en un inmunoensayo.

La Atrazina ácido caproico es un hapteno cuya estructura química le permite unirse a proteínas, pues posee una parte isopropilamino por un lado y una parte del Ácido aminocaproico por el otro. Esta última se convierte en el sitio de unión con la proteína. Estas características lo convierten en una molécula perfecta para ser utilizada en inmunoensayos y técnicas relacionadas.

Si se logra conjugar el hapteno sintetizado y la enzima peroxidasa, se obtendría un marcador enzimático que puede ser utilizado en pruebas de tipo ELISA para la detección de Atrazina en agua y así proponer una alternativa a los métodos tradicionales (CG-MS y HPLC) que resultan costosos y complicados.

## 4 HIPÓTESIS

Es posible llevar a cabo la síntesis de una molécula de estructura similar a la Atrazina, pero con características químicas adicionales que le permitan unirse a una enzima peroxidasa para formar un complejo capaz de funcionar como marcador enzimático. Dicho complejo podrá ser reconocido por anticuerpos monoclonales específicos para Atrazina y ambos ser utilizados en un ELISA de tipo competitivo para evaluar la presencia de Atrazina en agua.

## 5 OBJETIVO

### GENERAL

Sintetizar e identificar una molécula con un diseño estructuralmente parecido a la Atrazina (hapteno), y que posee una estructura lateral (dado por la incorporación del Ácido aminocaproico) que la habilita para unirse a una enzima peroxidasa. Utilizar la especificidad de este complejo enzimático a anticuerpos monoclonales específicos para Atrazina y así detectar el herbicida en agua por medio de un ELISA competitivo.

### PARTICULARES

- Realizar la síntesis del hapteno tomando como base la estructura cíclica del Cloruro cianúrico e incorporando, por un lado, la Isopropilamina y por otro, el Ácido aminocaproico.
- Confirmar su estructura por medio de análisis cromatográficos.
- Sintetizar un complejo marcador enzimático, acoplado el hapteno sintetizado a una enzima peroxidasa.
- Adquirir de forma comercial, anticuerpos monoclonales específicos para Atrazina.
- Incorporar el marcador enzimático preparado con anticuerpos monoclonales comerciales específicos para Atrazina para el desarrollo de un inmunoensayo ELISA competitivo, para lo cual es necesario determinar las concentraciones a utilizar de cada componente.
- Elaborar una curva de calibración para la cuantificación de Atrazina en muestras de agua.

## 6 MATERIALES Y MÉTODOS

### 6.1 Síntesis y caracterización del hapteno

Para la síntesis del hapteno, se conformó una sola metodología (figura 6.1) a partir de las propuestas de dos autores, Maqbool (2002) y Dunbar (1985, 1990), tomando en cuenta los puntos principales de cada procedimiento analizado.

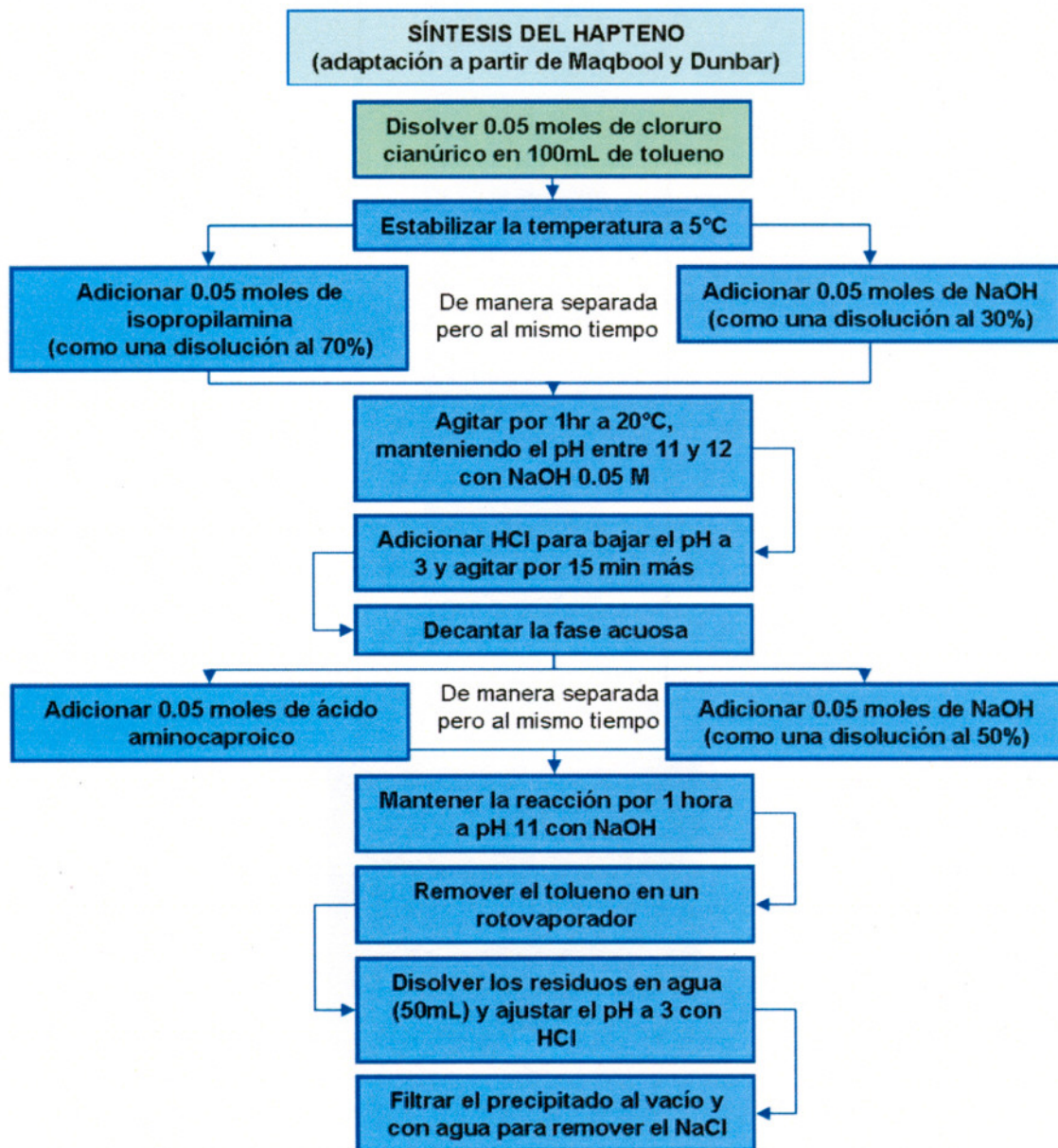


Figura 6.1 Metodología adaptada para la síntesis del hapteno

### 6.1.1 Síntesis del hapteno

En un matraz de tres bocas, se disolvieron 0.05 moles (9.22 g) de Cloruro cianúrico en 100 mL de tolueno por medio de agitación. Se mantuvo una temperatura inicial de 5°C mediante un baño de hielo. Posteriormente, a esta disolución se adicionaron 0.05 moles de NaOH, a razón de 30  $\mu\text{L}/\text{min}$ , como una disolución al 30% (6.7 mL), por medio de una probeta graduada. Al mismo tiempo, utilizando una segunda probeta graduada, se adicionaron 0.05 moles de Isopropilamina como una disolución acuosa al 70%, a razón de 15  $\mu\text{L}/\text{min}$  (figura 6.2).



**Figura 6.2** Material utilizado para la síntesis del hapteno

La temperatura se elevó ya que la reacción es exotérmica. El pH se midió en todo momento, manteniéndose entre 11 y 12, por adición de NaOH 0.05M. La reacción se mantuvo estable por una hora a 20°C. Las características de los reactivos utilizados en el procedimiento se encuentran en la tabla 6.1.

**Tabla 6.1** Reactivos utilizados en la síntesis y purificación del hapteno

REACTIVO	CANTIDAD UTILIZADA	MARCA	CALIDAD
Tolueno	100 mL	J.T. Baker	
Cloruro cianúrico	0.05 mol	Aldrich, C95501	Síntesis química
NaOH	0.05 mol	J.T. Baker	Grado reactivo
Isopropilamina	0.05 mol	Sigma, I9632	Síntesis química
Ac. aminocaproico	0.05 mol	Sigma, A7824	Grado reactivo
HCl	-	J.T. Baker	Grado reactivo
Sílica gel	20 g	J.T. Baker	Grado ACS
Acetato de etilo:Hexano	80:20	J.T. Baker	Grado ACS



Después de ese tiempo, la reacción fue finalizada con el cambio del pH a 3 con HCl y se mantuvo en agitación por 30 minutos más. Al término de este tiempo se habría formado un compuesto monosustituido. Posteriormente se decantó la fase acuosa. Para verificar la formación del compuesto buscado, se tomó una alícuota de la fase orgánica obtenida hasta este punto y se realizó un análisis por CG-EM (ver sección 7.1 de resultados).

La fase orgánica se trasladó a un matraz bola y se adicionaron 0.05 moles de Ácido aminocaproico (6.56 g) disueltos en 10 mL de NaOH 5M. La reacción se mantuvo en agitación y a pH 11 por una hora, adicionando NaOH 0.05M. El tolueno se removió a presión reducida con un rotovapor. Los residuos se disolvieron con 50 mL de agua y se ajustó el pH a 3 con HCl. El producto se filtró en un embudo y se lavó muy bien con agua para remover el NaCl que se formó con la adición del NaOH y el HCl. El producto filtrado se dejó secando en el embudo por varias horas.

### 6.1.2 Purificación del hapteno obtenido

La purificación del hapteno se realizó por cristalización. Se disolvieron 2 g del hapteno sintetizado en acetato de etilo, y fueron puestos en una columna de sílica gel (2.5x40 cm) a eluirse con acetato de etilo:hexano (80:20). Con la ayuda de una lámpara de UV se visualizó el avance de la banda correspondiente al compuesto sintetizado y se colectó exactamente esa fracción eluyente, que se secó por medio de un rotavapor. Los residuos se purificaron mediante recristalizaciones sucesivas, dos de cloroformo y una vez de acetona.

### 6.1.3 Caracterización del hapteno sintetizado

Una pequeña porción del derivado sintetizado ya purificado fue analizado por cromatografía de gases (previa reacción de derivatización con Diazometano).

## 6.2 Síntesis del marcador enzimático

El trazador o marcador enzimático fue sintetizado acoplando el hapteno obtenido a una peroxidasa. Para ello, 10 mg del hapteno purificado fueron puestos junto con 17 mg de n-hidroxisuccidimida y 62 mg de dicitclohexilcarbodimida (DCC) y disueltos en 1.3 mL de dioxano seco. Se incubó por 18 horas a temperatura ambiente.

Posteriormente, la mezcla fue adicionada, de forma lenta, a una disolución de 20 mg de enzima peroxidasa (POD, Sigma-Aldrich, P6782) en 3 mL de bicarbonato de sodio (0.13 M). Se incubó por 3 horas más en agitación. Al término de ese tiempo, la disolución fue dializada por tres días contra un buffer de fosfatos (PBS) 0.04 M y pH 7.2. El PBS fue

preparado con los reactivos encontrados en la tabla 6.2. El conjugado obtenido se almacenó a 5° C en absoluta oscuridad.

**Tabla 6.2** Componentes y preparación del buffer PBS para la diálisis

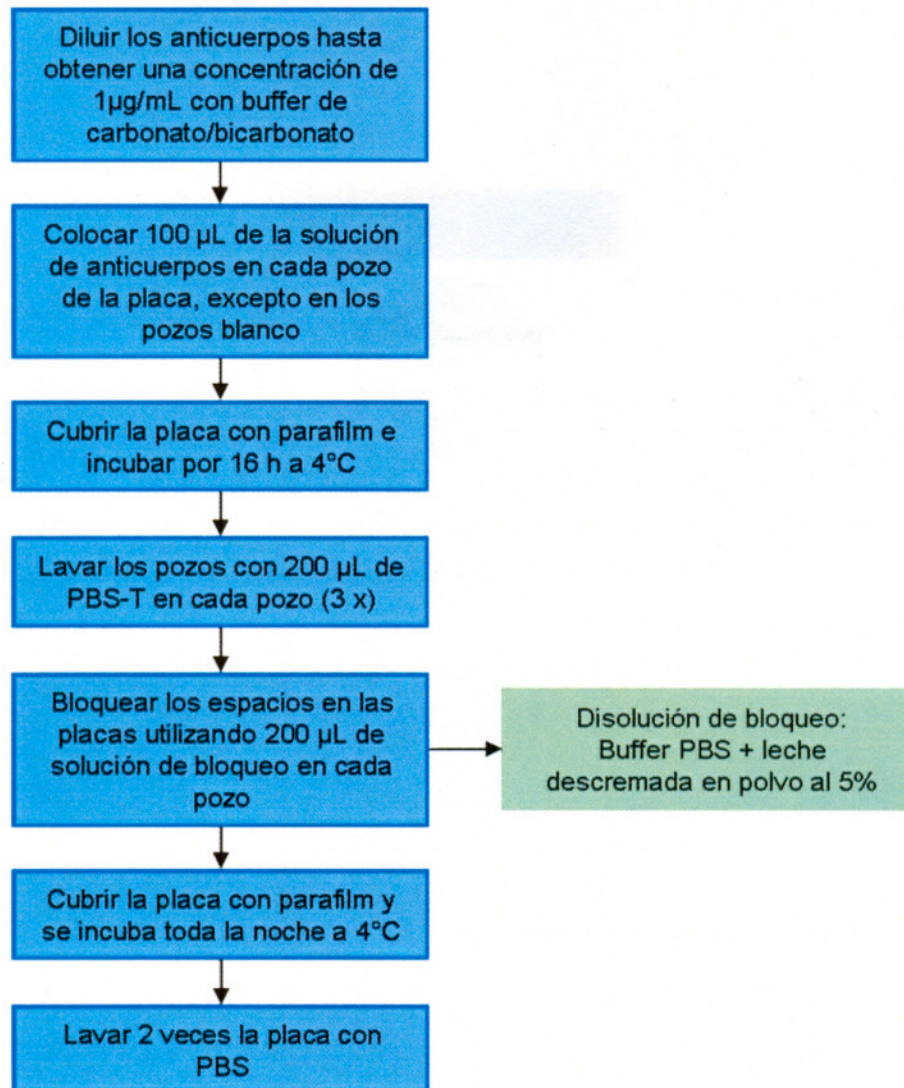
REACTIVO	CANTIDAD UTILIZADA
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1.784 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.2 g
KCl	0.2 g
NaCl	8.5 g
Disolver los componentes en H <sub>2</sub> O desionizada, aforar a 1L y ajustar el pH a 7.2 con HCl	

### 6.3 Preparación de las placas de ELISA

Se realizó la cubierta de las placas de ELISA con anticuerpos utilizando placas NUNC de 96 pozos. Los anticuerpos contra Atrazina ([8.F.20] ab30533, marca Abcam) fueron diluidos con buffer de cubierta (tabla 6.3) hasta alcanzar una concentración de 1 µg/mL (figura 6.2).

**Tabla 6.3** Componentes y preparación del buffer de cubierta

Buffer carbonato/bicarbonato 0.1 M, pH 9.6	
REACTIVO	CANTIDAD UTILIZADA
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	1.515 g
NaHCO <sub>3</sub>	3 g
Disolver los componentes en 1 L de H <sub>2</sub> O desionizada.	



**Figura 6.3** Diagrama de los pasos seguidos para realizar la cubierta de anticuerpos

De la disolución de anticuerpos se colocaron 100 µL en cada pozo de la placa, excepto para aquellos pozos utilizados como blancos. Se cubrió la placa con parafilm y se incubó 16 h a 4°C. Posteriormente se lavaron los pozos tres veces con buffer PBS-T (200 µL por cada pozo) (tabla 6.4). Para evitar que otras moléculas se adhieran a la placa se bloquearon los espacios utilizando una solución de bloqueo que contenía buffer PBS y leche descremada al 5%.

**Tabla 6.4** Preparación del buffer PBS-T

<b>Buffer PBS 0.01 M, pH 7.4</b>	
REACTIVO	CANTIDAD UTILIZADA
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1.16 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.1 g
KCl	0.1 g
NaCl	4 g
Tween 20	0.05% (v/v)
Disolver los componentes en 1 L de H <sub>2</sub> O desionizada.	

Distintos tipos de blancos fueron utilizados, esto con el propósito de descartar falsos positivos durante la prueba (tabla 6.5).

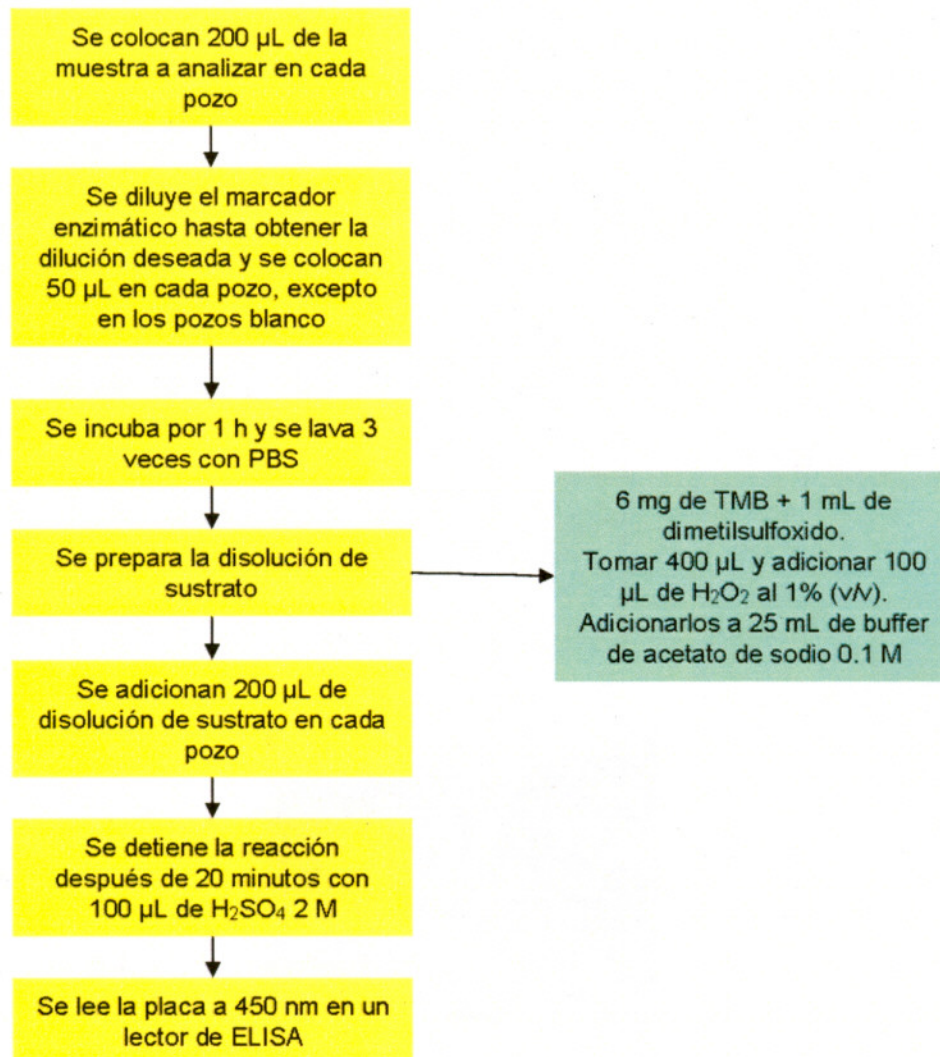
**Tabla 6.5** Distintos blancos utilizados

	Anticuerpo	Marcador enzimático	TMB	Atrazina	Resultado esperado	Objetivo
<b>BLANCO</b>	NO	SI	SI	SI	NEGATIVO	Comprobar que la solución de bloqueo impide la unión del marcador enzimático a la placa.
	SI	NO	SI	SI	NEGATIVO	Verificar que en ausencia del marcador enzimático, el TMB no reaccionaría.
	SI	SI	NO	SI	NEGATIVO	Cerciorarse que el marcador enzimático sólo reaccionará en presencia de un sustrato y en su ausencia no presentará color.

Para bloquear los espacios no ocupados por los anticuerpos, se utilizaron 200 µL de disolución de bloqueo (buffer PBS con leche en polvo descremada Svelty al 5%) en cada pozo. Se cubrió la placa con parafilm y se incubó toda la noche a 4° C. Se lavó la placa dos veces con buffer PBS. Si no se utilizan, las placas pueden ser guardadas a 4°C.

## 6.4 Procedimiento del inmunoensayo competitivo

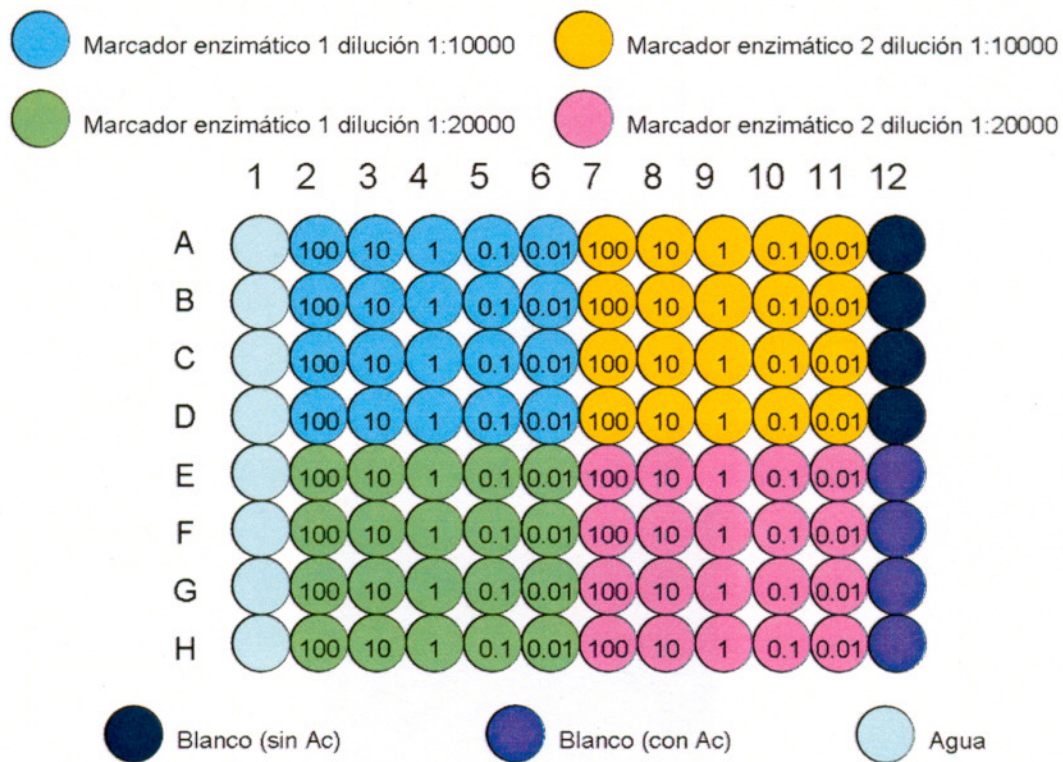
Como paso inicial, se realizó la preparación de estándares, disolviendo 5 mg de Atrazina (Atrazina, Lot. 380-40A, CHEM SERVICE, 98% de pureza) en 50 mL de etanol grado absoluto. A partir de esta disolución stock se preparó una disolución de 1 mg/L y con ella se prepararon diluciones con las concentraciones 0.01, 0.1, 1.0, 5.0, 6.0, 7.0, 8.0, 9.0, 10.0 y 100.0  $\mu\text{g/L}$  utilizando agua desionizada. Se evaluaron tres concentraciones de anticuerpo, 1  $\mu\text{g/mL}$ , 0.5  $\mu\text{g/mL}$  y 0.3125  $\mu\text{g/mL}$ , esta última de acuerdo a la relación 1:3200 utilizada por Schneider y Hammock (1992). Por otro lado, se emplearon dos diluciones de marcador enzimático (1:10000 y 1:20000). El procedimiento para la realización del inmunoensayo (figura 6.4) fue el siguiente:



**Figura 6.4** Procedimiento a seguir para el ELISA competitivo

En cada pozo de la placa (figura 6.5) se colocaron 200  $\mu\text{L}$  de la muestra estándar, seguidos por 50  $\mu\text{L}$  del marcador enzimático (excepto en aquellos pozos que serían utilizados como blanco). Antes de ser utilizado, el marcador enzimático se diluyó con buffer PBS para obtener la dilución propuesta.

La placa se agitó por 30 segundos y posteriormente se incubó por una hora. Se lavó la placa tres veces con buffer PBS y se adicionaron 200  $\mu\text{L}$  de solución de sustrato a cada pozo de la placa. Dentro de cada círculo está escrita la concentración de Atrazina en  $\mu\text{g/L}$ . Esta solución de sustrato contenía una solución de 400  $\mu\text{L}$  de TMB (6 mg de TMB disuelto en 1 mL de dimetilsulfoxido) y 100  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  al 1% (v/v) en 25 mL de buffer de acetato de sodio 0.1 M (ajustado a pH 5.5 con Ácido cítrico 1 M). La reacción fue detenida después de 20 minutos con 100  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  2 M para cada pozo. La placa se leyó a 450 nm con un lector de ELISA Labsystem Multiskan. El esquema representado en la figura 6.5 se realizó una sola vez, y de los resultados obtenidos se realizaron distintas pruebas con el objetivo de encontrar las concentraciones correctas para ser utilizadas como estándar (ver Anexo B).



**Figura 6.5** Esquema representativo de la placa de ELISA

## 6.5 Tratamiento de los datos

Los promedios de los valores de las absorbancias ópticas (OD) obtenidas fueron calculados y convertidos a porcentaje de máxima absorbancia (Maqbool, 2008), por medio de la siguiente fórmula:

$$\frac{\%B}{B_0} = \frac{A - A_{\text{Excess}}}{A_0 - A_{\text{Excess}}} \times 100 \quad (1)$$

Donde:

A = absorbancia

A<sub>0</sub> = valor más alto de la curva

A<sub>excess</sub> = valor más bajo de la curva

Los valores de %B/B<sub>0</sub> fueron graficados contra la concentración correspondiente de Atrazina de los estándares y posteriormente se graficó el logaritmo de %B/B<sub>0</sub> contra la concentración de Atrazina para obtener la linearización de la curva estándar, según la siguiente ecuación:

$$\text{Logit } (\%B/B_0) = \frac{\%B/B_0}{100 - \%B/B_0}$$

## 6.6 Análisis estadístico

Las absorbancias obtenidas se interpretaron considerando que se originan de un inmunoensayo de tipo competitivo en el que las absorbancias menores corresponden a concentraciones mayores de Atrazina y viceversa.

En una determinación de tipo ELISA, es necesario establecer dos puntos de corte, uno para diferenciar los valores positivos de los negativos por el lado de las concentraciones bajas, y uno más para el lado de las altas concentraciones. Un procedimiento muy empleado para la elección de los puntos de corte se basa en obtener la suma de los valores de densidad óptica de los controles negativos más dos desviaciones estándar. Se obtuvieron todas las absorbancias correspondientes a cada concentración de Atrazina, así como aquellas obtenidas por el control negativo (sin anticuerpos). Para la discriminación diagnóstica se

realizó el cálculo del valor de la media, desviación estándar y coeficiente de variación, tanto para negativos como positivos.

Para determinar que las absorbancias aparentemente positivas son diferentes de las aparentemente negativas, se realizó una prueba estadística de comparación de medias usando la prueba  $t$  de Student para cuando se desconocen las varianzas. Se probó la hipótesis nula de que las medias de las poblaciones de muestras son iguales ( $H_0 : \mu_1 = \mu_2$ ) contra la alternativa de que son desiguales ( $H_A : \mu_1 \neq \mu_2$ ). Como datos se utilizaron las medias de las muestras y las desviaciones estándar. Se obtuvo la estimación mancomunada calculando el promedio ponderado de las varianzas (ecuación 1).

$$S_p^2 = \frac{(n_1 - 1) s_1^2 + (n_2 - 1) s_2^2}{n_1 + n_2 - 2} \quad \text{Ecuación 1}$$

Posteriormente se aplicó la estadística de prueba (ecuación 2).

$$t = \frac{(x_1 - x_2) - (\mu_1 - \mu_2)}{\sqrt{\frac{sp^2}{n_1} + \frac{sp^2}{n_2}}} \quad \text{Ecuación 2}$$

Cuando la hipótesis nula es verdadera, la estadística de prueba se distribuye aproximadamente como la distribución  $t$  de Student con los grados de libertad dados por la ecuación 3.

$$df' = \frac{\left( \frac{S_1^2 + S_2^2}{n_1 + n_2} \right)^2}{\frac{(S_1^2/n_1)^2}{n_1} + \frac{(S_2^2/n_2)^2}{n_2}} \quad \text{Ecuación 3}$$

Se tomó un valor de intervalo de confianza del 95% ( $\alpha=0.05$ ) y con los grados de libertad obtenidos, se obtuvo el coeficiente de confianza. Posteriormente se obtuvo la estadística de prueba calculada por la ecuación 4.

$$t = \frac{(x_1 - x_2) - (\mu_1 - \mu_2)}{\sqrt{\frac{sp^2}{n_1} + \frac{sp^2}{n_2}}} \quad \text{Ecuación 4}$$

Por último se tomó la decisión estadística de aceptar o rechazar la hipótesis nula.



## 7 RESULTADOS

### 7.1 Síntesis y caracterización del hapteno

De inicio la síntesis del hapteno se realizó siguiendo el procedimiento hecho por Maqbool (2002). Ella menciona que la síntesis debe llevarse a cabo en una reacción de un solo paso, en la cual se adicionan los reactivos hasta conformar la molécula deseada (2 cloro-4-(isopropilamino)-6- [(carboxipentil)amino]-s-triazina) (figura 7.1).

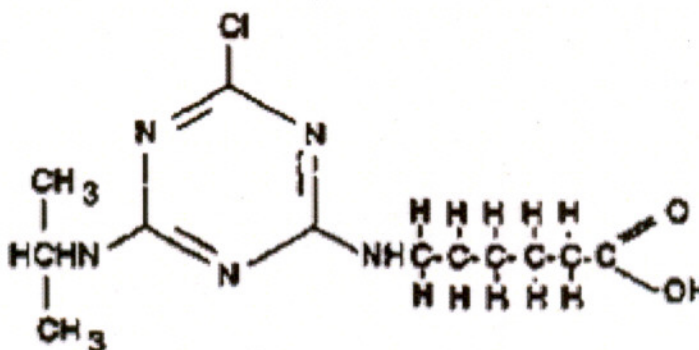
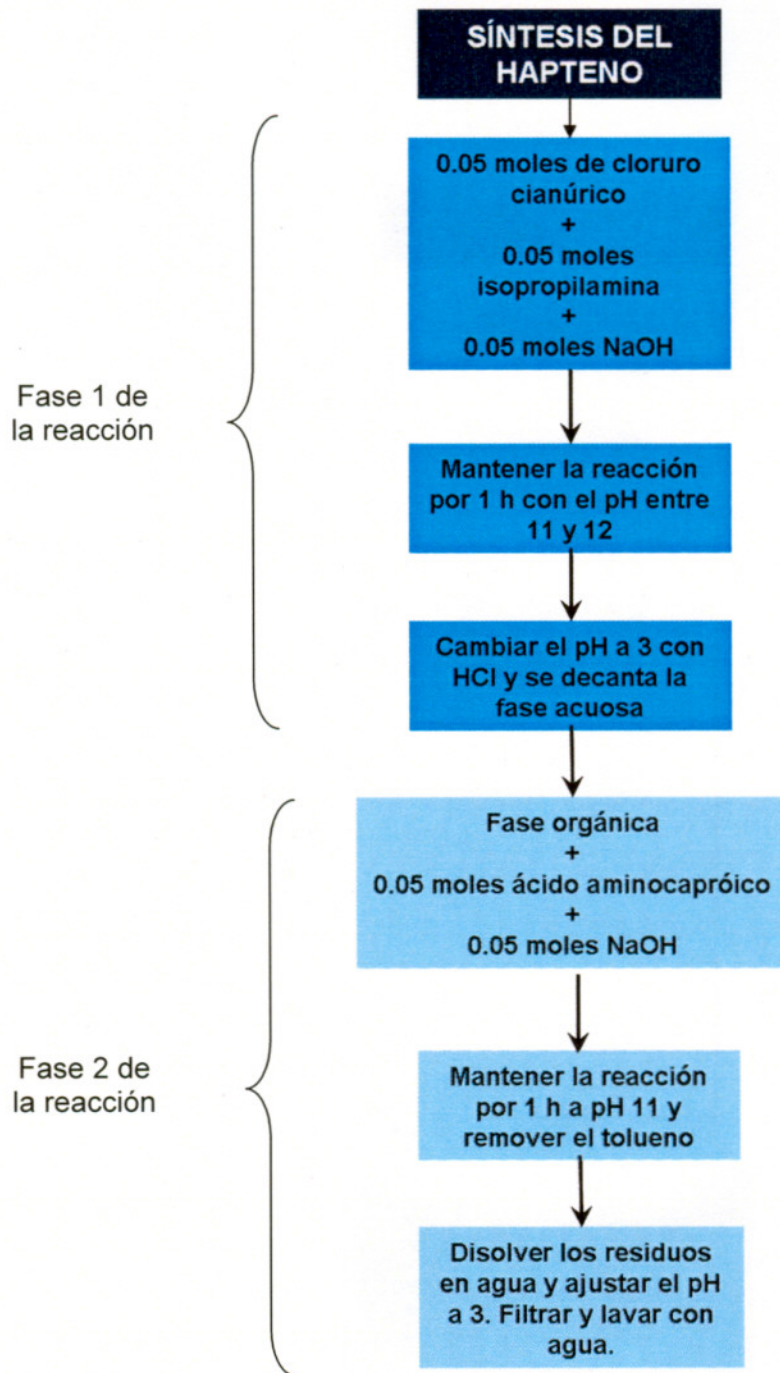


Figura 7.1 Estructura química de la Atrazina ácido caproico

La síntesis se intentó en tres ocasiones sin éxito (ver Anexo A), por lo que se realizó una exhaustiva revisión bibliográfica de reacciones análogas. Un documento de Baldi (1978), hace énfasis en la importancia de los tiempos de reacción, en la estequiometría de los componentes, así como en la forma de adición de los mismos durante la síntesis de otras cloro amino-s-triazinas. Baldi propone una reacción de dos fases; una donde el primer grupo amino (proveniente de la Isopropilamina) se unirá al anillo de triazina y una segunda fase donde la parte caproica (del Ácido aminocaproico) se unirá después. Cada fase es terminada con el cambio de pH a 3.

Basado en lo anterior, se conformó una sola metodología (figura 6.1), tomando en cuenta los procedimientos de síntesis mencionados por Maqbool y Dunbar, y fue ésta la que se utilizó para la síntesis del hapteno. La metodología se resume brevemente en la figura 7.2.



**Figura 7.2** Síntesis del hapteno resumida

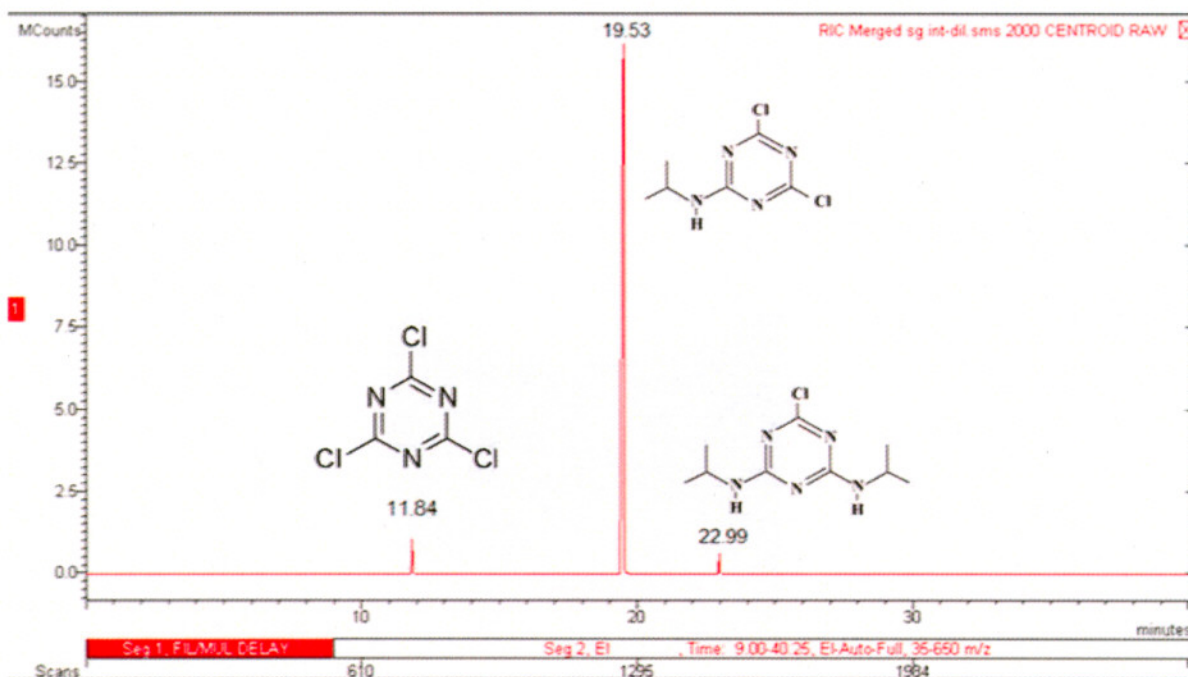
Al finalizar la primera fase de la reacción, se analizó el compuesto obtenido en la fase orgánica (imagen 1) por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (figura 7.3). Se hizo un análisis del cromatograma obtenido y se encontró que existían tres picos sobresalientes. Uno coincidía con restos de Cloruro cianúrico (minuto 11.842) y otro correspondía a la Propazina (minuto 22.992). No obstante, también fue posible

observar un pico principal en el minuto 19.53, cuyo espectro de masas (figura 7.6), coincide con un compuesto de peso molecular 207, justamente el peso que corresponde a un anillo triazínico sustituido en uno de sus cloros por la Isopropilamina (figura 7.4).

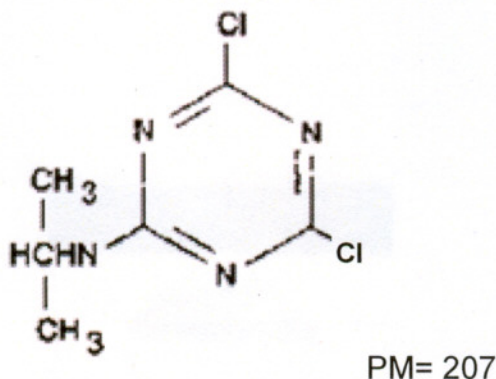


**Figura 7.3** Separación de la fase orgánica y acuosa de la primera etapa de reacción

Es importante mencionar que una molécula de Atrazina por sí sola, no puede unirse a una proteína o enzima, pues carece de la estructura química apropiada para hacerlo, es por eso que, el paso más importante del desarrollo propuesto, es precisamente la síntesis del hapteno, pues de él dependerá el éxito del ELISA.

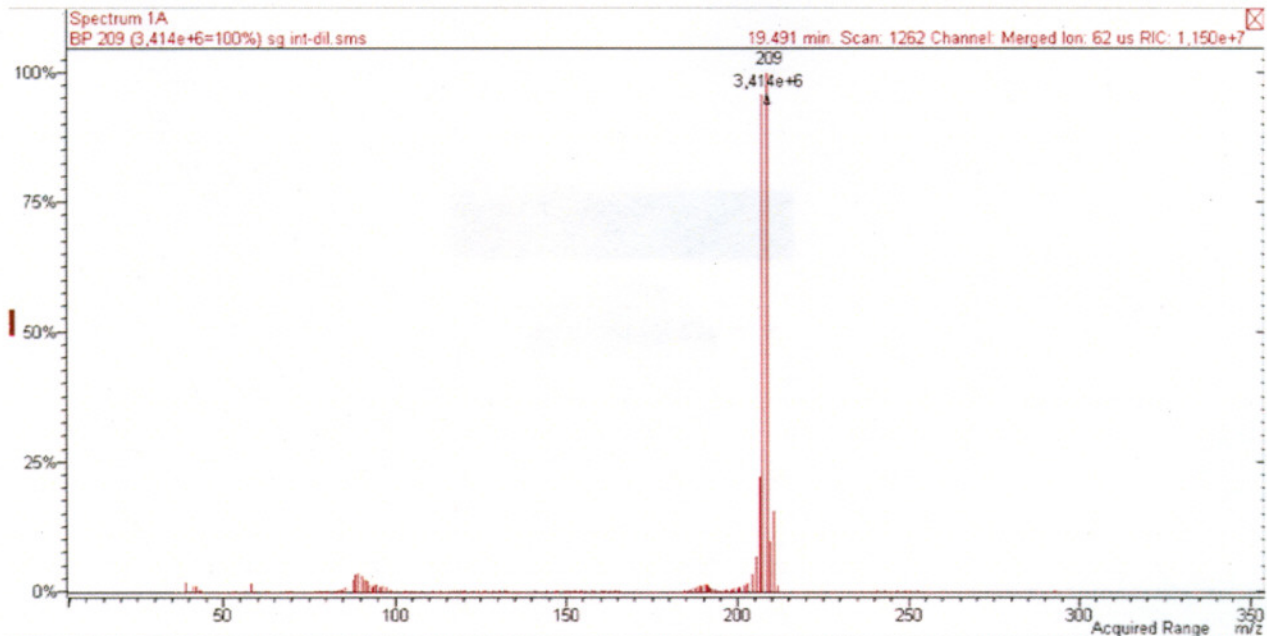


**Figura 7.4** Cromatograma de la mezcla de reacción obtenida en la primera etapa de la reacción



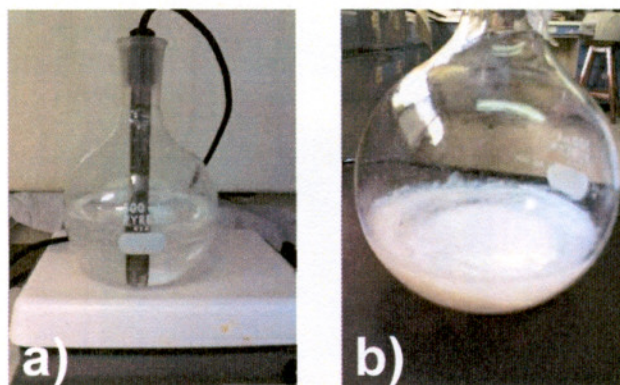
**Figura 7.5** Estructura de la molécula esperada al final de la primera etapa de la reacción

En el espectro de masas (figura 7.5) aparece el ion con mayor presencia en  $m/z = 209$ . El peso molecular del Cloruro cianúrico monosustituido con un grupo isopropil fue calculado como 207 g/mol. Según la abundancia isotópica del cloro, los iones en  $m/z = 209$  y 211 deben aparecer con la abundancia relativa de 65.3% y 10.6% respectivamente, en este caso en el espectro de masas no se obtuvo la abundancia relativa de iones esperada, probablemente por una muestra altamente concentrada. En la espectrometría de masas es frecuente que las intensidades del espectro de masas varíen ligeramente. Normalmente si la muestra está muy concentrada, podría modificarse la abundancia relativa de los picos de iones (para el espectrómetro de masas Saturn con detector de trampa de iones la abundancia relativa para los picos es muy sensible a la concentración total del analito), por lo que el espectro de masas resulta aceptable para el producto monosustituido. Además, el producto eluye entre el Cloruro cianúrico (perfectamente reconocido) y su derivado de Isopropilamina doblemente sustituido, lo cual refuerza el argumento del producto monosustituido.

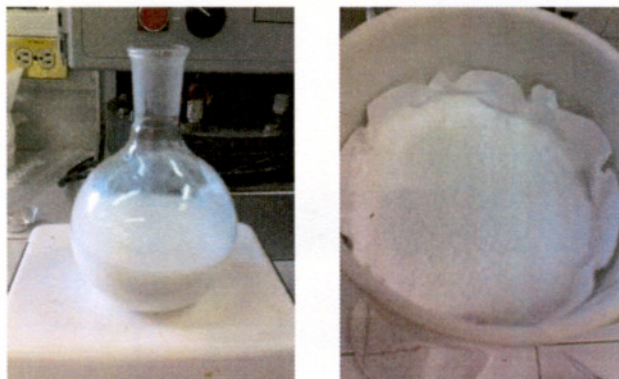


**Figura 7.6** Espectro de masas de la molécula encontrada al tiempo 19.491 en el cromatograma mostrado en la figura 7.4

Posteriormente se continuó con la segunda etapa de la reacción (figuras 7.7, 7.8 y 7.9) y el producto final fue analizado en un sistema acoplado CG-EM, previa derivatización con Diazometano.



**Figura 7.7** Final de la segunda fase de la reacción. a) Ajuste de pH a 3 para finalizar la reacción. b) Apariencia final del compuesto antes de ser filtrado



**Figura 7.8** Proceso de filtración del producto final



**Figura 7.9** Columna cromatográfica utilizada para la purificación del hapteno

Para que el análisis en el sistema CG-EM del hapteno sintetizado se llevara a cabo con éxito, se utilizó el proceso de derivatización. La derivatización es el proceso de modificación química de un compuesto que produce un nuevo compuesto, el cual tiene propiedades que son compatibles para el análisis cromatográfico, sobre todo en moléculas que se adsorben en sitios activos en el inyector o a lo largo de la columna. La derivatización incrementa la volatilidad de los compuestos, eliminando la presencia de grupos polares OH, NH y SH. En estos casos la muestra de interés no es detectable ya que posee grupos terminales de tipo  $-NH_3$  y  $-COOH$  que tienden a unirse a los sitios activos, evitando que sean detectadas. Algunas moléculas tienden a tener baja volatilidad debido a su tamaño y a fuertes atracciones intermoleculares entre los grupos polares. Durante la derivatización, se realiza la sustitución de los grupos terminales ácidos o básicos, por ejemplo, con grupos  $-CH_3$ , haciendo que la molécula adquiera mejores propiedades de volatilidad y sea detectable en un cromatograma. En la reacción de derivatización de la Atrazina ácido caproico llevada a cabo se utilizó el reactivo Diazometano, el cual cambia a las regiones donde se encuentra un  $NH_3$  y metila los grupos  $-COOH$ . Una vez que el producto fue derivatizado, se analizó en un CG-EM Varian Saturn. Con la derivatización, la molécula de Atrazina ácido caproico de peso molecular 301 g/mol daría lugar a la formación del éster metílico de peso molecular 315 g/mol. La separación de los iones por la espectrometría de masas podría originar tres productos posibles, sin embargo el espectro de masas encontrado (figura

7.10) sólo muestra el éster metílico del ácido. A pesar de no contar con un espectro de masas más claro, el detectar un pico de uno de los productos posibles, es evidencia suficiente de que se tiene la atrazina ácido caproico.

El hapteno se sintetizó en dos ocasiones bajo las mismas condiciones, es decir, se preparó por duplicado. En ambos casos el producto fueron analizado por CG-EM después de una reacción de derivatización en Diazometano. Se les nombró *hapteno 1* y *hapteno 2* para diferenciarlos.

Los resultados obtenidos del análisis cromatográfico del hapteno 1 y 2 así como los espectros de masas (figuras 7.10 y 7.11), muestran la presencia de un pico al minuto 54.85 de cada cromatograma, análisis realizado después de la reacción de derivatización. Por el lado de los espectros de masas, al ser comparados muestran entre si grupos coincidentes que permiten concluir que ambos moléculas derivatizadas son idénticas.

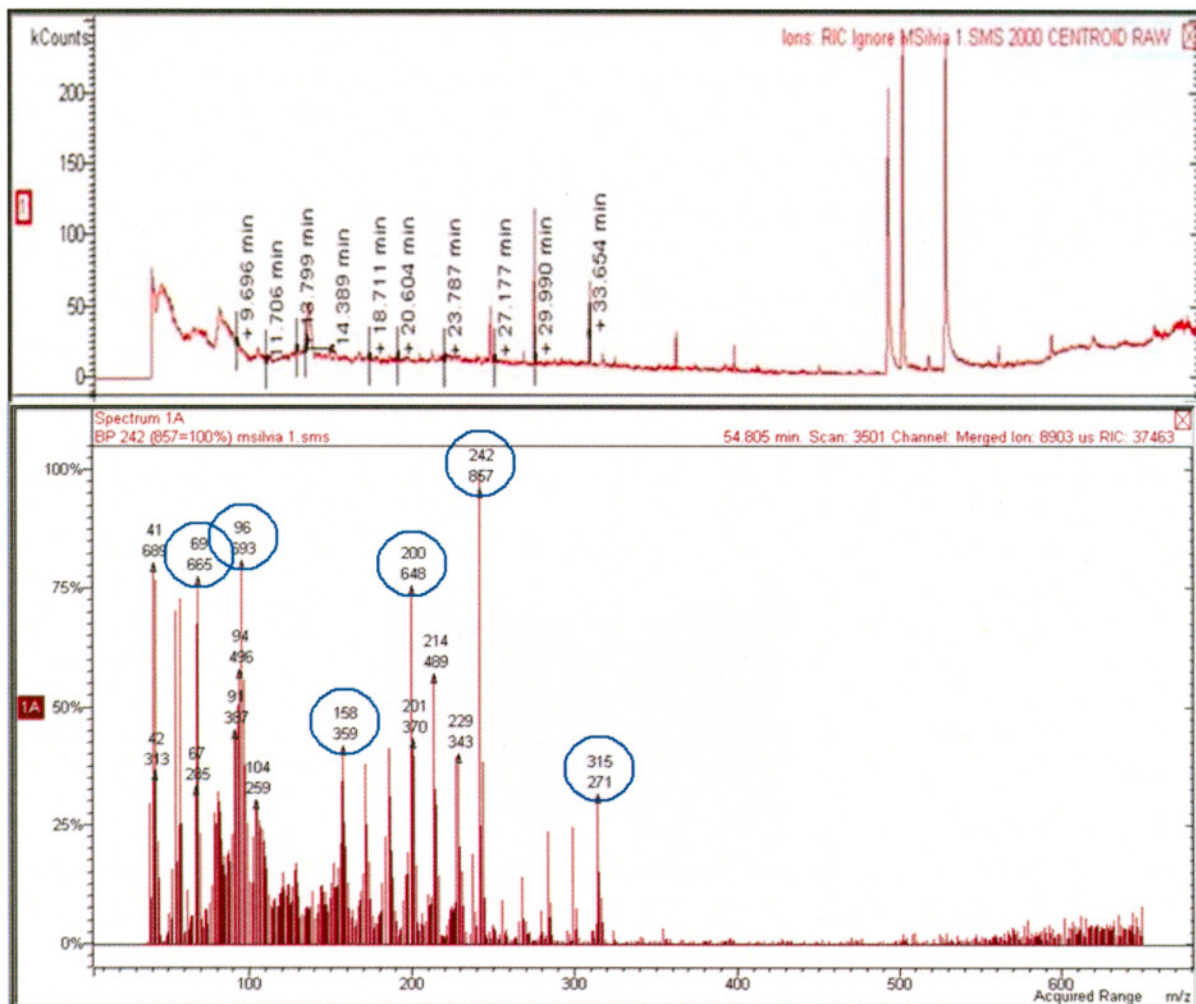


Figura 7.10 Cromatograma y espectro de masas obtenido para el *hapteno 1*

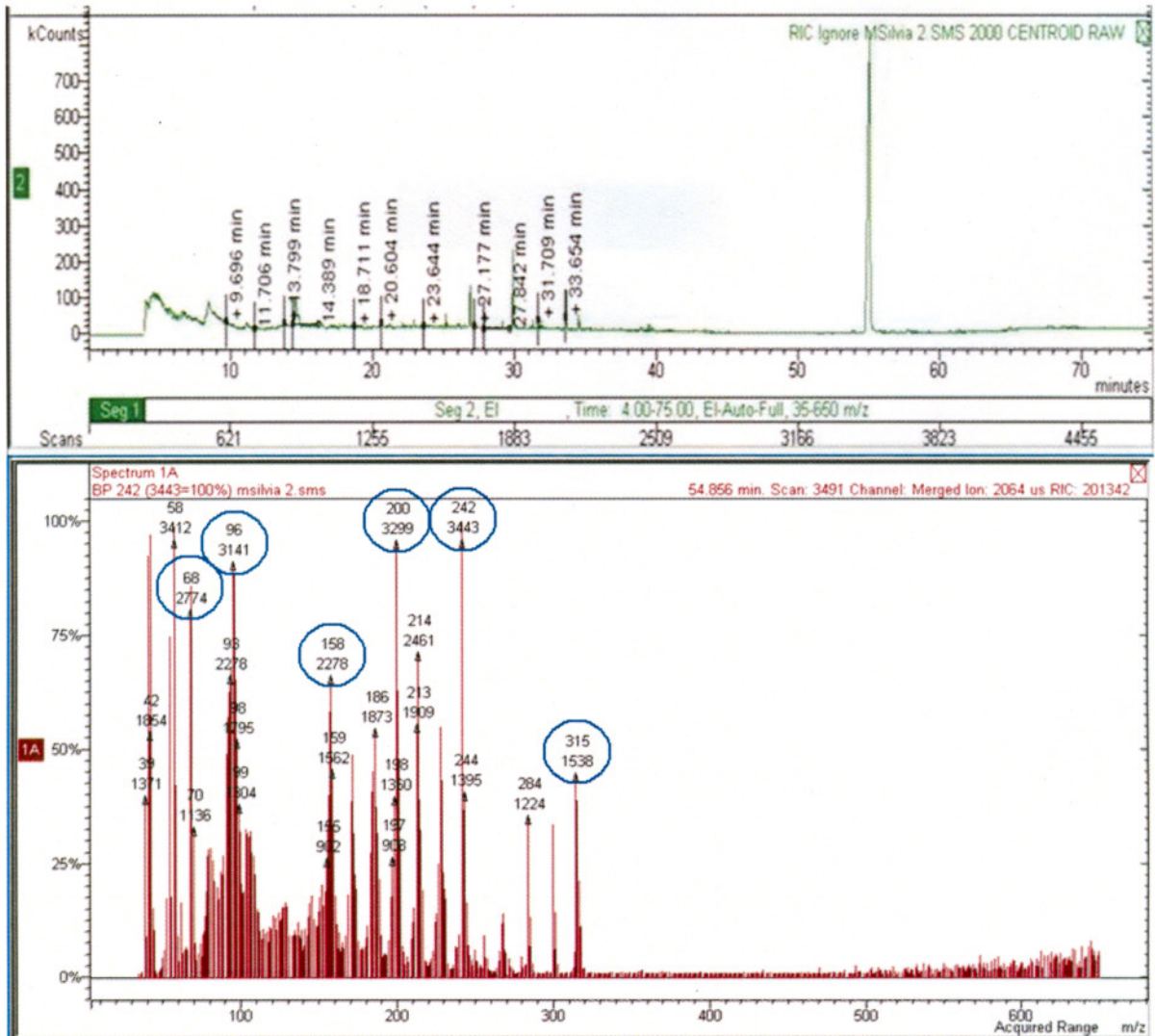


Figura 7.11 Cromatograma y espectro de masas obtenido para el *hapteno 2*

Debido a que los espectros de masas coinciden, esto es, el *hapteno 1* es idéntico al *hapteno 2*, es también una muestra de que la reacción de obtención del *hapteno* se pudo reproducir, sin problemas, en el laboratorio.

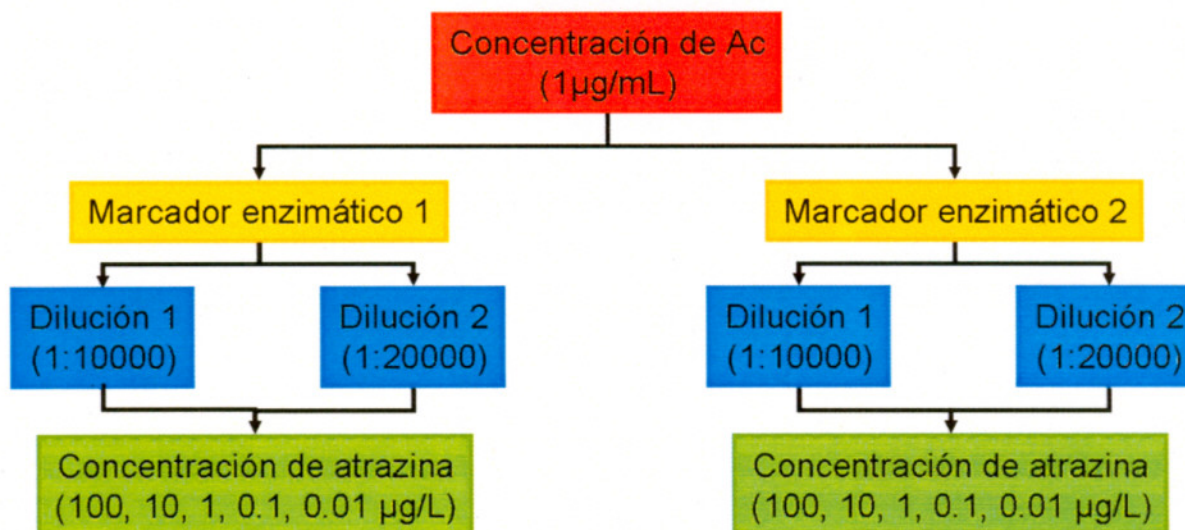
Se debe resaltar la importancia de que la molécula final tenga un peso molecular de 301, ya que esto es indicativo de que la parte caproica (de la segunda fase de la reacción) se unió exitosamente al anillo triazínico, y que gracias a este fragmento, es posible su unión a la peroxidasa.



## 7.2 Evaluación del inmunoensayo

Uno de los experimentos más importantes de este estudio, consistió en evidenciar la habilidad del conjugado sintetizado para unirse a los anticuerpos adquiridos. Para ello, se evaluaron la concentración de anticuerpos y de marcador enzimático a utilizar y cuyas absorbancias fueran congruentes con la concentración de Atrazina a evaluar. Con este objetivo, se planteó utilizar la metodología propuesta por Maqbool *et al.* (2002).

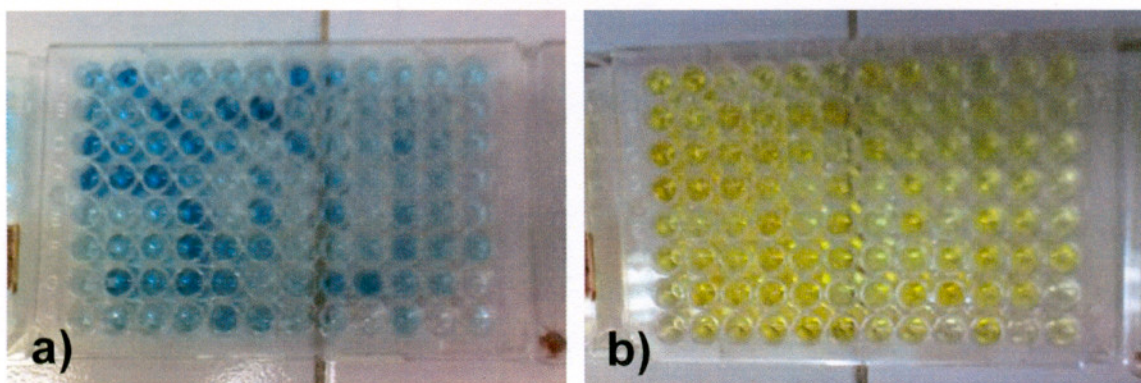
Una parte fundamental de la implementación de la metodología consistió en determinar la concentración idónea de cada uno de los componentes que forman parte del ELISA (anticuerpo y marcador enzimático), para lo cual se creó una matriz donde se probó una concentración de anticuerpo (1  $\mu\text{g/mL}$ ) para reaccionar con dos diluciones de marcador enzimático (1:10000 y 1:20000). Al mismo tiempo se utilizaron distintas concentraciones de Atrazina (100, 10, 1, 0.1 y 0.01  $\mu\text{g/L}$ ), con el objetivo de obtener una curva de calibración (figura 7.12).



**Figura 7.12** Matriz utilizada para establecer las condiciones idóneas del ELISA

De acuerdo con lo que se muestra en la figura 7.13, se puede observar el cambio de color en los pozos de la placa. La reacción comenzó dando una coloración azul que cambió por amarillo al detener la reacción. Esta reacción observada en las placas es de gran importancia pues significa que el hapteno fue sintetizado correctamente (es importante resaltar que el marcador enzimático sintetizado posee regiones de reconocimiento o epítomos para los anticuerpos monoclonales utilizados) y que su estructura química contenía los elementos necesarios para su unión a una enzima (en este caso la peroxidasa) y que posteriormente se utilizó como marcador enzimático. Si la preparación del marcador enzimático no hubiese sido correcta en alguna de sus etapas, la adición del sustrato (TMB) a las placas con anticuerpos no produciría

reacción alguna, por lo que la coloración no sería formada. Sin embargo, en este caso la coloración se hizo presente y las absorbancias obtenidas correspondieron de manera inversa a la cantidad de Atrazina utilizada en la muestra (más Atrazina, menos absorbancia). Las absorbancias obtenidas se consideran correctas, ya que cada paso es precedido de lavados de la placa de ELISA, que aseguran que los reactivos que no se unieron a los anticuerpos, no formen parte de la reacción, dando resultados falsos. Un falso negativo se prueba con agua (sin Atrazina) y marcador enzimático, cuyo resultado será ausencia de coloración. De igual manera, se prueba con agua (sin Atrazina) y sin marcador enzimático, repitiéndose la ausencia de color.



**Figura 7.13** Reacción de la peroxidasa con el sustrato TMB. a) el primer paso es la adición del TMB dando como resultado una coloración azul que puede ser leído a 370 o 655 nm. b) la reacción se puede detener con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2 M dando una coloración amarilla que puede ser leída a 450 nm

Es importante mencionar que la colocación de los reactivos en las placas (al inicio de la prueba) se debe realizar de forma rápida utilizando una micropipeta múltiple, para evitar que acumule el tiempo de reacción de cada componente, pues la primera columna tendría mayor tiempo de incubación que la última.

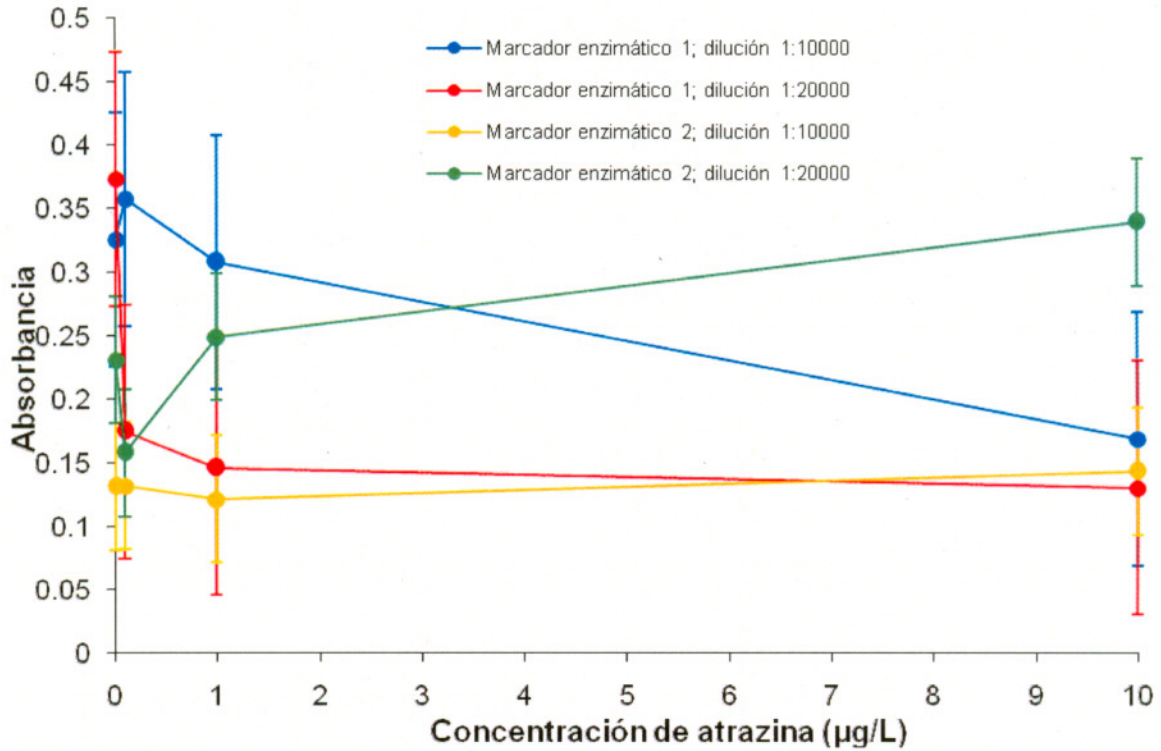
En la tabla 7.1 se observan las absorbancias obtenidas a partir de la matriz planteada. Cada uno de los datos fue procesado según se explica en el apartado 6.1.5.

**Tabla 7.1** Resultados de las absorbancias obtenidas

		Concentración de Atrazina (µg/L)											
		100	10	1	0.1	0.01	100	10	1	0.1	0.01		
Marcador enzimático 1	Concentración 1 µL/mL	0.274	0.144	0.132	0.157	0.457	0.151	0.138	0.271	0.14	0.126	Concentración 1 µL/mL	Marcador enzimático 2
		0.244	0.167	0.198	0.216	0.283	0.146	0.184	0.125	0.26	0.13		
		0.129	0.13	0.139	0.153	0.381	0.161	0.153	0.132	0.137	0.14		
	0.225	0.177	0.232	0.352	0.4	0.205	0.224	0.291	0.18	0.274			
	0.169	0.165	0.29	0.432	0.31	0.214	0.652	0.183	0.253	0.223			
	Concentración 2 µL/mL	0.154	0.164	0.29	0.289	0.268	0.214	0.566	0.274	0.154	0.197	Concentración 2 µL/mL	

### 7.2.1 Análisis de los resultados

El tratamiento dado a los datos fue el seguido por Maqbool, *et. al.*, (2008), donde de acuerdo a su metodología se deben graficar las absorbancias promedio para cada concentración de Atrazina utilizada. En la figura 7.14 se han graficado los resultados obtenidos, indicando por cada valor un intervalo de confianza del 95%.

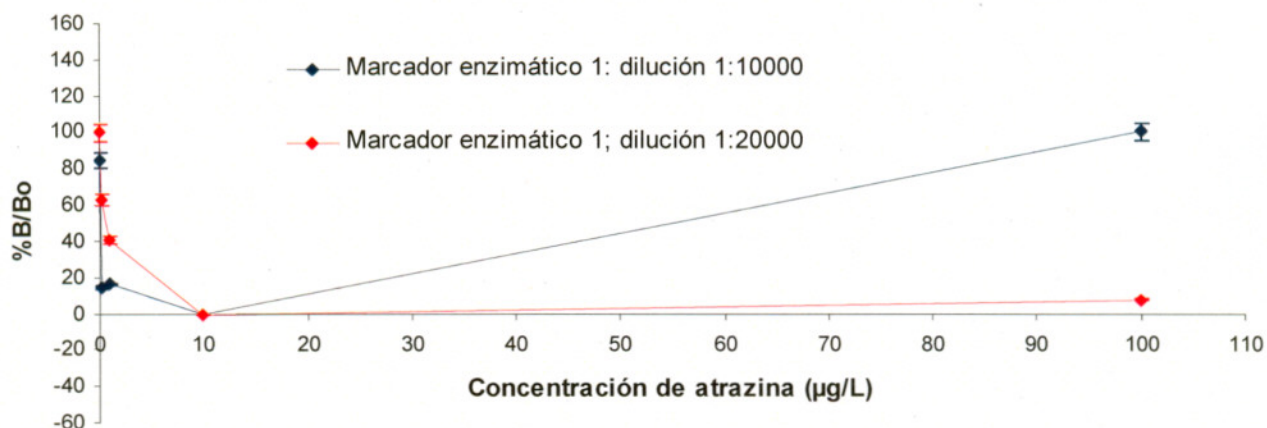


**Figura 7.14** Curvas de absorbancias promedio de Atrazina

Para obtener la relación de marcador enzimático unido a los anticuerpos en presencia de Atrazina (de la muestra), las curvas de absorbancia fueron normalizadas bajo la ecuación (1) para la obtención de %B/B<sub>0</sub>:

$$\frac{\%B}{B_0} = \frac{A - A_{\text{Excess}}}{A_0 - A_{\text{Excess}}} \times 100 \quad \text{Ecuación (1)}$$

La figura 7.15 presenta la gráfica de las absorbancias normalizadas, en donde también se ha incluido el intervalo de confianza al 95%. De acuerdo con Maqbool *et al.*, (2008) para un ELISA de tipo competitivo, las absorbancias más altas corresponden a las concentraciones de Atrazina más bajas. En la figura 7.15 las curvas en color rojo y azul fueron las que siguieron esta tendencia; ambas corresponden al uso de marcador enzimático 1 en dos diluciones distintas. Las gráficas de la figuras 7.14 y 7.15 poseen una escala máxima de 10 µg/L y no de 100 µg/L, como inicialmente se planteó para la medición de Atrazina, ya que esta última concentración no fue cuantificable en ninguno de los casos presentados, pues la tendencia se desviaba.

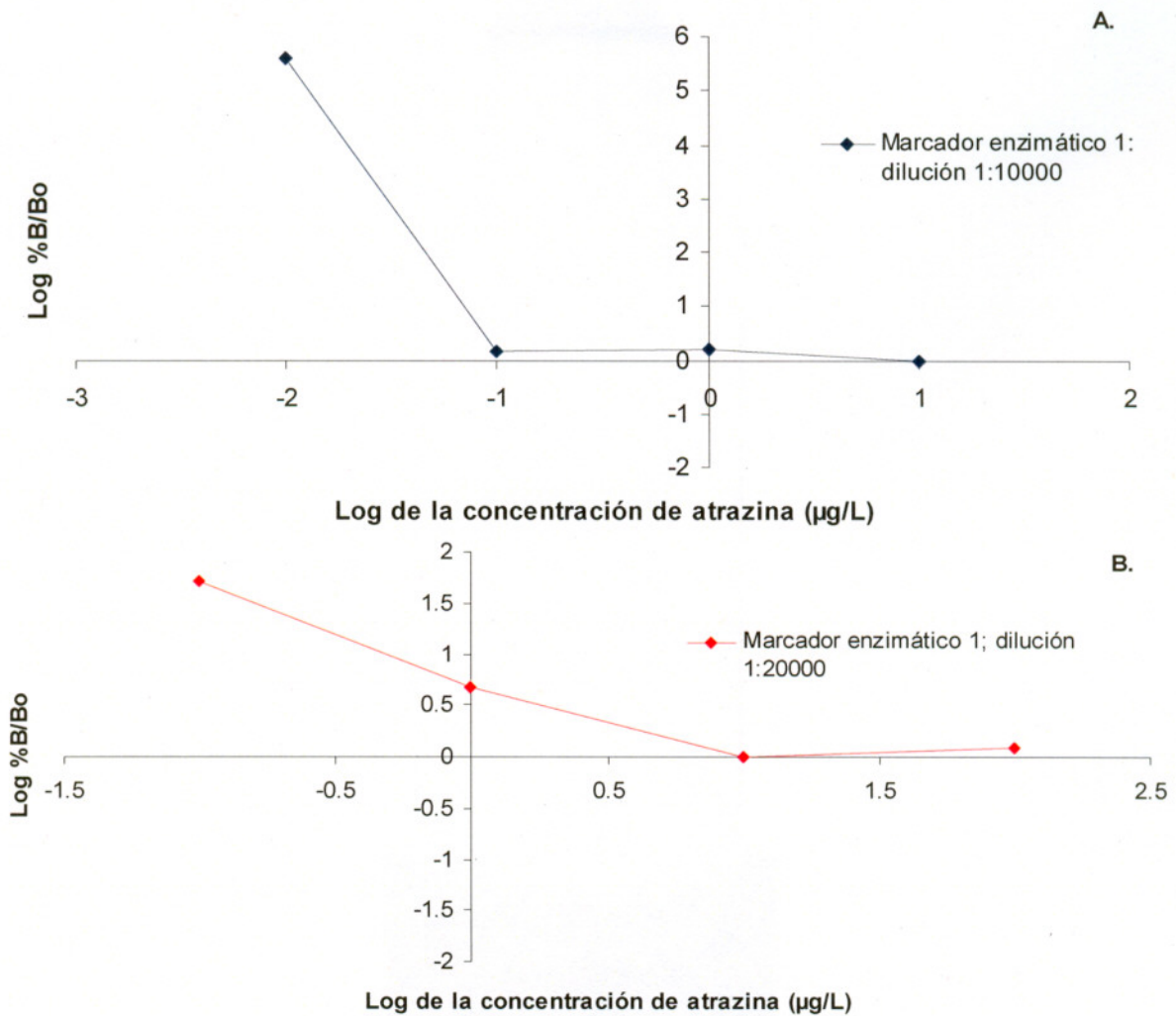


**Figura 7.15** Curvas de absorbancias normalizadas

La linealización de la curva de absorbancia es un procedimiento útil para evaluar los efectos de la matriz utilizada. Por ello muchos autores realizan los cálculos pertinentes por medio de programas comerciales para inmunoensayos basados en modelos logísticos, sin embargo, los resultados pueden ser obtenidos por medio de la siguiente fórmula. La linealización de las curvas se realizó utilizando la siguiente ecuación:

$$\text{Logit } (\%B/Bo) = \frac{\%B/Bo}{100 - \%B/Bo} \quad \text{Ecuación (2)}$$

Los resultados obtenidos fueron graficados (figura 7.16) y de esta manera se demostró la linealidad de los datos. Con el marcador enzimático 1 se obtuvieron las curvas de calibración correspondientes a las diluciones 1:10000 y 1:20000. Con diluciones por arriba de las mencionadas, no fue posible obtener dicha curva. La dilución 1:20000 se eligió por haber presentado resultados reproducibles y comparables con los obtenidos por los autores mencionados.



**Figura 7.16** Linearización de las curvas de absorbancias

La linearización de la curva se utilizó por ser un método sencillo, utilizado en protocolos de inmunoensayos de tipo competitivo. El blanco utilizado consistió en pozos en la placa donde no fueron incubados anticuerpos, por lo que su coloración durante la reacción debió ser nula. También se realizó una evaluación de agua desionizada ya con el método establecido, y las absorbancias obtenidas por triplicado tenían valores muy altos, resultado que ya se esperaba.

Analizando los resultados obtenidos, se encontró que el método se vuelve no confiable utilizando concentraciones altas de Atrazina como 100  $\mu\text{g/L}$  o muy bajas como 0.01  $\mu\text{g/L}$  de Atrazina, por lo que se acortó el intervalo de las concentraciones utilizadas con el objetivo de construir una curva basada en las concentraciones de 1 a 10  $\mu\text{g/L}$  de Atrazina. Es importante mencionar que este intervalo incluye la concentración máxima de Atrazina permitida por la EPA (3  $\mu\text{g/L}$ ) en agua potable y el previsto en la Propuesta de Modificación a la NOM-127-SSA1-1994 (2  $\mu\text{g/L}$ ).

Los resultados obtenidos fueron (al igual que los anteriores) procesados en una hoja de cálculo de acuerdo a la sección 6.1.5. La figura 7.17 muestra las gráficas obtenidas a partir de estos últimos datos, donde se observa que el nivel mínimo de detección del método propuesto es 0.1  $\mu\text{g/L}$ , a diferencia de lo obtenido por Maqbool *et al.*, (2008), cuyo método es reportado con un nivel mínimo de detección de 4  $\text{ng/L}$ . Por otro lado, la literatura revisada menciona la utilización de concentraciones de Atrazina que cubren un intervalo de trabajo muy amplio (100, 10, 1, 0.1, 0.01  $\mu\text{g/L}$ ), mismo que no fue posible obtener bajo las condiciones probadas. Esto pudo deberse a la necesidad de realizar más pruebas.

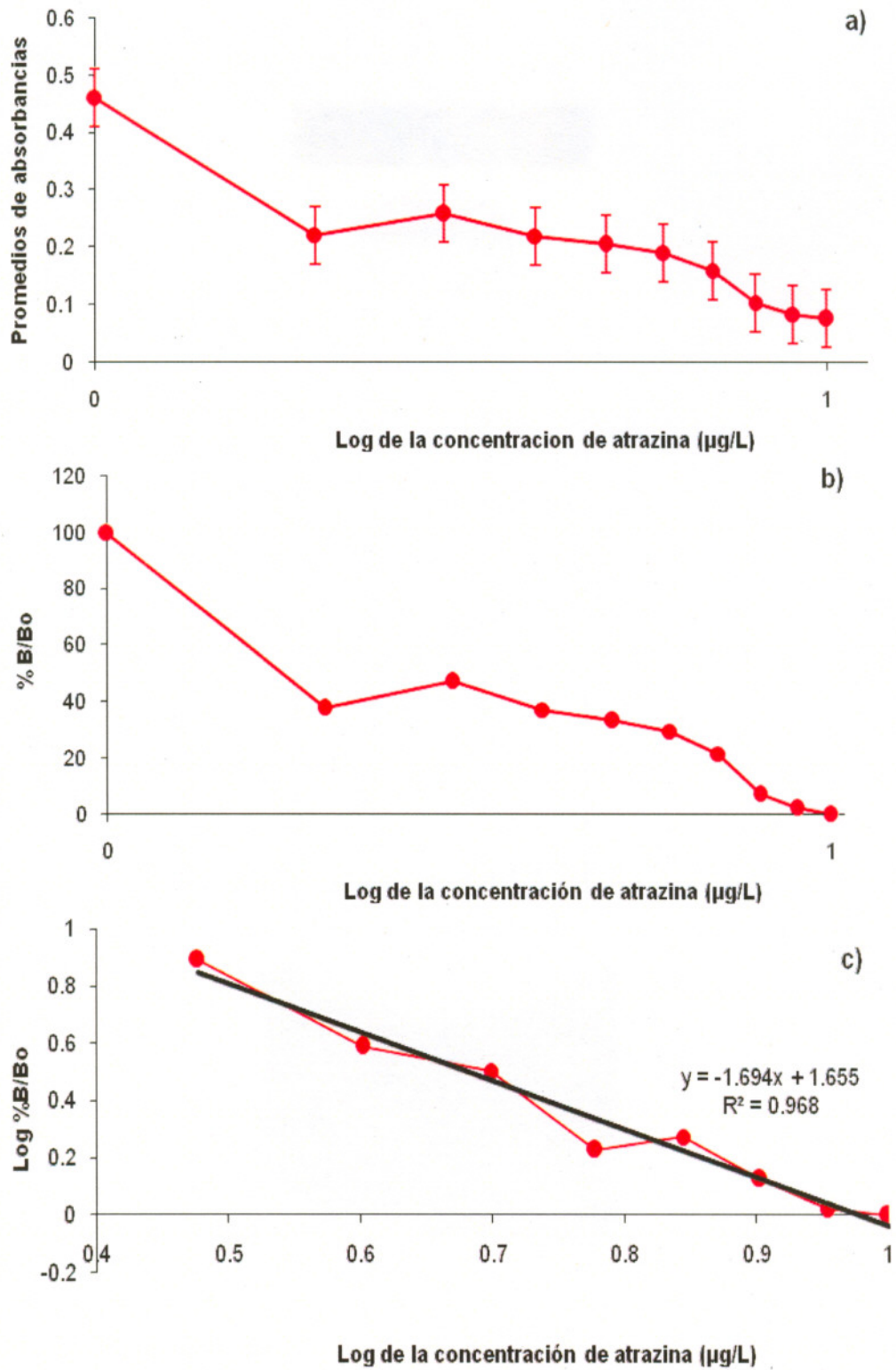


Figura 7.17 Curva de calibración obtenida

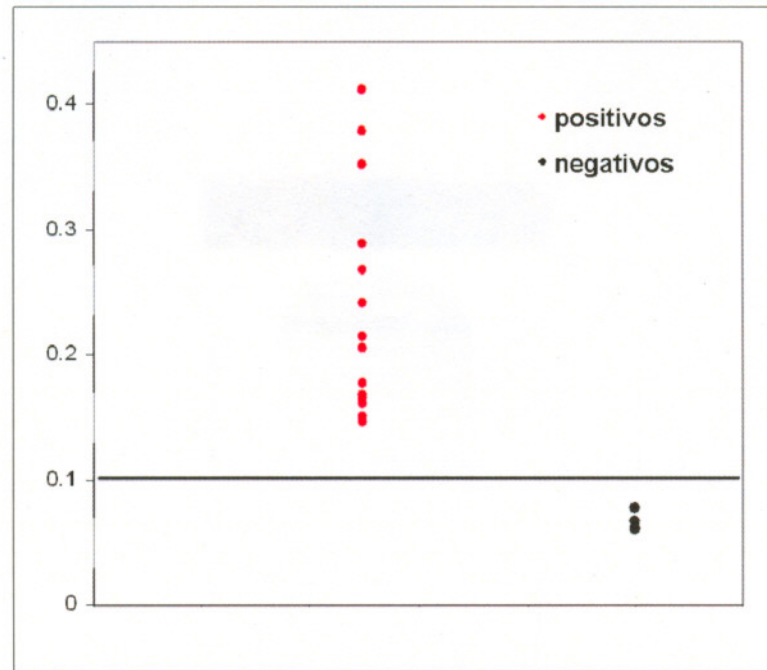
Al tratar con medias muestrales, surge el problema de tomar decisiones sobre los valores relativos de las dos medias, en este caso para determinar que las absorbancias aparentemente positivas son diferentes de las aparentemente negativas, se realizó la determinación *t* de Student para cuando se desconocen las varianzas (anexo C). Se comparó la media de las lecturas de absorbancia de dos grupos (absorbancias positivas y absorbancias negativas) y se encontró que las muestras positivas poseen una diferencia significativa respecto a las medias de las lecturas de un grupo de muestras negativas seleccionado (tabla 7.2). Además se obtuvo el intervalo en el cual se diferencian las absorbancias positivas de las negativas (ver anexo C).

**Tabla 7.2** Coeficiente de variación intraensayo

<b>Coeficiente de Variación</b>			
Nivel	Media	Desviación estándar	Coeficiente de variación %
Muestra negativa	0.658	0.018	2.886
Muestra positiva	0.156	0.009	6.314

Estos resultados se consideran aceptables considerando que se trata de un procedimiento no comercial, por lo que cualquier diferencia que se presentara, sería aceptable. De acuerdo a metodologías de evaluación estadística utilizados en otros métodos reportados, las desviaciones estándar se aplicaron para obtener el punto de corte, valor obtenido con el promedio de las absorbancias (negativas y positivas) más dos desviaciones estándar. Los puntos de corte obtenidos fueron 0.695 y 0.105. Dentro de ese intervalo las absorbancias se consideraron positivas, fuera de él se consideraron negativas (figura 7.18). El valor de absorbancia 0.695 corresponde a la concentración de Atrazina más baja (0.01 µg/L) y 0.105 a la concentración de Atrazina más alta (10 µg/L), intervalo que se observa en la figura 7.17 (curva de calibración).





**Figura 7.18** Dispersión de los valores de absorbancia entre el control negativo y los valores positivos

Las mediciones realizadas para Atrazina mostraron estar dentro del comportamiento esperado por el método, sin embargo, la reproducibilidad de los resultados tendría que ser mejorada. El método propuesto resultó muy útil ya que la linearización de la curva de calibración permitió la comparación directa de las distintas concentraciones de anticuerpos y marcador enzimático utilizadas para así poder elegir aquellas cuyo acoplamiento indique una medición más exacta de la Atrazina.

### 7.3 Evaluación del marcador enzimático con los anticuerpos monoclonales

Se probaron los dos marcadores enzimáticos obtenidos y de acuerdo a su funcionamiento en el ELISA, se determinó que el marcador sintetizado a partir del *hapteno 1* presentó una mejor afinidad hacia los anticuerpos monoclonales utilizados, a pesar de que en la figura 7.6 se muestran ciertas impurezas en el cromatograma correspondiente. La afinidad del *hapteno 2* hacia los anticuerpos monoclonales no fue evidente durante la ejecución del ELISA, ya que los resultados obtenidos discreparon unos con otros y no mantuvieron la relación inversa de concentración/absorbancia. Una explicación a lo anterior es que podrían haber existido pequeñas diferencias en el proceso de síntesis del marcador enzimático, que provocaron que la unión a la peroxidasa no fuera correcta. Es importante mencionar que los anticuerpos fueron adquiridos de manera comercial y que su síntesis monoclonal (por el fabricante) se realizó utilizando Atrazina, por lo que existe una restricción muy grande a reconocer únicamente moléculas de Atrazina o muy parecidas a la Atrazina. Lo anterior sólo representa suposiciones que no podrían ser comprobadas, sin embargo existen muchos

reportes que reconocen la eficiencia del método, aun comparado con análisis más finos de tipo cromatográfico.

De acuerdo a la metodología para el desarrollo del ELISA, resulta de gran importancia estandarizar el método para encontrar la concentración idónea para ser utilizada de marcador enzimático y anticuerpos, que en este caso fue una dilución de 1:20000 y una concentración de 1 µg/mL, respectivamente. Esta relación de anticuerpo-marcador enzimático será la estándar para ser utilizada en el método, pues es la única que presentó resultados de absorbancias ascendentes con respecto a la concentración de Atrazina utilizada.

Se realizaron otras mediciones (no reportados en este documento) en las que se probaron otras concentraciones de anticuerpo (10 µg/mL, 5 µg/mL y 0.3125 µg/mL) en reacción con las dos diluciones de marcador enzimático 1 ya mencionada. Sin embargo, los únicos resultados que fueron congruentes son los obtenidos con la concentración 1 µg/mL de anticuerpo. Se realizaron algunas pruebas con agua potable y con agua desionizada (las cuales no presentaban Atrazina, tabla 7.3). Los resultados obtenidos confirmaron que las absorbancias obtenidas por el método de ELISA propuesto, son coincidentes con el principio de relación inversamente proporcional del método con las concentraciones de Atrazina de la muestras.

**Tabla 7.3** Absorbancias obtenidas para los diferentes blancos

TIPO DE MUESTRA			
	Agua de la llave	Blanco con Ac (Agua desionizada)	Blanco sin Ac
Absorbancia	0.637	0.777	0.056
	0.702	0.828	0.061
	0.645	0.836	0.06

El análisis de muestras de agua común, dará absorbancias dependientes de la cantidad de Atrazina presente (valores de absorbancias menores, mayor concentración de Atrazina presente y viceversa); si se utiliza agua desionizada, las absorbancias obtenidas tendrán valores altos como consecuencia de la captura del marcador enzimático por los anticuerpos (por ausencia de Atrazina) y su posterior reacción con el sustrato. Estos resultados se comparan con los obtenidos por el blanco sin anticuerpo, cuyas absorbancias son muy bajas ya que no existe reacción alguna con el sustrato (por la ausencia del marcador enzimático) y por tanto, no existe presencia de coloración.

Otro resultado importante fue que se determinó que el inmunoensayo debe llevarse a cabo siguiendo los tiempos establecidos y leer la placa una vez que la reacción se detiene, ya que la coloración se ve afectada y por tanto las absorbancias obtenidas. Los resultados pueden ser leídos con software comerciales, sin embargo el método aquí propuesto sólo necesita de una hoja de cálculo.

Los resultados obtenidos en esta investigación pueden llevarse a una perspectiva más amplia, siempre y cuando se adecuen a la técnica elegida. El desarrollo de esta metodología podría alcanzar rangos de medición más amplios, que incluya magnitudes del orden de nanogramos (tal como algunos autores mencionan), sin embargo en este caso no fue posible hacerlo ya que se carecía del equipo que lo obligaba al traslado de las placas, utilizando en algunas ocasiones más tiempo de incubación del mencionado, así como la variación de las condiciones ambientales del ensayo. No obstante, se logró identificar las concentraciones apropiadas de los componentes del ensayo y así, obtener una curva de calibración.

A pesar de que los ELISA son métodos relativamente simples de llevar a cabo, es necesario tener un conocimiento básico del entendimiento de los principios del ELISA. Además resulta necesario tener cuidado con la calidad de los instrumentos que se utilizan (pipetas, lector de ELISA), proporcionándoles la calibración y comprobación necesarias, así como el correcto almacenamiento de cada uno de los reactivos utilizados durante todo el proceso.

Se propone que el método se pruebe bajo distintas concentraciones de anticuerpo y marcador enzimático, para establecer los límites de detección del método de una manera más fina, así como su comparación con concentraciones estándar de Atrazina por medio de técnicas como HPLC (validar el método en comparación con el HPLC).

Se recomienda establecer una curva de calibración con más puntos de referencia para desarrollar un método cuantitativo que sea aplicable a pruebas en laboratorio y campo, así como realizar un estudio de los efectos de matriz y dilución que puede repercutir en el método propuesto.

Como opción alterna, se pueden obtener los anticuerpos, siguiendo un protocolo de inmunización (policlonales) o de manera biotecnológica (monoclonales), para reducir gastos y hacer accesible el método.

## 8 CONCLUSIONES

Se realizó la síntesis de Atrazina ácido caproico para lo cual fue necesario conjuntar dos procedimientos utilizados en la síntesis de compuestos similares, de tal manera que la reacción quedó dividida en dos etapas. Esto resultó de suma importancia para evitar la síntesis de productos no deseados. Durante la reacción de síntesis del hapteno, fue importante mantener las temperaturas controladas en cada paso, así como el pH, ya que resultaron indispensables en la unión de cada componente de la molécula final.

La correcta síntesis de la (2 cloro-4-(isopropilamino)-6- [(carboxipentil) amino]-s-triazina), quedó evidenciada por la reacción de derivatización y posterior análisis por CG-EM de su derivado metilado.

La estructura química del hapteno obtenido resultó correcta como se evidencia al lograr exitosamente ser unido a la peroxidasa y así poder sintetizar el marcador enzimático. Su funcionalidad para el método quedó comprobada al realizar un inmunoensayo ELISA y observar los cambios de coloración. Estos cambios son indicativos de que la síntesis del marcador enzimático fue correcta.

Durante el proceso del inmunoensayo se probaron distintas concentraciones de anticuerpo y marcador enzimático, concluyendo que la concentración de anticuerpo utilizada debe ser 1  $\mu\text{g/mL}$  con una concentración de marcador enzimático de 1:20000, siendo la idónea para estandarizar el ELISA desarrollado.

Existen muchas formas de evaluar los resultados obtenidos. La linearización de las curvas de calibración es la más útil, y así se realizó en este estudio. La curva estándar obtenida posee un coeficiente de correlación  $r^2 = 0.968$ , lo cual significa que el incremento de la concentración de atrazina estará acompañado por el decremento en los valores de absorbancias.

Se pudo obtener una curva de calibración en el intervalo 10  $\mu\text{g/L}$  a 1  $\mu\text{g/L}$ , de tal manera que es posible cuantificar Atrazina siempre que la concentración estuviese en dicho intervalo. Valores más grandes de concentración de Atrazina serían posibles de detectar ampliando el intervalo de la curva de calibración.

El inmunoensayo se realizó para obtener resultados basados en presencia y ausencia de Atrazina, sin embargo tiene un uso potencial para evaluaciones cuantitativas, que requieren de mayor refinamiento en el proceso.

Es necesaria la realización de trabajo adicional para obtener una curva de calibración para un intervalo mayor de concentraciones, lo cual ya no se realizó como parte de este trabajo debido a las dificultades experimentales que había que afrontar.

## 9 BIBLIOGRAFÍA

- Abbas M.N., G.A.E., Mostafa y A.M.A. Homoda. 2001. PVC membrane ion selective electrode for the determination of pentachlorophenol in water, wood and soil using tetrazolium pentachlorophenolate, *Talanta*, vol. 55, p. 647.
- Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR). 2001. Toxicological profile for atrazine. Public Health Service. U.S. Department of Health and Human Services. Atlanta, GE, USA.
- Ahmed F. E. 2001. Analyses of pesticides and their metabolites in foods and drinks. *Trends in Analytical Chemistry*, Volume 20, Issue 11, November 2001, Pages 649-661.
- Baldi L., C. Ferrari y R. Francese. 1978. Process for the production of chloro-amino-s-triazines. United States Patent. 4,099,006.
- Benkert A., F. Scheller, W. Schössler, C. Hentschel, B. Micheel, O. Behrsing, G. Scharte, W. Stocklein, y A. Warsinke. 2000. Development of a creatinine ELISA and an amperometric antibody-based creatinine sensor with a detection limit in the nanomolar range. *Anal. Chem.*, vol. 72, no. 5, p. 916.
- Bester K, y H. Huhnerfuss. 1993. Triazines in the Baltic and North Sea. *Mar. Pollut. Bull.* 26: 423-427.
- Bushway R. J., B. Perkins, S. A. Savage, S. J. Lekousi y B. S. Ferguson. 1988. Determination of atrazine residues in water and soil by enzyme immunoassay. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. Vol. 40 (5); 647-654.
- CICOPLAFEST. 1998. Catalogo Oficial de Plaguicidas. SEMARNAP, SECOFI, SAGAR y SSA. México, D.F. 519 pp.
- Dankwardt A. 1999. Recommendations about the use of immunochemical methods for the FAO/IAEA training and reference centre for food and pesticide control.
- Dunbar B. D., G. D. Niswender, y J. M. Hudson. 1985. Antibody for the detection and quantification of atrazine. United States Patent. 4, 530, 786.
- Dunbar B., B. Riggle y G. Niswender. 1990. Development of enzyme immunoassay for the detection of triazine herbicides. *J. Agric. Food Chem.*, 38, 433-437.
- Dunec A.F., M. Cheregi, J.M. Calatayud, J.V.G. Mateo y H.Y.A. Enein. 2003. Flow Injection Methods of Analysis for Waters. II. Organic Pollutants, *Crit. Rev. Anal. Chem.*, vol. 33, no. 1, p. 57.
- Ercegovich C.D., R.P. Vallejo, R.R. Gettig, L. Woods, E.R. Bogus y R.O. Mumma. 1981. Development of a Radioimmunoassay for Parathion. *J. Agric. Food Chem.* 29, 559-563.
- Fatori D. y W.M. Hunter. 1980. Radioimmunoassay for serum paraquat. *Clin. Chim. Acta.* 100: 81-90.
- Feakin S.J., E. Blackburn, y R.G. Burns. 1994. Biodegradation of s-triazine herbicides at low concentrations in surface waters. *Water Res.* 20: 2289-2296.
- Fernández A., M. Yarto y J. Castro. 2004. Las sustancias tóxicas persistentes en México. SEMARNAT-INE. 260 PP.
- Gabaldon J.A., A. Maquieira, y R. Puchades. 1999. Current trends in immunoassay-based kits for pesticide analysis. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, vol. 39, no. 6, p. 519-538.
- García-Campaña A.M., A. Jean-Jacques y J.M. Bosque-Sendra. 2001. Micellar-enhanced photochemically induced fluorescence detection of chlorophenoxyacid

herbicides. Flow injection analysis of mecoprop and 2,4-dichlorophenoxyacetic acid. *Talanta*, Volume 55, Issue 3, pp 531-539.

- Gaynor J.D., C.S. Tan, C.F. Drury, H.Y. Ng, T.W. Welacky y I.J. van Wesenbeeck. 1995. Atrazine in surface and subsurface runoff as affected by cultural practices. *Water Qual. Res. J. Can.* 30: 513-531.
- Gee S.J., T. Miyamoto, M.H. Goodrow, D. Buster y B.D. Hammock. 1988. Development of an enzyme-linked immunosorbent assay for the analysis of the thiocarbamate herbicide molinate. *J. Agric. Food Chem.* 36: 863-70.
- Glotfelty D.E., M.M. Leech, J. Jersey y A.W. Taylor. 1989. Volatilization and wind erosion of soil surface applied atrazine, simazine, alachlor, and toxaphene. *J. Agric. Food. Chem.* 37: 546-551.
- Hang S. y M. Nassetta. 2003. Evolución de la degradación de Atrazina en dos perfiles de suelo de la provincia de Córdoba. *Revista de Investigaciones Agropecuarias del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria*. Vol 32 (1): 57-69.
- Harrison R.O., M.H. Goodrow y B.D. Hammock. 1991. Competitive inhibition ELISA for the s-triazine herbicides: assay optimization and antibody characterization. *J. Agric. Food Chem.*, 39, 122-128.
- Hennion M.C. y D. Barceló. 1998. Strengths and limitations of immunoassays for effective and efficient use for pesticide analysis in water samples: A review. *Anal. Chim. Acta*, vol. 362, p. 3-34.
- Huber S.J. y B. Hock. 1985. A Solid-phase enzyme immunoassay for quantitative determination of the herbicide terbutryn. *J. Plant Dis. Prot.* Vol. 92; 147-56.
- International Agency for Research on Cancer (IARC). 1999. IARC monograph on the evaluation of carcinogenic risks to humans: some chemicals that cause tumors (SIC) of the kidney or urinary bladder in rodents and some other substances. World Health Organization. Lyon, France.
- Koester C.J., S.L. Simonich y B.K. Esser. 2003. Environmental Analysis, *Anal. Chem.*, vol. 75(12), p. 2813.
- Kolar V., A. Deng y M. Franek. 2002. Production and Characterization of Generic Antibodies against s-Triazine and Sulfonylurea Herbicides. *Food Agric. Immunol.*, vol. 14(2), p. 91-105.
- Koskinen W.C. y S.A. Clay. 1997. Factors affecting atrazine fate in North Central US soils. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* 151: 117-165.
- Liu Y., C.D. Garcia y C.S. Henry. 2003. Recent progress in the development of  $\mu$ TAS for clinical analysis. *Analyst*, vol. 128(8), p. 1002-1008.
- Lippa P.B., Sokoll, L.J., and Chan, D.W., 2001. Immunosensors? Principles and applications to clinical chemistry. *Clin. Chim. Acta*, vol. 314, no. 1, p. 1-26.
- Mandelbaum R.T., L.P. Wackett y D.L. Allan. 1993. Mineralization of the s-triazine ring of atrazine by stable bacterial mixed cultures. *Appl. Environ. Microbiol.* 59, p. 1695-1701.
- Maqbool U., Anwar-ul-Haq, M. Zafar, y M.J. Qureshi. 2008. Comparison of in-house-developed ELISA with HPLC techniques for the analysis of atrazine residues. *Journal of Environmental Science and Health, Part B*, vol. 43(3), p. 224 – 230.
- Maqbool U., Anwar-ul-Haq, M. Zafar, M. Jamil, B. Hock y K. Kramer. 2002. Development of ELISA technique for the analysis of atrazine residues in water. *Environ. Sci. Health*. Vol. B37 (4), p. 307-322.
- Mathews C. K., K. E. van Holde, y K. G. Ahern. 2003. *Bioquímica*. 1368 págs.

- Meakins N.C., J.M. Bubb y J.N. Lester. 1995. The mobility, partitioning and degradation of atrazine and simazine in the salt marsh environment. *Mar. Pollut. Bull.* Vol. 30, p. 812-819.
- Meulenberg E.P. 1999. Investigation of indicative methods in the Netherlands: validation of several commercial ELISAs for pesticides. *Anal. Chim. Acta.* vol. 399, p. 143.
- Morozova V.S., A.I. Levashova y S.A Eremin. 2005. Determination of pesticides by enzyme immunoassay. *Journal of Analytical Chemistry*, vol. 60(3), p. 202-217.
- Newsome W. H. y J. B. Shields. 1981. Radioimmunoassay of PCBs in Milk and Blood. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry.* Vol. 10(3), p. 295-304.
- Newsome W.H. 1986. Potential and advantages of immunochemical methods for analysis of foods. *Association of Official Analytical Chemists journal (USA).* Vol. 69(6), p. 919-923.
- NOM-127-SSA1-1994. Salud ambiental. Agua para uso y consumo humano. Límites permisibles de calidad y tratamientos a que debe someterse el agua para su potabilización.
- Nunes G. S. 2004. Métodos Imunoquímicos para Análise de Resíduos de Pesticidas: Uma Revisão, *Revista Analytica*, Abril/Mayo, N°10.
- Observatorio Latinoamericano de Conflictos Ambientales. 2004. <http://www.olca.cl/oca/plaguicidas>
- Pellizzetti E., V. Maurino, C. Minero, V. Carlin, M.L. Tosato, E. Pramauro y O. Zerbinati. 1990. Photocatalytic degradation of atrazine and other s-triazine herbicides. *Environ. Sci. Technol.* Vol. 24, p. 1559-1565.
- Picó Y., R. Rodríguez y J. Mañes. 2003. Capillary electrophoresis for the determination of pesticide residues. *Trends Anal. Chem.* Vol. 22, p. 133-151.
- Redondo M.J., M.J. Ruiz, G. Font y R. Boluda. 1997. Dissipation and distribution of atrazine, simazine, chlorpyrifos, and tetradifon residues in citrus orchard soil. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* Vol. 32, p. 346-352.
- Ribaudó M.O. y A. Bouzaner. 1994. Atrazine: environmental characteristics and economic of management. *Agricultural Economic Report Number 699 (AER-699).* U.S. Department of Agriculture.
- Richardson S.D. 2003. Water Analysis: Emerging Contaminants and Current Issues. *Anal. Chem.*, vol. 75, no. 12, p. 2831-2857.
- Schneider P. y B. D. Hammock. 1992. Influence of the ELISA format and the hapten-enzyme conjugate on the sensitivity of an immunoassay for s-triazine herbicides using monoclonal antibodies. *J. Agric. Food Chem.* Vol. 40, p. 525-530.
- Seybold C.A., W. Mersie, C. McName y D. Tierney. 1999. Release of atrazine (14C) from two undistributed submerged sediments over a two-year period. *J. Agric. Food Chem.* Vol. 47, p. 2156-2162.
- Sherma J. 2003. Recent Advances in the Thin-Layer Chromatography of Pesticides: A Review, *J. AOAC Int.* vol. 86(3), p. 602-611.
- Sistema de Información Arancelaria Vía Internet. Secretaría de Economía (SIAVI). 2004. [http://www.economia-snci.gob.mx/sic\\_php/ls23al.php?s=24&p=1&l=1#](http://www.economia-snci.gob.mx/sic_php/ls23al.php?s=24&p=1&l=1#).
- Southwick L.M., G.H. Willis, D.C. Johnson y H. Selim. 1995. Leaching of nitrate, atrazine, and metribuzine from sugarcane in Southern Louisiana. *J. Environ. Qual.* Vol. 24, p. 684-690.

- Toxic Release Inventory-99 (TRI99). 2001. TRI explorer: providing access to EPA's toxic release inventory data. Office of Information Analysis and Access. Office of Environmental Information. U.S. Environmental Protection Agency. <http://www.epa.gov/triexplorer>
- Trochimowics H.J., G.L. Kennedy, y N.D. Krivarek. 2001. Alkyl pyridines and miscellaneous organic nitrogen compounds. In: Bingham E, Cohrsson B, Powell CH (editors). Patty's Toxicology. 5th edition. John Wiley and Sons. N.Y. Vol. 4, p. 1193-1372.
- United States Environmental Protection Agency (US EPA). 1983. Guidance for the reregistration of pesticide products containing atrazine as the active ingredient. PB84-149541. Washington, DC, USA.
- United States Environmental Protection Agency (US EPA). 2007. METHOD 4670, Triazine Herbicides as Atrazine in Water by Quantitative immunoassay. Washington, DC, USA.
- United States Environmental Protection Agency (US EPA). 2009. [http://www.epa.gov/oppsrrd1/reregistration/atrazine/atrazine\\_update.htm#cancer](http://www.epa.gov/oppsrrd1/reregistration/atrazine/atrazine_update.htm#cancer) Fecha de consulta: 3 de octubre, 2009.
- Wang S., R.D. Allan, J.H. Skerritt y I.R. Kennedy. 1998. Development of a Class-Specific Competitive ELISA for the Benzoylphenylurea Insecticides. J. Agric. Food Chem. vol. 46(8), p. 3330-3338.
- Weinhold B.J. y T.J. Gish. 1994. Effect of formulation and tillage practice on volatilization of atrazine and alachlor. J. Environ. Qual. Vol. 23, p. 292-298.
- Wie S.I. y B.D. Hammock. 1982. Development enzyme-linked immunosorbent assays for residue analysis of diflubenzuron and BAY SIR 8514. Journal of Agricultural and Food Chemistry. Vol. 30, p. 949-957.
- Wie S.I., R.E. Andrews, B.D. Hammock, R.M. Faust y L.A. Jr. Bulla. 1982. Enzyme-linked immunosorbent assays for the detection and quantitation of the entomocidal parasporal crystalline protein of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* and *israelensis*. Applied and Environmental Microbiology. Vol. 43, p. 891-894.



## GLOSARIO

### **Anticuerpo**

Proteína que es producida en respuesta a un antígeno y la cual tiene la capacidad de unirse al antígeno que estimuló su producción.

### **Anticuerpos Monoclonales**

Copias idénticas de anticuerpos que poseen características comunes de unión.

### **Anticuerpos Policlonales**

Grupo de anticuerpos que difieren en su composición y secuencia de aminoácidos, presentando características de unión distintas entre ellos.

### **Antígeno**

Molécula que induce la formación de un anticuerpo.

### **Curva de Dosis-Respuesta**

Representación de la señal generada por una curva contra la concentración de un compuesto blanco en una serie de concentraciones estándar conocidas.

### **Densidad Óptica**

Sinónimo de absorbancia, es la cantidad de luz que es absorbida en una frecuencia dada.

### **ELISA (Análisis Inmunsorbente Ligado a Enzimas)**

Es un método de inmunoensayo que utiliza un reactivo inmovilizado a la que se adiciona el analito y un conjugado enzimático para generar la señal utilizada en la interpretación de los resultados.

### **Falso negativo**

Interpretación negativa del método que contiene los analitos blanco.

### **Falso positivo**

Interpretación positiva para una muestra definida como respuesta positiva.

### **Hapteno**

Sustancia que directamente no puede inducir una respuesta inmune (por ejemplo, la producción de anticuerpos), pero puede unirse a anticuerpos por mecanismos alternos. Los contaminantes químicos en el ambiente son haptenos.

### **Inmunoensayo Competitivo**

Método de inmunoensayo que involucra una reacción de unión competitiva.

**Límite de detección**

Concentración mínima de sustancia que puede ser detectada con fiabilidad por un método analítico determinado

**Marcador enzimático**

Molécula producida por el acoplamiento de una enzima a un analito blanco y que es responsable de actuar sobre el sustrato para producir una señal detectable.

**Molécula Acarreadora**

Sustancia inmunogénica, que cuando es acoplada a un hapteno, lo convierte en inmunogénico.

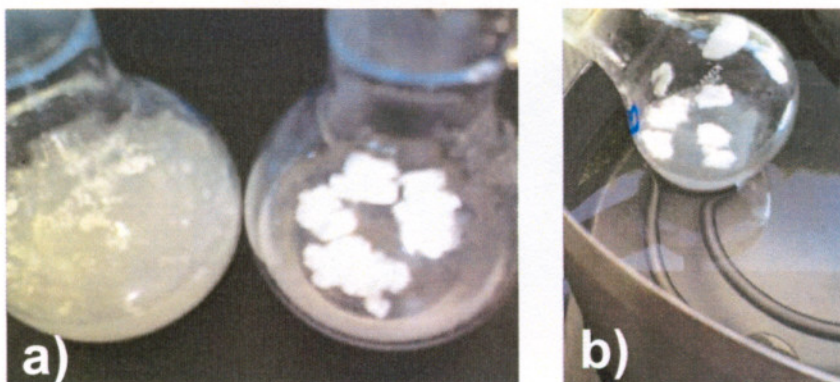
**Sustrato**

Reactivo que produce una señal detectable cuando actúa sobre un conjugado enzimático.

## ANEXO A. Síntesis realizadas para la obtención del hapteno

Se realizó el procedimiento referido por Maqbool (2002) y se obtuvo que las referencias utilizadas como características físicas que debía tener el compuesto resultante, distaba mucho de lo que había obtenido, indicando que no se había logrado formular el compuesto deseado. El compuesto obtenido, ya seco, era muy difícil que tuviera una presentación como polvo, eran fragmentos sólidos difíciles de romper. Cuando se realizó la purificación del producto obtenido por medio de una cromatografía en columna, no se logró disolver el compuesto en acetato de etilo, siempre se observó una separación de ambos. La causa de esta separación se pudo deber a que únicamente el compuesto sintetizado correctamente se disolvería en acetato de etilo, siendo este un paso importante en la purificación. Es importante mencionar que el procedimiento de Maqbool (2002) se realizó en tres ocasiones y siempre se obtuvo el mismo resultado.

Se analizó la metodología de reacción y se encontraron inconsistencias en la misma. La primera de ellas se reflejó en la falta de estequiometría en la reacción, ya que sólo se consideran 5 g de Cloruro cianúrico, cuya concentración correspondiente, no cumple con las moles adicionadas de los demás reactivos utilizados en la reacción (Isopropilamina y Ácido aminocaproico). El mismo caso se aplicó a la Isopropilamina, cuyo volumen mencionado (3 mL) no era suficiente para mantener la estequiometría de la reacción. Por otro lado, el pH se incrementa con NaOH, a concentraciones que ayudan a la reacción a mantenerse entre 11 y 12, pero la concentración de NaOH (60 mM) sugerida no fue lo suficientemente alta como para mantener el pH requerido, haciendo que se adicionara demasiado NaOH y por tanto el volumen de la fase acuosa que se forma en nuestra reacción inicial se incrementaba considerablemente; al retirar el tolueno, quedaba demasiada agua y poco precipitado. Este precipitado, de acuerdo a la literatura, tenía que haber sido soluble en agua pero no se logró disolver (figura A.1). Se decidió probar una concentración doble de NaOH (120 mM), sin embargo el resultado fue el mismo.



**Figura A.1** Síntesis del hapteno. a) Comparación de los productos obtenidos utilizando dos concentraciones de NaOH (60 mM y 120 mM). b) El producto después de evaporar el tolueno. En ningún caso el resultado correspondió con lo esperado

Posteriormente, se optó por utilizar las concentraciones propuestas por Dunbar (1985). Dunbar presenta un trabajo de patente donde las concentraciones utilizadas se mantienen bajo estricta estequiometría, sin embargo todo el proceso se lleva a cabo en una sola reacción, lo cual posibilita en gran manera, la formación de compuestos alternos no deseados y disminuye la probabilidad de obtención del hapteno que se busca.

Durante el proceso se observaron diferencias físicas entre el compuesto obtenido con este método (Dunbar) y el anterior (Maqbool), especialmente en la fase de filtrado y lavado del compuesto donde esta vez se obtuvo un polvo muy fino. A este compuesto se le hizo un análisis cromatográfico, el cual dio como resultado que se trataba de una molécula de peso molecular distinto al que se buscaba (301) y cuya estructura correspondió a la Propazina (figura A.2).

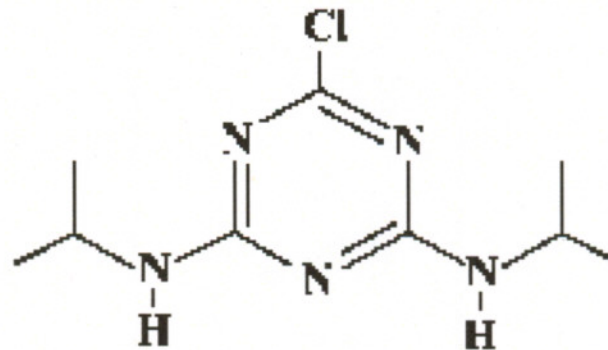


Figura A.2 Estructura química de la Propazina

**ANEXO B. Datos experimentales obtenidos**

Experimento 1  
Prueba inicial de ambos marcadores enzimáticos a dos diluciones

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0.136	0.274	0.144	0.132	0.157	0.457	0.151	0.136	0.271	0.14	0.126	0.274
B	0.675	0.244	0.167	0.193	0.216	0.198	0.146	0.184	0.125	0.26	0.13	0.184
C	0.27	0.129	0.13	0.139	0.153	0.203	0.161	0.153	0.132	0.137	0.14	0.18
D	0.238	0.325	0.116	0.169	0.14	0.381	0.168	0.14	0.108	0.12	0.043	0.182
E	0.184	0.225	0.177	0.232	0.352	0.4	0.214	0.652	0.183	0.253	0.145	0.173
F	0.165	0.376	0.165	0.403	0.432	0.31	0.214	0.566	0.169	0.154	0.197	0.303
G	0.15	0.154	0.164	0.29	0.209	0.213	0.173	0.224	0.274	0.141	0.274	0.168
H	0.156	0.162	0.201	0.176	0.244	0.268	0.205	0.142	0.291	0.18	0.223	0.278
	100	10	9	8	7	6	5	1	0.1	0.01		

Marcador enzimático 1, dilución 1:10000  
 Marcador enzimático 1, dilución 1:20000  
 Marcador enzimático 2, dilución 1:10000  
 Marcador enzimático 2, dilución 1:20000  
 Concentración de Atrazina evaluada

## Experimento 2

Absorbancias obtenidas utilizando ambos marcadores enzimáticos a la dilución 1:20000

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0.061	0.269	0.573	0.465	0.471	0.449	0.077	0.462	0.401	0.492	0.538	0.299
B	0.066	0.354	1.377	0.716	1.736	1.254		0.591	0.666	2.257	0.93	1.327
C		0.483	0.312	1.151	0.86	0.723	0.06	0.31	2.243	0.225	1.556	0.644
D		0.23	0.354	0.472	0.934	0.338	0.061	0.379	0.661	0.307	1.32	0.351
E		0.272	0.25	0.262	0.301	0.633	0.061	0.236	0.544	0.254	0.222	0.319
F	0.062	0.253	0.345	0.519	0.966	0.229		0.356	0.599	0.936	0.214	0.259
G		0.257	0.214	0.717	0.94	0.525		0.256	0.451	1.063	1.493	0.516
H	0.082	0.395	0.794	0.296	0.283	0.293	0.077	0.348	0.369	1.412	0.221	0.456

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0.061	0.274	0.572	0.465	0.473	0.45	0.077	0.458	0.402	0.475	0.512	0.297
B	0.066	0.356	1.375	0.716	1.735	1.252		0.594	0.664	2.914	0.922	1.326
C		0.484	0.312	1.149	0.857	0.722	0.061	0.305	2.243	0.224	1.544	0.638
D		0.234	0.359	0.472	0.932	0.338	0.061	0.38	0.662	0.305	1.311	0.35
E		0.273	0.25	0.262	0.381	0.633	0.061	0.236	0.547	0.254	0.22	0.292
F	0.061	0.253	0.346	0.52	0.967	0.229		0.356	0.599	0.933	0.218	0.24
G		0.261	0.214	0.716	0.94	0.526		0.258	0.453	1.036	1.46	0.491
H	0.082	0.396	0.793	0.281	0.284	0.293	0.079	0.347	0.342	1.376	0.22	0.431

- Marcador enzimático 1, dilución 1:20000
- Marcador enzimático 2, dilución 1:20000
- Blancos sin anticuerpo

### Experimento 3

Absorbancias obtenidas utilizando ambos marcadores enzimáticos a la dilución 1:10000

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<b>A</b>	0.735	0.122	0.148	0.101	0.199	0.167	0.1	0.234	0.411	0.204	0.463	2.375
<b>B</b>	0.241	0.088	0.075	0.178	0.346	0.164	0.378	0.209	0.254	0.222	0.165	0.297
<b>C</b>	0.08	0.12	0.098	0.137	0.176	0.317	0.124	0.093	0.263	0.108	0.11	0.135
<b>D</b>	0.071	0.075	0.078	0.072	0.102	0.113	0.114	0.215	0.082	0.098	0.132	0.158
<b>E</b>	0.08	0.06	0.06	0.06	0.062	0.128	0.097	0.07	0.073	0.097	0.089	0.078
<b>F</b>	0.06	0.056	0.064	0.078	0.077	0.068	0.108	0.13	0.079	0.072	0.088	0.096
<b>G</b>	0.071	0.059	0.057	0.059	0.067	0.061	0.058	0.074	0.071	0.074	0.083	0.172
<b>H</b>	0.06	0.091	0.074	0.055	0.068	0.063	0.06	0.073	0.064	0.06	0.06	0.108

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<b>A</b>	0.733	0.121	0.148	0.101	0.2	0.165	0.1	0.234	0.411	0.204	0.462	2.339
<b>B</b>	0.239	0.089	0.074	0.178	0.346	0.164	0.379	0.21	0.255	0.222	0.165	0.297
<b>C</b>	0.08	0.119	0.098	0.137	0.176	0.316	0.123	0.093	0.261	0.107	0.11	0.135
<b>D</b>	0.071	0.075	0.078	0.072	0.102	0.112	0.115	0.215	0.081	0.098	0.132	0.158
<b>E</b>	0.08	0.059	0.06	0.06	0.062	0.128	0.097	0.07	0.072	0.097	0.089	0.078
<b>F</b>	0.06	0.056	0.064	0.079	0.076	0.067	0.108	0.13	0.08	0.072	0.088	0.099
<b>G</b>	0.069	0.059	0.056	0.059	0.067	0.061	0.058	0.075	0.071	0.075	0.083	0.172
<b>H</b>	0.06	0.088	0.073	0.055	0.068	0.062	0.06	0.074	0.064	0.059	0.061	0.108

Marcador enzimático 1, dilución 1:10000

Marcador enzimático 2, dilución 1:10000

**Experimento 4**  
Absorbancias obtenidas utilizando ambos marcadores enzimáticos a la dilución 1:3200

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<b>A</b>		3.051	0.418	0.958	0.866	0.664	3.134	1.577	0.801	0.627	0.545	0.671
<b>B</b>		1.477	3.602	1.773	3.544	3.845	0.967	0.801	0.944	1.123	0.685	0.368
<b>C</b>		2.321	2.186	2.565	1.705	0.467	2.464	0.937	1	1.273	0.92	0.432
<b>D</b>		3.356	3.259	1.413	0.556	1.838	0.524	1.563	0.64	0.886	0.966	0.329
		2.55125	2.36625	1.67725	1.66775	1.701	1.77225	1.2195	0.84625	0.97725	0.779	0.45
		1.19300912	1.10649988	0.78431143	0.77968607	0.79541735	0.82873509	0.57025953	0.3957213	0.45897919	0.36427402	0.21042767
<b>E</b>		0.663	1.669	3.239	0.48	2.492	0.413	2.224	0.332	1.512	0.906	0.351
<b>F</b>		1.672	1.533	3.205	2.134	1.878	0.569	0.861	0.96	1.596	0.992	0.81
<b>G</b>		3.139	2.098	3.025	2.307	0.577	0.874	2.185	3.118	1.267	0.973	0.176
<b>H</b>		0.91	0.903	1.115	2.065	1.457	0.513	0.613	0.207	0.969	0.168	0.296
		1.601	1.55075	2.646	1.7465	1.601	0.59725	1.47075	1.15425	1.336	0.75975	0.40825
		2.7556938	2.66910499	4.55421687	3.0060241	2.7556938	1.02796902	2.53141136	1.96666093	2.29946365	1.30765921	0.70266781
	<b>[ ]</b>	<b>100</b>	<b>10</b>	<b>9</b>	<b>8</b>	<b>7</b>	<b>6</b>	<b>5</b>	<b>1</b>	<b>0.1</b>	<b>0.01</b>	<b>0</b>
		<p> <span style="display: inline-block; width: 15px; height: 10px; background-color: #c8e6c9; border: 1px solid black; margin-right: 5px;"></span> Marcador enzimático 1, dilución 1:3200  <span style="display: inline-block; width: 15px; height: 10px; background-color: #fff9c4; border: 1px solid black; margin-right: 5px;"></span> Marcador enzimático 1, dilución 1:3200  <span style="display: inline-block; width: 15px; height: 10px; background-color: #bbdefb; border: 1px solid black; margin-right: 5px;"></span> Concentración de Atrazina evaluada         </p>										



### Experimento 5

Absorbancias obtenidas utilizando el marcador enzimático 2 a dos diluciones

	1	2	3	4	5	6	7	8
A	0.777	0.309	0.486	0.417	0.645	0.529	0.407	0.472
B	0.526	0.62	1.06	0.353	0.425	0.521	0.884	0.294
C	0.688	0.637	0.424	0.421	0.28	0.444	0.357	0.259
D	1.321	0.297	0.37	0.29	0.362	0.279	0.302	0.268
	0.828	0.46575	0.585	0.37025	0.428	0.44325	0.4875	0.32325
	1.92446252	1.08251017	1.35967461	0.86054619	0.99477048	1.03021499	1.13306217	0.75130738
E	0.836	0.491	0.53	0.513	0.543	0.442	0.427	0.14
F	3.042	0.264	1.358	0.529	0.377	0.237	0.175	0.35
G	2.45	0.176	1.715	0.195	0.323	0.34	0.225	0.126
H	0.242	0.702	0.222	0.32	0.421	0.214	0.216	0.167
	1.6425	0.40825	0.95625	0.38925	0.416	0.30825	0.26075	0.19575
	16.6751269	4.14467005	9.70812183	3.95177685	4.22335025	3.12944162	2.64720812	1.98730964
[ ]	100	10	9	8	7	6	5	1

- Marcador enzimático 1, dilución 1:10000
- Marcador enzimático 2, dilución 1:20000
- Concentración de Atrazina evaluada

### ANEXO C. Modelo estadístico Distribución *t*

Para cumplir el objetivo de determinar que las absorbancias aparentemente positivas son diferentes de las aparentemente negativas, se realizó una prueba estadística de comparación de medias usando la determinación *t* de Student para cuando se desconocen las varianzas. Se estableció una hipótesis nula ( $H_0 : \mu_1 = \mu_2$ ) y una hipótesis alternativa ( $H_A : \mu_1 \neq \mu_2$ ) a partir de los valores de la tabla C.1. La hipótesis nula afirma que las medias son iguales y la hipótesis alternativa que son diferentes.

**Tabla C.1** Valores utilizados en la evaluación estadística

Nivel	Media	Desviación estándar	n
Muestra negativa	0.658	0.018	7
Muestra positiva	0.156	0.009	4

La estimación de punto de  $\mu_1 - \mu_2$  fue  $0.658 - 0.156 = 0.502$ . Para encontrar el intervalo de confianza fue necesario primeramente obtener una estimación mancomunada de la varianza común (ecuación 1). Esta estimación mancomunada se obtiene calculando el promedio ponderado de las dos varianzas de las muestras que se compararon. Cada varianza de la muestra se pondera por sus grados de libertad. En este caso, el tamaño de las muestras fue desigual, por lo que el promedio ponderado utiliza todos los datos de la tabla C.1.

$$S_p^2 = \frac{(n_1 - 1) s_1^2 + (n_2 - 1) s_2^2}{n_1 + n_2 - 2} \quad \text{Ecuación 1}$$

Sustituyendo los valores:

$$S_p^2 = \frac{6(0.018)^2 + 3(0.009)^2}{7 + 4 - 2} = 2.43 \times 10^{-4}$$

Posteriormente se aplicó la estadística de prueba, utilizando la siguiente ecuación:

$$t = \frac{(x_1 - x_2) - (\mu_1 - \mu_2)}{\sqrt{\frac{sp^2}{n_1} + \frac{sp^2}{n_2}}}$$

$$t = \frac{(0.658 - 0.156) - 0}{\sqrt{\frac{2.43 \times 10^{-4}}{7} + \frac{2.43 \times 10^{-4}}{4}}} = 51.38$$

Siguiendo la regla de decisión,  $\alpha=0.05$  como intervalo de confianza del 95% y con los grados de libertad obtenidos (11) se obtuvieron los valores críticos de  $t: \pm 1.8331$  (por tablas).

$$df' = \frac{\left( \frac{0.018^2 + 0.009^2}{7 + 4} \right)^2}{\frac{(0.018^2 / 7)^2}{7} + \frac{(0.009^2 / 4)^2}{4}} = 10.837$$

$$-1.7959 < t'_{\text{calculado}} < 1.7959$$

Si lo anterior es cierto, la hipótesis nula se aceptaría, pero el valor de  $t$  calculado se encuentra fuera de la región de no rechazo (-1.7959, 1.7959), por lo que se rechaza la hipótesis nula y se acepta la hipótesis alternativa, concluyendo que las medias son diferentes entre si.