

DISSENY D'IMMUNOSENSORS BASATS EN FORMAT HOMOGENI-HETEROGENI

**APLICACIÓ A LA DETERMINACIÓ
DE RESIDUS ORGÀNICS**

Dolors Jornet Olivé



**EDITORIAL
UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA**

Primera edició, 2012

© d'aquesta edició:

Editorial Universitat Politècnica de València

Tel. 96 387 70 12

www.editorial.upv.es

© María Dolores Jornet Olivé

ISBN: 978-84-8363-974-0

Ref. editorial: 2076

Queda prohibida la reproducció, la distribució, la comercialització, la transformació i, en general, qualsevol altra forma d'explotació, per qualsevol procediment, de la totalitat o de part dels continguts d'aquesta obra sense l'autorització expressa i per escrit dels autors.

Dra. ROSA PUCHADES PLA i Dr. ÀNGEL MAQUIEIRA CATALÁ catedràtics del
Departament de Química de la Universitat Politècnica de València,

CERTIFIQUEN:

Que la tesi aquí presentada i que duu per títol *Disseny d'immunosensors basats en format homogeni-heterogeni. Aplicació a la determinació de residus orgànics*, ha estat realitzada per Maria Dolors Jornet Olivé sota la direcció dels sotasignants en el Departament de Química de la Universitat Politècnica de València.

València, 2 de juny de 2010

Dra. Rosa Puchades Pla

Dr. Àngel Maqueira Catalá

a la Padrina

- Neus Diria que han de ser bardisses amunt a aquestes hores (*! fuig corrent. De seguida surt l'Avia Justa cridant-la*)
- Avia Neus!... Neus!... Oh Neus!...
- Magi. (*Des del portal.*) Que són aquest crits, mare? Com és que avaloteu d'aquesta manera?
- Avia Ai! Aguiata, Magina, la noia com fuig?
- Magi. I bé, se'n va a caçar papallones. Hi trobeu cap mal en això?...

*L'Orgull de la Boniquesa.
Francesc Gay, 1925*

...als de casa

*Sempre endavant
Sempre buscant respostes
Sempre esperant en va
No som diferents
Només instants del temps*

Gerard Quintana

Índex de taules	<i>Pàg</i>
Taula 1 – Exemple de classificació d'immunosensors en funció del tipus de detecció	14
Taula 2 - Exemples d'aplicacions de la tecnologia dels biosensors	16
Taula 3 – Herbicides amb major impacte en la conca mediterrània	18
Taula 4 - Tipus d'immunoassaigs aplicats la determinació d'atrazina	25
Taula 5 - Tècniques immunoquímiques utilitzades per a la determinació de sulfonamides i altres antibiòtics	28
Taula 6 - Classificació dels suports RAM	34
Taula 7 - Característiques dels suports RAM	43
Taula 8 - Aplicació dels suports RAM per l'anàlisi de diferents substàncies	44
Taula 9 - Volum de plasma tolerat per diferents suports RAM	45
Taula 10 - Fases mòbils utilitzades en la purificació dels traçadors	63
Taula 11 - Activació de la fase estacionària ADS C18	69
Taula 12 – Protocol de bloqueig i neteja de fase estacionària ADS C18	72
Taula 13 - Característiques dels oligonucleòtids assajats	73
Taula 14 - Percentatge d'oligonucleòtid retingut en les fases estacionàries ADS C18 i C4	74
Taula 15 - Característiques físico-químiques dels aminoàcids estudiats	75
Taula 16 - Etapes bàsiques de funcionament del sensor de	83

captura

Taula 17- Percentatge d'oligonucleòtid retingut amb les fases estacionàries ADS	87
Taula 18 – Percentatge de traçador que elueix en la fase estacionària ADS C18	90
Taula 19 – Característiques analítiques pel sistema atrazina de l'immunosensor en funció de la fase estacionària RAM	97
Taula 20 - Característiques analítiques pel sistema atrazina de l'immunosensor usant diferents anticossos	98
Taula 21 - Paràmetres solvatocròmics per a alguns dissolvents orgànics	100
Taula 22 - Característiques analítiques pel sistema atrazina de l'immunosensor en medi orgànic al 40%	107
Taula 23 - Característiques analítiques per al sistema atrazina de l'immunosensor utilitzant 40% de dissolvent orgànic amb les dues fases estacionàries RAM	108
Taula 24 – Característiques analítiques per al sistema atrazina amb l'immunosensor en funció del volum d'injecció	124
Taula 25 – Condicions d'assaig en el format directe i indirecte	125
Taula 26 - Estudi de repetibilitat de l'immunosensor la determinació d'atrazina en aigua	127
Taula 27 - Estudi de reproductibilitat de l'immunosensor en la determinació d'atrazina en aigua	128
Taula 28 – Selectivitat dels compostos relacionats amb l'atrazina	129
Taula 29 - Determinació de l'atrazina en aigües mitjançant l'immunosensor	132
Taula 30 – Característiques físico-químiques de les aigües analitzades	134

Taula 31 – Percentatge de retenció de diferents traçadors amb les dues fases estacionàries RAM	138
Taula 32 – Característiques analítiques per a l'atrazina amb l'immunosensor en funció de la fase estacionària RAM	141
Taula 33 - Característiques analítiques per a l'atrazina amb l'immunosensor en funció de l'anticòs i de la fase estacionària ADS utilitzats	143
Taula 34 - Anàlisi de mostres d'aigua amb l'immunosensor	145
Taula 35 – Característiques analítiques pel sistema atrazina de l'immunosensor amb les dues fases estacionàries	151
Taula 36 - Percentatge de recuperació d'atrazina en funció del volum de mostra i eluent	152
Taula 37 - Recuperacions obtingudes en l'anàlisi d'atrazina en aigua mineral fortificada utilitzant les fases estacionàries en sèrie	154
Taula 38 - Recuperacions obtingudes en l'anàlisi natural en d'aigua fortificada utilitzant columnes en sèrie	156
Taula 39 - Recuperacions obtingudes en l'anàlisi d'atrazina en una mescla d'aigua natural fortificada utilitzant fases estacionàries en sèrie	157
Taula 40 - Percentatge d'oligonucleòtid i de traçador que es reté reproductibilitat en la fase estacionària ADS C18	163
Taula 41 – Característiques analítiques pel sistema atrazina amb l'immunosensor en funció de l'anticòs	165
Taula 42 - Reactivitat entrecreuada dels compostos relacionats amb l'atrazina	166
Taula 43 - Característiques analítiques pel sistema atrazina amb l'immunosensor en medi orgànic	170
Taula 44 - Anàlisi dels extractes de les mostres de riu mitjançant l'immunosensor	172
Taula 45 - Percentatge de traçador que es reté en les fases	178

estacionàries ADS

Taula 46 - Característiques analítiques pel sistema Sulfatiazole amb l'immunosensor utilitzant el traçador marcat amb una fluoresceïna 182

Taula 47 - Característiques analítiques pel sistema Sulfatiazole amb l'immunosensor utilitzant el traçador marcat amb 3 fluoresceïnes 183

Taula 48 - Selectivitat dels compostos relacionats amb sulfatiazole 185

Taula 49 – Característiques analítiques pel sistema Sulfatiazole amb immunosensor en medi orgànic 188

Taula 50 – Característiques de les aigües analitzades en el sensor 190

Taula 51 – Recuperacions obtingudes en l'anàlisi d'aigües superficials utilitzant l'immunosensor 191

Índex de figures	<i>Pàg</i>
Figura 1 - Estructura bàsica de les immunoglobulines G	5
Figura 2 - Esquema d'un immunosensor	8
Figura 3 - Estructura dels suports ISRP i ADS	36
Figura 4 - Estructura dels suports de sílice combinada	48
Figura 5 - Estructura dels suports SPS i BioTrap	40
Figura 6 - Estructura d'un suport funcionalment mesclat	41
Figura 7 - Estructura dels suports SHP	42
Figura 8 - Esquema de l'immunosensor	46
Figura 9 - Estructura espacial dels oligonucleòtids utilitzats	53
Figura 10 - Estructura de l'atrazina i l'haptè 2d	56
Figura 11 - Estructura del Sulfatiazole i els haptens S4 i S3	57
Figura 12 - Protocol d'acoblament d'haptens a oligonucleòtids aminats mitjançant el mètode de l'èster actiu	60
Figura 13 - Protocol d'acoblament d'haptens a oligonucleòtids aminats mitjançant el mètode del anhidrid mixt	61
Figura 14 - Esquema del funcionament de l'immunosensor H-H	67
Figura 15 - Estructura del traçador 2d-SYM 1FI	77
Figura 16 - Cromatograma de l'oligonucleòtid SYM 16-1FI	80
Figura 17 - Cromatograma dels productes de la reacció de conjugació de l'oligonucleòtid SYM16-1FI a l'haptè 2d	81
Figura 18 - Esquema del funcionament de l'immunosensor de captura	82
Figura 19 - Cromatograma corresponent a l'oligonucleòtid SYM 16-1FI	85
Figura 20 - Cromatograma dels productes de la reacció de conjugació de l'oligonucleòtid SYM16-1FI al haptè 2d	85

Figura 21 - Estructura dels traçadors 2d-SYM 20-1FI (a) i 2d-SYM18-1FI (b)	86
Figura 22 - Cromatograma dels productes de la reacció de conjugació de l'oligonucleòtid SYM18-1FI a l'àcid aspàrtic	89
Figura 23 - Percentatge d'immunocomplex que elueix de la fase estacionària ADS C18 a diferents concentracions d'anticòs	92
Figura 24 - Percentatge d'immunocomplex que elueix de la fase estacionària ADS C18 a diferent força iònica (a) i pH (b)	93
Figura 25 - Registre de calibratge per a l'atrazina utilitzant la fase estacionària ADS C18 (n=6)	95
Figura 26 - Corbes de calibratge de l'atrazina obtingudes amb l'immunosensor en funció de la fase estacionària LiChrospher	96
Figura 27 - Corbes de calibratge de l'atrazina obtingudes amb l'immunosensor H-H en funció de l'anticòs utilitzat	97
Figura 28 - Influència del dissolvent orgànic en l'immunoassaig utilitzant les fases estacionàries ADS. (a) Percentatge de traçador que elueix (b) Percentatge d'immunocomplex que elueix	105
Figura 29 - Corbes de calibratge de l'atrazina amb l'immunosensor H-H en presència de dissolvent orgànic (15%)	106
Figura 30 - Corbes de calibratge de l'atrazina amb l'immunosensor H-H en presència de dissolvent orgànic (40%)	108
Figura 31 - Influència del percentatge de modificador orgànic en la retenció del traçador en la fase ISRP amb dissolvent orgànic al 5%(a) i 20% (b)	111
Figura 32 - Percentatge d'immunocomplex que elueix de la fase estacionària en addicionar dissolvent orgànic	113
Figura 33 - Registre del calibratge per a l'atrazina utilitzant la fase estacionària ISRP (n=6)	114
Figura 34 - Corba de calibratge de l'atrazina amb	115

l'immunosensor en la fase estacionària ISRP (n=6)	
Figura 35 – Percentatge de l'elució de l'immunocomplex en la fase estacionària SPS	117
Figura 36 - Percentatge de l'elució del traçador en la fase estacionària SPS en funció del dissolvent orgànic i la proporció de la fase mòbil	118
Figura 37 - Percentatge d'elució de l'immunocomplex en dissolvents orgànics en la fase estacionària SPS	120
Figura 38 - Registre de calibratge per a l'atrazina utilitzant la fase estacionària SPS (n=6)	121
Figura 39- Corba de calibratge de l'atrazina amb l'immunosensor en la fase estacionària SPS	122
Figura 40 - Corbes de calibratge obtingudes amb l'immunosensor a diferents volums d'injecció (n=3)	123
Figura 41 - Corbes de calibratge de l'atrazina amb l'immunosensor obtingudes en format directe(●) i indirecte(●)	126
Figura 42 - Cromatograma de l'oligonucleòtid SYM18 amb 3FI	137
Figura 43 - Cromatograma dels productes de la reacció de conjugació de l'oligonucleòtid SYM18-3FI a l'haptè 2d	137
Figura 44 - Percentatge d'immunocomplex que elueix a diferents concentracions d'anticòs (a) i pH (b)	139
Figura 45 - Corbes de calibratge de l'atrazina amb l'immunosensor utilitzant les fases estacionàries ADS C18(●) i C4(●) (n=6)	141
Figura 46 - Corbes de calibratge de l'atrazina amb l'immunosensor utilitzant la bateria d'anticossos i les columnes LiChrospher ADS C18 (a) i ADS C4 (b) (n=4)	142
Figura 47 - Esquema del sistema immunosensor amb dues columnes en sèrie	147
Figura 48 - Estudi de l'elució del traçador en la fase estacionària ADS C18 en funció del percentatge de metanol	148

Figura 49 - Percentatge l'elució del traçador en la fase estacionària ADS C18 en funció del cabal d'elució	149
Figura 50 - Corba de calibratge de l'atrazina obtinguda amb l'immunosensor amb etapa prèvia de preconcentració (n=6)	150
Figura 51 - Estructura de la 6-carboxifluoresceïna (6 FAM)	160
Figura 52 - Estructura tridimensional del traçador 2d-SYM29-6FAM	161
Figura 53 - Cromatograma corresponent al oligonucleòtid SYM 29-6FAM	162
Figura 54 - Cromatograma dels productes de la reacció de conjugació de l'oligonucleòtid SYM 29-6FAM a l'haptè 2d	162
Figura 55 - Corbes de calibratge de l'atrazina amb l'immunosensor utilitzant la bateria d'anticossos i la columna ADS C18	164
Figura 56 - Influència del dissolvents orgànics en l'immunoassaig amb la fase estacionària ADS C18 Percentatge d'elució del traçador(a) i Percentatge d'elució de l'immunocomplex (b)	168
Figura 57 - Corbes de calibratge de l'atrazina amb l'immunosensor en presència de dissolvent orgànic a) 15% i b) 40% (n=6)	159
Figura 58 - Cromatograma de l'oligonucleòtid SYM18-1FI	175
Figura 59 - Cromatograma dels productes de la reacció de conjugació de l'oligonucleòtid SYM18-1FI a l'haptè S4	175
Figura 60 - Cromatograma dels productes de la reacció de conjugació de l'oligonucleòtid SYM 18-1FI a l'haptè S3	176
Figura 61 - Cromatograma de l'oligonucleòtid SYM18-3FI	177
Figura 62 - Cromatograma dels productes de la reacció de conjugació de l'oligonucleòtid SYM 18-3FI a l'haptè S4	177
Figura 63 - Cromatograma dels productes de la reacció de	178

conjugació de l'oligonucleòtid SYM 18-3FI a l'haptè S3

Figura 64 - Valors de IC_{50} ($\mu\text{g/L}$) a diferents combinacions de fase mòbil i pH 180

Figura 65 - Valors de IC_{50} ($\mu\text{g/L}$) a diferents combinacions de traçadors i anticossos (a) S4-I (b) S3-I 181

Figura 66 - Corbes de calibratge del Sulfatiazole obtingudes amb l'immunosensors utilitzant l'anticòs S4-I i el traçador S4-SYM 18-1FI 182

Figura 67 - Corbes del calibratge de Sulfatiazole amb d'immunosensor utilitzant l'anticòs S4I i el traçador S-4 SYM 18 3FI 183

Figura 68 - Influència del dissolvent orgànic en l'immunoassaig (a) Percentatge de traçador que elueix de la fase estacionària, (b) Percentatge d'immunocomplex que elueix de la fase estacionària 186

Figura 69 - Corbes de calibratge del Sulfatiazole amb l'immunosensor en presència de dissolvent orgànic (20% i 40%) 187

Abreviatures

2d	Àcid N-(4-clor-6-isopropilamino-[1,3,5] triazin-2-il)-6-aminohexanoic
Ab	Anticòs
ACN	Acetonitril
ADS	Aquil-diol-silica
AOAC	Association of Official Analytical Chemist
BSA	Seroalbúmina
CB	Tampó carbonat
COP	Compost orgànic persistent
DAD	Detector de díode <i>array</i>
DCC	N, N'diciclohexilcarbodiimida
DMF	N,N'dimetilformamida
DMSO	Dimetilsulfòxid
DSR	Desviació estàndard relativa
EDAR	Estació depuradora d'aigües residuals
EDC	Detector de captura
EIA	Immunoassaig enzimàtic
ELISA	Enzimoimmunoassaig en fase sòlida
EPA	Agència de Protecció Ambiental
FAO	Organització per als Aliments i Agricultura de les Nacions Unides
FIA	Anàlisi per injecció de flux
FPD	Detector de fotometria de flama

GC	Cromatografia de gasos
GFF	Glicina-fenilalanina-fenilalanina
HPPA	Àcid 3-(<i>p</i> -hidroxifenil)-propanoic
HPLC	Cromatografia líquida d'alta resolució
HRP	Peroxidasa de rave picant
IC ₅₀	Concentració d'anàlit que provoca una disminució del senyal màxim de 50%
Ig	Immunoglobulina
ISRP	Superfície interna fase reversa
KLH	Hemocianina del mol·lusc. <i>Megathura cremulata</i>
LD	Límit de detecció
LMR	Límit màxim de residus
MAbs	Anticossos monoclonals
MeOH	Metanol
MEKC	Cromatografia capil·lar electrocinètica micel·lar
MS	Espectrometria de masses
NHS	N-Hidroxisuccinimida
NPD	Detector selectiu de nitrògen-F+fòsfor
OMS	Organització Mundial de la Salut
PAbs	Anticossos policlonals
PBS	Tampó fosfat
RAM	Material d'accés restringit
PPCP	Contaminants farmacèutics i productes d'ús personal
RC	Reactivitat Entrecreuada

RD	Rang dinàmic o interval de treball
S3	2-(4-amino-benzenesulfonilamino)-1,3-tiazol-4-il] àcid acètic
S4	6-(4-amino-bezesulfonilamino) àcid nicotínic
SFE	Extracció amb fluid supercrític
SPE	Extracció en fase sòlida
SPS	Superfície semipermeable
SPR	Ressonància de plasmó superficial
TLC	Cromatografia en capa fina
tr	Temps de retenció
UV	Ultraviolat

1 INTRODUCCIÓ	1
1.1 ASPECTES GENERALS	1
1.2 MÈTODES IMMUNOQUÍMICS D'ANÀLISI	4
1.3 IMMUNOSENSORS	7
1.3.1. Principals característiques d'un immunosensor	8
1.3.2 Tipus d'immunosensors	10
1.3.3 Aplicacions dels immunosensors	15
1.4 CONTAMINANTS ORGÀNICS	16
1.4.1 Atrazina	20
1.4.2 Sulfatiazole	26
1.5 NOUS DESENVOLUPAMENTS EN IMMUNOSENSORS	29
1.5.1 Plantejament del format	29
1.5.2 Tipus de suports	31
1.5.2.1 Suports d'accés restringit (RAM)	32
1.5.3 Immunosensor homogeni-heterogeni	45
1.5.4 Problemàtica amb els traçadors	47
2 OBJECTIUS	51
3 MATERIALS I MÈTODES	53
3.1 PATRONS I REACTIUS	53
3.1.1 Oligonucleòtids	53
3.1.2 Plaguicides	54
3.1.3 Reactius i tampons	54
3.1.4 Haptens	55
3.2. INSTRUMENTACIÓ	57

3.3 SÍNTESI DELS TRAÇADORS (HAPTÈ-OLIGONUCLEÒTID)	58
3.4 PURIFICACIÓ DELS TRAÇADOR	62
3.5 PROTOCOL PER IMMUNOSENSOR H-H	63
3.6 MOSTREIG I TRACTAMENT DE LA MOSTRA	66
4 RESULTATS I DISCUSIÓ	67
4.1 ASSAIGS PRELIMINARS	67
4.1.1 Estudi del tipus de fases estacionàries	68
4.1.2 Influència del nombre de bases en la seqüència de l'oligonucleòtid	72
4.1.3 Via general de marcatge	76
4.2 DESENVOLUPAMENT DE L'IMMUNOSENSOR H-H	90
4.2.1 Fases estacionàries ADS C18 i C4	90
4.2.1.1 Influència de dissolvents orgànics	99
4.2.2 Fases estacionàries ISRP i SPS	109
4.2.2.1 Fase estacionària ISRP	110
4.2.2.2 Fase estacionària SPS	116
4.2.3 Influència del volum d'injecció de les fases estacionàries ADS	123
4.2.4 Comparació de formats d'assaig	124
4.2.5 Selectivitat. Reactivitat entrecreuada	128
4.3 ANÀLISI DE MOSTRES D'AIGUA MINERAL	130
4.4 ESTRATÈGIES PER LA MILLORA DE LA SENSIBILITAT	135
4.4.1 Utilització d'un traçador amb major relació de marcatge	135
4.4.1.1 Síntesi i purificació traçador amb 3 fluoresceïnes	135

4.4.1.2 Optimització del immunosensor amb el traçador (SYM 18-3FI)	137
4.4.1.3 Anàlisi de mostres fortificades	144
4.4.2 Sistema de preconcentració mitjançant dues fases estacionàries en sèrie C18 –C4	146
4.4.2.1 Anàlisi de mostres d'aigües naturals	155
4.5 ESTUDI DE L'IMMUNOSENSOR H-H AMB UN NOU MARCADOR FLUORESCENT	159
4.5.1 Síntesis i purificació del traçador	161
4.5.2 Optimització de l'immunoassaig	163
4.5.3 Selectivitat. Reactivitat entrecreuada	166
4.5.4 Estudi de la influència dels dissolvents orgànics	167
4.5.5 Anàlisi de mostres d'aigües superficials	171
4.6 IMMUNOSENSOR H-H PEL SULFATIAZOLE	173
4.6.1 Síntesis i purificació dels traçadors	174
4.6.2 Optimització de l'immunoassaig	177
4.6.3 Selectivitat. Reactivitat entrecreuada	183
4.6.4 Estudi de la influència dels dissolvents orgànics en l'immunoassaig	184
4.6.5 Anàlisi de mostres fortificades i mostres d'aigües superficials	188
5 CONCLUSIONS	193
6 BIBLIOGRAFIA	195
PUBLICACIONS ASSOCIADES	211
RESUMS	212

INTRODUCCIÓ

1.1 ASPECTES GENERALS

Aproximadament dues terceres parts de la superfície de la Terra estan cobertes d'aigua. No obstant això, l'home només en pot utilitzar directament un 1 %. Nombroses activitats humanes exerceixen una gran pressió sobre aquest recurs que esdevé escàs, mentre incrementa la seua demanda amb el creixement global de la població. La utilització d'aigua sempre ha estat condicionada per la seua qualitat, originalment depenent de processos naturals com, per exemple, l'erosió de les roques. Però les activitats urbanes i industrials mal plantejades o agressives han provocat la introducció de tot tipus de contaminants al medi a través de fonts de contaminació difusa (agricultura) o bé puntuals, com per exemple, efluents industrials, depuradores d'aigües residuals (EDAR) i abocadors. Això fa que s'alliberen al medi una quantitat i diversitat creixent de compostos que plantegen un greu problema de contaminació global [1], especialment els tòxics i persistents.

Alguns d'aquest compostos, els anomenats contaminants emergents, estan generant un gran interès pels seus efectes tant en la salut pública com en el medi ambient [2].

Dins d'aquest tipus de substàncies hi trobem plaguicides, compostos organometàl·lics, perfluorats i bromats, hormones, fàrmacs i productes d'higiene personal [3].

En els últims anys, s'ha prohibit la utilització i vessament d'alguns plaguicides com els organoclorats i productes industrials com els policlorobifenils, dioxines i furans, que per la seua toxicitat, persistència i

bioacumulació, produeixen efectes perjudicials en la salut humana i en el medi ambient. Aquestes substàncies es transporten a grans distàncies i s'han dispersat pel món, fins el punt d'esdevenir una preocupació global. Per aquesta raó, a escala internacional s'han pres accions per a la seua eliminació, com per exemple el Protocol sobre els Compostos Orgànics Persistents (COP) de la UNECE (*United Nations Economic Commission for Europe*, 1998) i el Conveni d'Estocolm que afecta a 12 COP. Així, ja fa uns anys que s'estan desenvolupant processos i productes alternatius més respectuosos pel medi ambient; en general, són substàncies més polars (menys bioacumulables) i més fàcilment biodegradables (menys persistents) [4].

Tot i això, la quantitat de contaminants que estan regulats representen una petita fracció de les substàncies químiques que trobem en el medi ambient a conseqüència de l'activitat humana. A causa del nombre extens i creixent de contaminants, hi ha la necessitat de desenvolupar nous mètodes que facin possible del control d'aquests.

A la necessitat de millora de l'eficiència de l'agricultura i ramaderia, hi trobem associada la utilització generalitzada de plaguicides i fàrmacs. L'ús racional dels primers en l'agricultura té com a resultat la producció d'aliments d'alta qualitat, protegint les collites sense disminuir els atributs que els fan òptims des d'un punt de vista nutricional. No obstant això, l'aplicació intensiva de plaguicides ha tingut com a resultat la contaminació de l'atmosfera, d'aigües, de sòl, i conseqüentment, la

contaminació indirecta de productes alimentaris i sistemes biològics [5], que representen un risc ambiental i un perill per a la salut [6].

Els residus de fàrmacs, especialment d'antibiòtics en aigües i aliments constitueixen un important problema, tant a nivell sanitari com industrial. S'ha demostrat l'efecte tòxic i cancerigen d'alguns residus d'antibiòtics en els aliments, així com la seua implicació en l'aparició de resistències microbianes en espècies patògenes per a l'home [7-9].

En resposta a aquest problema, les administracions han establert, per a aigües uns valors màxims de contaminants.

La necessitat creixent d'avaluar i posteriorment controlar el seu impacte ambiental i sanitari fa que tingui gran importància disposar de metodologies d'anàlisi ràpides, econòmiques i robustes, que faciliten la informació analítica tant a les institucions i organismes de control, com als sectors productius i als usuaris, per tal de preservar el medi ambient i millorar la qualitat de vida de la població.

La majoria de contaminants orgànics s'analitzen mitjançant tècniques cromatogràfiques com la cromatografia de gasos (GC) [10], la cromatografia líquida (LC) [11] i la cromatografia supercrítica (SFC) [12] combinades moltes vegades amb espectrometria de masses (MS). En general, els procediments per a la preparació de la mostra abans de l'anàlisi cromatogràfic són costosos en temps i equipament. Aquest processos consisteixen en l'extracció (líquid - líquid, fluid supercrític i extracció en fase sòlid), la neteja (separar els anàlits de altres components

co-extrets) i de vegades la derivatització de l'anàlit per poder-lo determinar amb més facilitat [13-15].

Si ens centrem en el medi ambient, que es caracteritza per tenir matrius complexes amb multitud de contaminants a nivell de traces, s'ha hagut de millorar la majoria de procediments analítics per poder determinar-los de forma més eficaç [16].

Per això s'han desenvolupat tècniques analítiques alternatives, com les immunoquímiques, que per les seues característiques es poden usar com a mètodes de cribratge (*screening*). Aquestes tècniques, basades en les propietats d'unió específica d'un anticòs (Ab) a un antigen (Ag), tenen una elevada sensibilitat i selectivitat intrínseca, tot permetent la determinació d'un anàlit a nivell de traces amb la utilització d'una metodologia senzilla, còmoda i relativament barata [17].

Totes aquestes propietats han ampliat el camp de treball i la posada en funcionament de nous formats analítics. Aquests desenvolupaments han començat a consolidar-se de manera que, per exemple, la EPA ha establert nous mètodes oficials d'anàlisi de diversos contaminants basats íntegrament en la immunoanàlisi [18, 19].

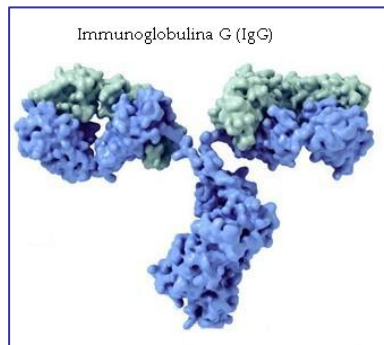
1.2 MÈTODES IMMUNOQUÍMICS D'ANÀLISI

Un immunoassaig és un procediment analític que es basa en la reacció antígen-anticòs amb un sistema que integra la detecció i mesura.

Les tècniques d'immunoquímiques d'anàlisi aplicades a la determinació de contaminants ambientals utilitzen com a reactiu principal els anticòsos.

Les característiques dels anticossos (la seua afinitat i especificitat) determinen les prestacions analítiques del mètode immunoquímic i, per tant, són clau en el desenvolupament d'aquests sistemes.

Els anticossos són proteïnes animals del tipus de les globulines, també anomenades immunoglobulines. Les immunoglobulines G es classifiquen en funció del tipus de cadena pesant, en diferents classes i subclasses, essent les més abundants les del tipus G (IgG), amb un massa molecular aproximada de 150.000 Daltons (Figura 1). En general, l'estructura bàsica de les immunoglobulines dels mamífers està formada per dues cadenes peptídiques lleugeres idèntiques i per dues cadenes pesants també iguals. Aquestes darreres estan unides mitjançant ponts disulfur i en la regió constant tenen hidrats de carboni com a grup prostètic.



*Figura 1 - Estructura bàsica de les immunoglobulines G
Font: U.S. National Library of Medicine.*

En la generació d'un anticòs que respongui selectivament a un antigen s'han de tenir en compte dues característiques primordials: per una part la immunogenicitat o la capacitat que presenta la molècula per a generar

resposta immune front a un organisme donat i, per altra part, l'antigenicitat o particularitat de l'antigen que fa que aquest sigui reconegut per un determinat anticòs. Ambdues propietats poden o no estar presents en un determinat antigen. Les molècules de mida petita, anomenades haptens, són poc immunogèniques per si mateixes i no són capaces d'induir una resposta immunodominant, però unides covalentment a una molècula portadora, usualment proteïnes com KLH, BSA, CONA, OVA, es comporten com a immunògens (arribant a constituir l'únic immunodominant del conjugat)

En funció del procediment utilitzat per a la seua obtenció hi ha diferents tipus d'anticossos: **policlonals, monoclonal i recombinants.**

Els anticossos policlonals s'obtenen del sèrum d'animals immunitzats amb un antigen. El conjunt dels Abs obtinguts del sèrum són conseqüència de la selecció clonal dels limfòcits B que produeixen anticossos contra l'antigen. Un antigen pot presentar diferents epítops (regió de l'antigen reconeguda per un anticòs) i cadascun d'ells pot ser reconegut per un clon de limfòcits B que produirà molècules Ig amb una seqüència característica. És per això que en el sèrum d'un animal immunitzat s'acumulen un nombre desconegut i possiblement elevat de diferents molècules de Ig específiques, en major o menor mesura, de l'antigen. Es tracta doncs, d'un sèrum produït per l'acció de síntesis de nombrosos clons de limfòcits B [20].

El procés d'obtenció d'un anticòs monoclonal és més complex; es produeixen *'in vitro'* i són la conseqüència de l'activitat de síntesis d'un

únic clon cel·lular de limfòcits B que s'ha aïllat i es manté en cultiu en el laboratori.

També existeix tecnologies per a la producció d'anticossos sense recórrer a la immunització d'animals. És la denominada tecnologia dels anticossos recombinants. Els avanços en la tecnologia gènica han facilitat en gran mesura la manipulació genètica, producció, identificació i conjugació de fragments d'anticossos, de manera que s'han obtingut nous anticossos multivalents i multiespecífics [21].

Més recentment s'han utilitzat els anomenats "*plastic-antibodies*", basats en polímers d'impressió molecular (MIP,s) [22]. Són matrius sintetitzades artificialment que presenten, en teoria, la capacitat de reconèixer i interaccionar de forma específica amb els compostos pels quals han estat sintetitzats. És a dir, es tracta de materials biomimètics que reproduïxen d'una manera més bàsica el mecanisme de reconeixement dels sistemes biològics (hormona-receptor, enzim-substrat, antígen-anticos). Idealment, aquest és el comportament que caldria esperar; no obstant, en la pràctica no succeeix així, degut, entre altres limitacions, a l'existència d'interaccions de naturalesa diversa [23].

1.3 IMMUNOSENSORS

Un immunosensor es un dispositiu compacte que respon de forma selectiva a un anàlit generant un senyal físic quantificable. Aquest dispositiu incorpora un element de reconeixement (material immunològicament actiu, com anticossos) associat a un sistema de

transductor (Figura 2) [24, 25]. La interacció de l'anàlit amb els anticossos provoca la variació del senyal primari (elèctric, massic, tèrmic o òptic) que es transforma en un senyal secundari del domini elèctric mitjançant el transductor. La informació d'aquest senyal secundari està relacionada amb la concentració de l'anàlit reconegut en l'etapa de generació del senyal [26].

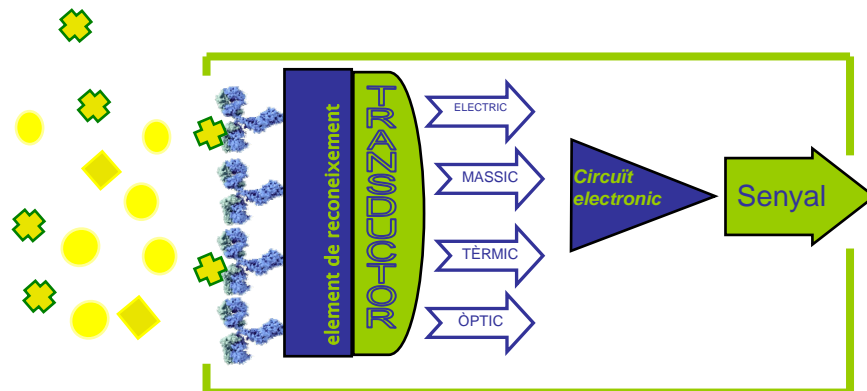


Figura 2 - Esquema d'un immunosensor

1.3.1. Principals característiques d'un immunosensor

Els mètodes d'anàlisi que utilitzen immunosensors, per la naturalesa del seu senyal així com pel seu disseny i configuració, presenten una sèrie d'avantatges respecte les tècniques clàssiques d'anàlisi. Com s'ha descrit anteriorment, els sensors ens permeten pensar en una integració total del procés analític fins al punt de poder obtenir la informació necessària en temps reduïts i *in situ*.

En particular, els immunosensors ens ofereixen avantatges respecte altres mètodes immunoquímics gràcies a la seues característiques: integració del procés analític, automatització, millora de la precisió i de la sensibilitat, selectivitat i capacitat de treball.

Les necessitats actuals d'utilitzar equips de camp de manipulació senzilla, ens duen al desenvolupament de dispositius portàtils que cal que siguin cada vegada més robusts i amb una alta selectivitat, garantida per l'especificitat dels elements de reconeixement.

Una altra característica és la capacitat de realitzar anàlisi en temps real, per al seguiment i control de processos, útil per una actuació ràpida; per exemple, en la retirada de matèries primes o la monitorització ambiental.

Si es volen aplicar a la detecció i determinació d'anàlisis amb efectes tòxics sobre la salut humana i animal fins a concentracions de parts per billó ($\mu\text{g/L}$), cal que els immunosensors tinguin una alta sensibilitat. Així, per exemple, s'han descrit biosensors per a la determinació de residus de plaguicides capaços de detectar quantitats inferiors als LMR exigits per la llei [27].

Per altra banda, els immunosensors permeten operar en modes no explotats en els immunoassaigs tradicionals. Així, els immunoabsorbents usats en els sensors poden ser recanviats després de cada assaig o bé regenerats mitjançant la reversió de la unió immunoquímica, degut a la naturalesa no covalent dels enllaços que es formen entre els anticossos i els antígens o haptens [28-29].

Els mètodes utilitzats per a aconseguir la reversió de l'immunoabsorbent estan generalment basats en l'exposició a dissolucions d'alta concentració salina, dissolucions de valor extrem de pH (sobre tot el pH àcid), o dissolvents orgànics. Tots els casos són condicions de desnaturalització de proteïnes [30]. Així, els immunoabsorbents no tenen una vida il·limitada, ja que o bé el reactiu immobilitzat acaba desnaturalitzant-se o bé el suport perdent propietats.

La utilització d'anticossos de molt alta afinitat condueix a sistemes pràcticament irreversibles [31], la qual cosa implica que els immunoabsorbents són d'un únic ús i els immunosensors resulten poc pràctics. Així doncs, és aconsellable l'ús d'un sistema d'afinitat mesurada per a assegurar la reusabilitat de l'immunoabsorbent. Per contra, una disminució de l'afinitat dels anticossos es tradueix en una menor capacitat de l'immunosensor per a detectar l'anàlit i per tant, en una menor sensibilitat. En aquest sentit, s'ha d'arribar a una situació de compromís entre sensibilitat i reusabilitat [32, 33].

1.3.2 Tipus d'immunosensors

Una primera classificació dels immunosensors, en funció del lloc on es produeix la reacció immunoquímica, els divideix en **homogenis** i **heterogenis**. En els primers, la interacció immunològica té lloc en dissolució, sense que els immunocomplexos formats se separin de la resta de la matriu. En el cas dels immunosensors heterogenis, almenys un dels immunoreactius està immobilitzat sobre un suport, de manera que la interacció immunoquímica té lloc sobre la superfície del suport, essent

possible la separació els immunocomplexos formats de la resta de la matriu.

En els sensors heterogenis, un aspecte important és la separació dels productes de la immunoreacció. Aquesta separació en funció de la interacció entre fase mòbil i estacionària dóna lloc a una separació efectiva.

Una de les metodologies més senzilles d'immobilització de biomolècules és la adsorció en un suport sòlid. Les fases sòlides més utilitzades són les de poliestirè, sílice, policarbonat, vidre, etc. [34, 35]. Els inconvenients d'aquesta tècnica són la possible desorció de la molècula biològica i la aleatorietat de la immobilització respecte als grups funcionals implicats en la bioreacció.

La immobilització més habitual en immunosensors consisteix en la creació d'un enllaç covalent entre el suport i el reactiu. Una alternativa amplament utilitzada consisteix en la immobilització mitjançant interaccions bioespecífiques de gran intensitat, com la unió de la biotina a l'avidina. La interacció dels anticossos amb la proteïna A també s'ha utilitzat en la preparació d'immunoadsorvent, utilitzant únicament la bioafinitat entre aquesta proteïna i les immunoglobulines [36].

Tots aquests immunoadsorvents han de tenir una sèrie de requisits indispensables per al correcte funcionament de l'immunosensor, com són la compatibilitat del suport amb el sistema de detecció emprat i l'estabilitat (tant mecànica com immunològica) del mateix.

Els suports utilitzats es poden classificar [37] en funció de la seva naturalesa com a :

- Silícics i silicats: Xips de silici, òxid de silici, vitris, etc.
- Metalls: or, platí, plata, crom, níquel, etc
- Carboni: grafit, diamant, ful·lerens, compòsits, etc.
- Polímers sintètics: polimetil, metacrilat, policarbonat, poliestirè, poliamides, teflons, silicones,etc.

i en funció de la seva presentació en:

- Suports porosos (membranes, gels, etc.)
- Suports no porosos

Una altra classificació dels immunosensors és la realitzada en funció de com es produeix la interacció Ab-Ag, de forma **hidrostàtica** o **hidrodinàmica** [38].

En un sensor hidrostàtic l'element immunoreactiu és mòbil, posant-se en contacte amb la dissolució a mesurar simplement per immersió, de manera que la dissolució problema roman estàtica. En un sensor hidrodinàmic la superfície immunoactiva és fixa, i un sistema de flux s'encarrega de transportar els reactius i les mostres fins a la superfície. Els hidrodinàmics presenten major versatilitat i permeten l'automatització del procés.

L'automatització dels mètodes immunoanalítics constitueix, en la pràctica, una necessitat, sobretot quan es desitja aplicar-los en processos de control de matèries primeres, producció alimentària i en estacions

d'alarma, on és necessari analitzar un gran nombre de mostres de forma ràpida i fiable. En conseqüència, l'ús d'immunosensors en flux afegeix avantatges enfront dels immunoassaigs tradicionals.

Si analitzem les possibilitats d'obtenir un senyal mesurable de la interacció Antigen–Anticòs, aquesta mesura pot ser **directa (sense marcador) i indirecta (amb marcador)**.

El format més utilitzat és l'indirecte, on el marcatge de les espècies proporciona un senyal analític relacionat amb la quantitat de complex Ag-Ab que s'ha format; els immunosensors que utilitzen marcatge enzimàtic necessiten una segona etapa de rentat de l'enzim. En la mesura directa l'antigen o l'anticòs es troben immobilitzats en una superfície sòlida abans de l'addició de la mostra. La unió anàlit-anticòs provoca una petita alteració en interaccions electrostàtiques localitzades. Per mesurar aquestes petites variacions que es produeixen en la interfase superfície-dissolució degudes a la formació de l'immunocomplex Ag-Ab [39], s'utilitzen diferents tècniques com la ressonància de plasmó superficial i d'ona evanescent [40, 41]. La Taula 1 recull alguns dels sistemes de detecció més utilitzats [42].

Els detectors òptics són molt populars en el cas dels immunosensors que utilitzen marcatge, ja que pràcticament tots els marcadors utilitzats habitualment es poden quantificar mitjançant mètodes òptics. Les bases d'aquest tipus de sensors són els canvis d'absorció, fluorescència, luminescència, dispersió, índex de refracció, etc.

Així doncs s’han desenvolupat diferents immunosensors òptics en funció del tipus de transductors i de la propietat mesurada.

Taula 1 – Exemple de classificació d’immunosensors en funció del tipus de detecció

ÒPTICS
Absorciometria, luminescència...
Ressonància de plasmó superficial
Interferometria
Ona evanescent
Fenòmens nanofotònics (Guies d’ona, silici porós)
ELECTROQUÍMICS
Potenciomètric
Amperomètric
Voltamperomètric
Impedimètric
Transistor d’efecte de camp (IMFET)
MÀSICS
Piezoelèctrics
Ona acústica de superfície
TERMOELÈCTRICS
Termistors
MAGNÈTICS
ALTRES (Radioquímics...)

Per valorar la importància de l’estudi i desenvolupament dels sensors cal destacar que la Comissió V-4 de la IUPAC declarà [43] els immunosensors que utilitzen transductors òptics com “un tema nou d’interès” indicant

que "combinen la magnífica selectivitat de reconeixement molecular dels anticossos i l'excel·lent sensibilitat de la detecció espectroquímica".

1.3.3 Aplicacions dels immunosensors

El nombre de sensors descrits a la literatura és enorme, com també ho són els possibles camps d'aplicació [44].

Recerca bàsica: Estudi de processos electroquímics en dissolució, cinètica de reaccions, constants d'estabilitat, coeficients de difusió d'ions en sòls o paràmetres cinètics en processos enzimàtics.

Anàlisi clínica: Desenvolupament de dispositius portàtils per tal de mesurar mostres tant complexes com teixits, líquid amniòtic, sang, plasma, saliva o orina. Els estudis fins ara s'han centrat principalment en la mesura de glucosa, creatina, urea o colesterol, marcadors tumorals, sensors invasius *in vivo*, etc. [45-47].

Medi ambient: Determinació de contaminants en aigües (residuals, potables, subterrànies i superficials), anàlisi de sols i fertilitzants, determinació de traces, de gasos en l'atmosfera, etc.. Un gran nombre de sensors i equips s'han desenvolupat per tal d'oferir al mercat la possibilitat de millorar el control i la monitorització de paràmetres d'interès mediambiental [48-52]. La Taula 2 recull algunes de les principals aplicacions dels biosensors.

Taula 2 - Exemples d'aplicacions de la tecnologia dels biosensors

Agent analitzat Exemple	Tipus d'interacció	Element reconeixement	Sistema de transducció	Ref.
Virus				
<i>Virus de la febre aftosa</i>	Bioafinitat	Anticòs	Piezoelèctric	53
Protozoous				
<i>Gyptosporidium</i>	Bioafinitat	Oligonucleòtid	Electroquímic	54
Microorganismes patògens				
<i>E. coli, legionel·la</i>	Bioafinitat	Anticòs	Piezoelèctric	55
Biotoxines				
<i>Enterotoxines</i>	Bioafinitat	Anticòs	Ona Evanescent	56
Antinutrients				
<i>Oxalat (te)</i>	Biocatalítica	Enzim	Amperomètric	57
Plaguicides				
<i>Paraoxon</i>	Biocatalítica	Enzim	Òptic	58
Fertilitzants				
<i>Nitrats</i>	Biocatalítica	Enzim	Òptic	59
Contaminants orgànics				
<i>PCB</i>	Bioafinitat	Anticòs	Electroquímic	60
Additius alimentaris				
<i>Sorbitol</i>	Biocatalítica	Enzim	Amperomètric	61

1.4 CONTAMINANTS ORGÀNICS

Com s'ha comentat anteriorment, gairebé tots els contaminants orgànics tenen una elevada toxicitat, persistència i es transporten amb facilitat per l'aire i l'aigua. Aquestes espècies s'acumulen en els ecosistemes terrestres i aquàtics, la qual cosa els fa especialment perjudicials per a la salut humana i pel medi ambient. Entre aquest contaminants orgànics hi ha els residus de plaguicides, medicaments veterinaris, fàrmacs i els

contaminants farmacèutics i productes d'ús personal (PPCP) "*Pharmaceuticals and Personal Care Products*".

La FAO/OMS defineix el terme plaguicida com "qualsevol substància o mescla d'elles utilitzada per a prevenir o controlar plantes o animals indesitjables, i fins i tot aquelles destinades a l'ús com a regulador del creixement de la planta, defoliant o dessecant".

Des de la seua introducció els anys 30 i fins a l'actualitat, s'ha generalitzat l'ús de plaguicides no només en agricultura, sinó també en silvicultura, en control de males herbes en camins i marges de carreteres, i en el manteniment de parcs i jardins, entre altres. Els beneficis de l'ús de plaguicides és prou notori, ja que ha permès el increment de la productivitat agrícola. Però, per contra, l'abús i les males pràctiques en el seu ús ha suposat un greu problema de contaminació medi ambiental, produïda tant pels propis plaguicides com pels seus productes de transformació, generant residus (en l'aigua, aire, sols i essers vius) que cal controlar i minimitzar [62].

En els darrers anys ha augmentat considerablement l'ús d'herbicides, substituint els mètodes mecànics pel control de les males herbes. A més, en països on es practica una agricultura intensiva i altament mecanitzada s'ha generalitzat el seu ús. La Taula 3 mostren la llista dels herbicides que per les seves característiques i ús presenten un major potencial contaminant, en la conca mediterrània [63].

Taula 3 – Herbicides amb major impacte en la conca mediterrània

Acidtricoloracètid	Diatat	Fenmedifam	Metobromuron	Simazina
Alaclor	Diclobenil	Flamprop-isopropil	Metaloclor	Terbumeton
Aminotriazol	Glifosat	Diclofol-metil	Metoxuron	Terbutilazina
Atrazina	Dinoterb	Isoproturo	Metribuzin	Terbutrina
Bentazon	Diquat	Linuró	Molinat	Trialat
Bromoxinil	Diuron	MCPA	Napropamida	Trifluralina
Butilat	DNOC	MCPP	Neburon	
Carbetamida	EPTC	Metabenzotiazuron	Paraquat	
Clorototuron	Etalfluralina	Metamitró	Pendimetalin	
2,4-D	Etofumesat	Metazaclor	Prometrina	

Els herbicides triazinics són un grup d'herbicides d'ampli ús i elevada persistència, motius pels quals es troben entre les famílies més estudiades amb gran varietat de mètodes d'anàlisi desenvolupats. Es per aquesta raó que s'elegí l'atrazina com anàlit model per realitzar el desenvolupament de l'immunosensor objecte en la tesi.

A partir de la dècada dels 80 s'inicià l'interès d'un altre tipus de contaminants mediambientals provinents de l'ús de fàrmacs i productes d'ús personal (PPCP), existint en l'actualitat una gran preocupació en el seu estudi [64].

La presència d'aquests contaminants en el medi prové del seu elevat ús, ja que són substàncies quotidianes utilitzades tant pel tractament d'animals, mesures de salut o d'ús personal. La indústria farmacèutica, l'agricultura, les aplicacions veterinàries, l'aqüicultura i la ruta biomèdica són les principals vies d'entrada de fàrmacs al medi. Entre aquestes vies, la

secreció és el motiu principal dels abocaments de fàrmacs al medi via les aigües residuals.

Dins d'aquest tipus de contaminants es troben els antibiòtics. El terme antibiòtic inclou un grup divers de compostos químics, diferents entre si, que tenen en comú la seua activitat antibacteriana. Han estat àmpliament utilitzats tant en medicina humana com en veterinària per tal de prevenir i tractar malalties. És important el control de l'administració d'antibiòtics als pacients, amb atenció al que es coneix com a dosi terapèutica. En dosis superiors, l'antibiòtic pot ser tòxic per l'home produint-li al·lèrgies o d'altres efectes secundaris [65].

En els últims anys s'ha estés l'ús dels productes farmacèutics per a veterinària, tant en el tractament de malalties com per a protegir la salut de l'animal. Amb tot, principalment s'hi utilitzen per a estimular el creixement dels animals destinats al consum humà i poden provocar antibiorresistència, o bé produir al·lèrgies en els individus que consumeixin aquests productes [66].

Els antibiòtics poden arribar a l'espècie humana a través de la cadena d'alimentació mitjançant la ingestió de productes com ous, llet, múscul i fetge, etc., que provenen d'animals als quals s'han subministrat aquests fàrmacs. Per aquest motiu, les agències de seguretat alimentària han establert mesures de control per evitar que aquests contaminants arribin a la cadena d'alimentació.

En els darrers anys, s'ha detectat la presència d'antibiòtics en el medi ambient com a conseqüència que una part dels fàrmacs utilitzats no són

completament metabolitzats pels pacients (o animals), sinó que s'eliminen de l'organisme mitjançant excrecions fecals o orina. D'aquesta manera arriben a les estacions depuradores d'aigües residuals (EDAR) on sovint l'eliminació no és completa i passen al medi ambient aquàtic. Per aquesta raó s'elegí, també, com anàlit model un antibiòtic (sulfatiazole) per realitzar el desenvolupament de l'immunosensor objecte en la tesi.

1.4.1 Atrazina

L'atrazina (2-cloro-4-terbutilamino-6-etilamino-s-triazina) és un dels herbicides més representatius del grup de les s-triazines. Va ser introduït als anys cinquanta i des de llavors ha esdevingut un plaguicida d'ús comú en agricultura i silvicultura. De fet, és un dels herbicides més emprats en el món, amb entre 70.000 i 90.000 tones de producte actiu aplicades anualment [67].

S'aplica principalment en preemergència sobre les collites abans i després del creixement de la planta. No obstant això, una certa quantitat pot ser alliberada durant la manufactura, formulació, transport i disposició, i en altres usos com a herbicida [68].

Les triazines en general tenen una gran persistència en l'ambient i una gran estabilitat química, fet que implica que l'atrazina sigui un dels plaguicides que amb major freqüència contamina el medi aquàtic, les aigües superficials i subterrànies. És per aquest motiu que en els últims anys se n'ha estudiat la persistència en aigües superficials i subterrànies [69].

Estudis realitzats als Estats Units per Belluck i col. [70] demostraren que la seua freqüència de detecció en aigües subterrànies és 20 vegades superior a la de la resta de plaguicides. L'atrazina persisteix en condicions meteorològiques de fred o sequedat, raó per la qual en països freds com Suècia, se n'ha limitat l'ús [71].

A temperatura ambient, l'atrazina és un sòlid cristal·lí de color blanc, amb una solubilitat en aigua moderada (70 mg/L), essent en canvi molt soluble en metanol (18 g/L) i cloroform (52 g/L) [72].

L'atrazina i altres triazines estan incloses en la llista de 33 substàncies prioritàries establertes en la directiva "The Water Framework Directive" (WFD, 2000/60/CE) [73]. La UE (Directiva 98/83/CE) ha fixat en 0,1 µg/L, el límit màxim de residus en aigües potables de cadascun dels plaguicides per separat, entre aquests l'atrazina. Per altra banda, la Directiva 2008/105/CE, relativa a las normes de qualitat ambiental en l'àmbit de la política hidrològica d'aigües, estableix els valors màxims en aigües continentals, que per a l'atrazina es situen en 0,6 mg/L de mitjana anual i 2 mg/L com a valor màxim admissible. L'any 2001 es signa el Conveni d'Estocolm sobre contaminants orgànics persistents, al qual Espanya s'adhereix en 2004. A més, l'any 2004 s'aprova el Reglament 850/2004/CE sobre contaminants orgànics persistents i el desembre de 2006 s'aprova el Reglament 1907/2006/CE, relatiu al registre, l'avaluació i la restricció de les substàncies i dels preparats químics (REACH), pel qual es crea l'Agència Europea de Substàncies i Preparats Químics, i es modifiquen i es deroguen tota una sèrie de normes comunitàries en la

matèria. Els reglaments 149/2008/CE [74] i 839/2008/CE [75] estableixen els límits màxims de residus de plaguicides, entre el quals hi ha l'atrazina, en diferents productes alimentaris.

A causa de la seua flexibilitat i capacitat de separació, les tècniques cromatogràfiques són les més usades per a la determinació de residus de triazines, tant en el medi ambient (aigües, sol, etc.), com en aliments i matrius biològiques. A més a més, a causa de la gran varietat d'estructures moleculars dels herbicides, s'han desenvolupat un gran nombre de mètodes per a la seua determinació. Els herbicides volàtils es poden analitzar mitjançant cromatografia de gasos (CG), cromatografia líquida (HPLC) o electroforesis capil·lar (EC), amb i sense derivatització prèvia en funció de l'anàlit [76].

La CG s'ha utilitzat, també, per a determinar triazines en aliments i mostres biològiques, prèvia extracció d'aquestes mitjançant diferents tècniques d'extracció i preconcentració com l'extracció fluida supercrítica (SFE), la dispersió de matriu en fase sòlida (DMFS), l'extracció en fase sòlida (SPE) o la microextracció en fase sòlida (SPME), entre altres [77].

Entre els aliments i productes alimentaris es destaca la determinació en ous [78] i en aliments per nadons [79] -a on s'obtingueren recuperacions al voltant del 90%-, en llet materna -on els límits de detecció (LD) i quantificació (LQ) foren de 0,3 i 1µg/L [80], respectivament, i en vins blancs i negres -en què el LD fou entre 0,10–6,0 µg/L [81].

S'ha de destacar l'existència de mètodes multianàlit, com per exemple el que determina fins a 90 plaguicides (parcialment herbicides) en diferents

matrius (aigua, vegetals, cereals i fruites), aconseguint límits de detecció per sota els LMR establerts [82].

Una altra tècnica amplament utilitzada és la HPLC acoblada a un detector de *diode array* (DAD). La HPLC-DAD ha estat aplicada sovint a la determinació multianàlit d'herbicides en aigua de riu, en el què s'ha aconseguit un LD d'entre 4-80 ng/L [83] i per a l'anàlisi de triazines en mostres de sòl, fent prèviament extracció i preconcentració utilitzant SPE, en el què s'ha aconseguit un LD de 0,5 i 5,1 ng/mL [84] i més recentment també s'han usat per la seva extracció, en aigua de riu, polímers d'impressió molecular (MIP) [85, 86], en el què s'ha aconseguit un LD 0,05 a 0,2 µg/L.

En mostres de pastanagues i altres arrels de plantes, amb l'extracció prèvia de l'atrazina mitjançant dissolvents orgànics, s'aconsegueix un LD de 0,2µg/L [87]. També s'ha determinat atrazina en ous mitjançant HPLC/MS aconseguint unes recuperacions d'entre 60–98%, amb un límit de detecció de 0,002 mg/kg [88]; en mostres de raïm s'ha arribat a un límit de detecció de 10 ng/g [89].

Una altra tècnica com és la cromatografia de capa fina ha estat també utilitzada per a la determinació ràpida d'atrazina en aigües, amb límit de detecció de 100 ng/L, en el què s'ha aconseguit, per tant, un mètode sensible, ràpid i econòmic [90].

Mètodes electroforètics com la CE, i sobretot la cromatografia capil·lar electrocinètica micel·lar (MEKC) han estat utilitzats també per a l'anàlisi de residus en aigua. Així, la CE ha estat usada per la determinació

d'atrazina en extractes d'aigua, aconseguint un LD de 2,5 µg/L [91], i la MEKC per a l'anàlisi de 11 triazines en aigua subterrània en el què s'ha aconseguit amb SPE prèvia, un LD 0,05 µg/L [92].

Mètodes combinats com CG/MS-HPLC/MS s'han utilitzat per la determinació multiresidu de contaminants orgànics en aigua de riu, en el què s'ha arribat a límits de detecció entre 0,01–0,5 µg/L [93].

Totes aquestes tècniques descrites, especialment les cromatogràfiques, tenen com a principals avantatges la determinació multianàlit [94] -és a dir, la determinació simultània de compostos d'una mateixa família-, i que són tècniques robustes i amb la sensibilitat adequada per a realitzar el control de residus.

Com a inconvenients cal destacar que són tècniques cares, complexes, que requereixen personal especialitzat i laboratoris adequats. Un altre inconvenient, no menys important, és que requereixen un etapa prèvia d'extracció i preconcentració per a poder determinar els contaminants a nivell traça (ordre de ng) [95]. Tots aquests factors impossibiliten l'anàlisi *on line* d'aquest tipus de contaminants.

Una alternativa eficaç per a la determinació de triazines és la utilització de les tècniques immunoquímiques. En concret, l'atrazina és el plaguicida (i probablement també el compost de baix pes molecular) per al qual més anticossos s'han obtingut, tant monoclonals com policlonals i recombinants, i és, també, el plaguicida per al qual més immunosensors

s'han desenvolupat (Taula 4), tant hidrostàtics com basats en tècniques de flux [96].

Taula 4 - Tipus d'immunoassaigs aplicats la determinació d'atrazina

Tipus d'assaig	Matriu	Sensibilitat (LOD)	Ref.
ELISA			
	Sol		
	Arrels	0,2µg/g	97
	Fulles		
	Cereals		
	Teixit de rata	100 ng/L	98
	Llet	0,2 µg/L	99
	Suc de fruita		
IMMUNOSENSOR			
Electroquímic	Sucs fruita	< 0,1 µg /L	100
Quimiluminiscent	Aigua subterrània	0,208 µg/L	101
Piezoelèctric	Aigua	0,025 µg/L	102
Amperomètric	Aigua	28 µg/L	103
Reflexió total interna	Aigua de riu	0,160 µg/L	104
Guia d'ona d'òxid d'estany i indi	Aigua	0,143 ng/mL	105
Captura	Aigua	0,021 µg/L	106
Ressonància de plasmó superficial	Aigua	5 ng / mL	107
Fluoroimmunoassaig de flux (FFIA)	Suc de fruita	1 µg/L	108
	Aigua de riu		
Fluoroimmunoassaig homogeni	Aigua	28 µg/L	109
Immunoafinitat	Aigua	21 µg/L	110
Interferomètric (Mach-Zehnder)	Aigua	100 µg/L	111
Espectroscòpia d'interferència reflectomètrica (RIFS)	Aigua	0,05 µg/mL	112

1.4.2 Sulfatiazole

Les sulfonamides constitueixen una família important de compostos antimicrobians bacteriostàtics sintètics, àmpliament usats tant en humans com en bestiar. En la Unió Europea (UE) ocupen el segon lloc entre els antibiòtics més utilitzats en veterinària [113].

Les sulfonamides són àcids dèbils, força solubles en aigua i polars, així que els podem trobar en aigües superficials i subterrànies. El Servei Geològic dels EEUU (USGS) detectà la presència de sulfametoxazole en un 27% dels rius estudiats [114].

Degut a la importància de disposar d'un control dels residus de productes farmacèutics, la UE va establir regulacions bàsiques i comuns per als medicaments d'ús veterinari i humà (Directriu 65/65/EEC). El Reglament 90/2377/EEC del Consell Europeu, del 26 de juny de 1990, estableix el límit màxim de residus (MRL) [115] per les sulfonamides en 100 mg/Kg en teixits diana (músculs, greix, fetge, ronyó i llet) de les espècies productores de carn (boví, oví i caprí). En països que no pertanyen a la UE, també es controla la presència d'aquests residus en animals utilitzats en consum humà. Per exemple, a EEUU la responsabilitat d'aquests afers recau en la *US Food and Drug Administration* (FDA), el *Food Safety and Inspection Service* (FSIS) del Departament d'Agricultura i la *US Environmental Protection Agency* (USEPA).

Amb la finalitat de controlar els nivells de residus d'aquests compostos tant el l'Àrea mediambiental com en altres camps com l'agroalimentari, veterinari, processos industrials, etc., s'han desenvolupat una sèrie de metodologies analítiques fonamentades en diferents principis [116].

Les tècniques cromatogràfiques, tant GC com LC, [117-122] han estat les més emprades en l'anàlisi d'antibiòtics en tot tipus de mostres (aigua, llet, ous, mel, suc, teixits, etc.). Respecte als mètodes basats en l'ús de la cromatografia de gasos, cal remarcar que presenten límits de detecció apropiats per a realitzar el control de residus, però la seua aplicació de rutina no és fàcil en molts casos ja que és necessària una etapa de derivatització prèvia degut a les característiques polars d'aquests antibiòtics [123, 124]. D'altra banda, la cromatografia de líquids d'alta resolució (HPLC) és la tècnica més emprada per a l'anàlisi d'antibiòtics en tot tipus de matrius [125, 126].

Encara que també s'ha usat la CE per a la determinació d'antibiòtics, la seua principal limitació respecte de les tècniques cromatogràfiques és la baixa sensibilitat que s'aconsegueix [127].

Més recentment, l'acoblament de tècniques com SPE-LC/MS/MS permet mesurar 16 residus d'antibiòtics en aigua amb un límit de detecció de 0,4 a 4,3 ng/L [128]. No obstant això, aquestes tècniques presenten una sèrie d'inconvenients, com s'ha descrit anteriorment (apartat 1.4.1).

Altres tècniques basades en assaigs microbiològics presenten també algunes limitacions: com la manca d'especificitat i sensibilitat, i el llarg temps d'anàlisi (necessiten 24 o més hores d'incubació) [129-132].

Les tècniques immunoquímiques en diferents formats (com ELISA, immunosensor, tires reactives, etc....) han estat extensament usades com a mètodes de cribratge (*screening*) degut a la seua senzillesa en la preparació de la mostra, sensibilitat, rapidesa i baix cost. La Taula 5 ens mostra alguns dels immunoassaigs més utilitzats per a la determinació de sulfonamides i altres antibiòtics.

Taula 5 - Tècniques immunoquímiques utilitzades per a la determinació de sulfonamides i altres antibiòtics

Anàlit	Tipus d'assaig	Matriu	(LOD)	Ref.
Sulfonamides	ELISA (placa)	Mel	0,34 µg/L	133
	ELISA (Tira reactiva)	Muscle (porc) Llet	5 µg / L	134
	SENSORS			
	Voltamperomètric	Sèrum	10 nmol/L	135
	Optosensor	Orina Llet	5,7 ng/ mL	136
	Potenciomètric	Fàrmac Ag	1 mmol/L	137
	SPR	Teixit (porc)	30 ng/mL	138
Altres antibiòtics				
Tetraciclina	ELISA	Mel	0,4ng/mL	139
Carazolol	ELISA	Teixit (porc)	5 µg/kg	140
Cloramfenicol	ELISA	Llet	0,5 µg/L	141
Neomicina	ELISA	Plasma	3,61ng /mL	142
Quinolones	SPR	Muscle (pollaste)	0,13 µg/kg	143
		Peix	0,29 µg/kg	
		Ous	0,30 µg/kg	

1.5 NOUS DESENVOLUPAMENTS EN IMMUNOSENSORS

1.5.1 Plantejament del format

Com s'ha comentat anteriorment, són molts els immunosensors desenvolupats per a la determinació de residus de plaguicides i altres contaminants orgànics. No obstant, i tot i que cada any es registren diferents patents relacionades amb biosensors, són pocs els que s'han pogut comercialitzar, de manera que encara es considera una tecnologia en desenvolupament.

En el camp mediambiental, s'han desenvolupat un gran nombre d'immunosensors, sota diferents estratègies i amb diferents resultats. No obstant això, hi ha encara moltes prestacions que s'han de millorar. Es en aquesta millora que cal destacar el terme *reversibilitat*, que suposa revertir la unió immunoquímica, procés possible gràcies a la naturalesa no covalent dels enllaços entre els anticossos i els antígens.

La regeneració dels immunosuports suposa exposar l'immunocomplex a condicions de desnaturalització proteica, amb la consegüent pèrdua d'activitat del reactiu immobilitzat. El problema de la dissociació reversible anàlit-anticòs fa que una gran part dels immunosensors desenvolupats fins al moment utilitzen un immunoabsorbent no regenerable o tinguin una vida útil de l'element sensor d'algunes desenes de cicles analítics.

Una possible solució seria treballar en format homogeni, però, com s'ha descrit anteriorment, aquests sistemes no són en molts casos d'utilitat pràctica degut a la falta de sensibilitat.

Per aquesta raó, cal plantejar el desenvolupament de sensors que conjuguin les característiques del format homogeni, com són la rapidesa d'assaig sense necessitat de regeneració, amb les característiques del format heterogeni, major sensibilitat i selectivitat. Aquesta forma de treballar, que hem anomenat format homogeni-heterogeni (H-H), inclou una primera etapa (assaig competitiu homogeni) en la que l'anàlit present en la mostra reacciona amb el traçador (o haptè marcat, **Hp***) i la dissolució d'anticòs (**Ab**) per a formar el immunocomplex Ab-traçador (**Ab-Hp***):



En una segona etapa, se separa l'immunocomplex amb la finalitat de poder dur a terme la seua quantificació. Dependent de les concentracions de les espècies en dissolució tindrem diferents situacions:

- Si la concentració de l'anàlit és elevada, no s'obtindrà el complex Ab-traçador i tot el traçador estarà en dissolució.
- En absència d'anàlit tot el traçador quedarà unit a l'anticòs.
- En el casos intermedis hi haurà diferent proporció de Ab-anàlit, Ab-traçador i traçador lliure.

Per tant, per a generar un senyal analític s'haurà de mesurar la quantitat de traçador lliure o la de complex Ab-traçador, i treballar amb una concentració de l'Ab limitant per tal d'assegurar la competició i obtenir una bona sensibilitat.

Per posar a punt aquest tipus de sensors cal tenir en compte dos aspectes molt importants:

- L'etapa de separació dels productes de reacció obtinguts en la fase homogènia, imprescindible per a la posterior detecció.
- Els sistemes de marcatge adequats per tal de disposar de traçadors compatibles amb els sistemes de separació i detecció utilitzats.

1.5.2 Tipus de suports

En l'elecció dels suports s'han de tenir en compte diverses qüestions. La primera, el tipus de format de treball a utilitzar, incorporant en línia un element que separi el complex anticòs-haptè marcat de l'haptè marcat lliure. La segona, el tipus de marcador a utilitzar i la forma de marcar haptens. També s'ha de considerar el sistema de detecció, la cinètica dels processos i, finalment, la regeneració o no del sistema, operació que idealment hauria d'efectuar-se després d'un nombre elevat de cicles de treball.

Un altre aspecte a considerar és la difusió dels anàlits i la velocitat de reacció. En general, en format homogeni els immunoassaigs tenen dimensions reduïdes i es manipulen en agitació, per tant, les distàncies a recórrer pels anàlits són molt petites i els temps d'equilibri mínims. Així,

Burke [144] ha estimat que una proteïna amb coeficient de difusió de $5 \times 10^{-7} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$, necessita solament 20 s per a recórrer una distància de 100 μm . Aquesta elevada velocitat de difusió dóna lloc a temps de reacció molt curts, quasi instantanis.

D'acord amb el plantejament proposat, les espècies marcades s'han de separar, especialment, en funció de la mida molecular; per poder-lo realitzar es proposen diferents procediments. El més senzill es utilitzar suports cromatogràfics que, en funció de la interacció entre fase mòbil i estacionària, donen lloc a la separació de les immunoespècies. Aquest procediment ha estat assajat i la bibliografia indica que columnes tipus Biogel P o A (llits porosos de poliacríamida i agarosa, respectivament) poden efectuar separacions efectives [145, 146].

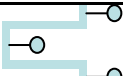
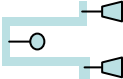
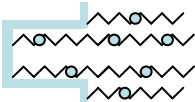
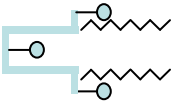
També existeixen altres tipus de suports que podrien ser utilitzats, com els d'exclusió molecular i els d'accés restringit [147, 148]. Els primers estan formats per llits cromatogràfics que discriminen segons el mida molecular. Aquest sistema, però, presenta inconvenients degut a que els tamisos moleculars són pocs efectius i requereixen utilitzar columnes de 10 cm de longitud o superiors. Aquest fet obliga a emprar grans volums de mostra i reactius, ja que si es treballa amb volums petits (de l'ordre de 10 μL) la dispersió fa que arribin al detector molt diluïts, amb la conseqüent reducció de la sensibilitat. A més, la utilització de columnes grans (>5 cm de longitud i 0,5 cm de diàmetre) comporta un augment de la duració de les determinacions.

1.5.2.1 Suports d'accés restringit (RAM)

En l'última dècada s'han desenvolupat nous suports cromatogràfics anomenats d'accés restringit, RAM -terme introduït per Desilets en 1991-, que impedeixen l'accés de macromolècules a la fase enllaçada [149, 150]. Simultàniament amb aquest mecanisme d'exclusió molecular, els anàlits de baix pes molecular són retinguts selectivament per partició, intercanvi iònic, etc. Es a dir, únicament els compostos de baix pes molecular tenen accés lliure a l'interior de les partícules del suport i poden ser retinguts i extrets selectivament.

Els suports RAM es poden classificar segons el mecanisme d'exclusió macromolecular. Aquesta exclusió es pot realitzar utilitzant una barrera de difusió física basada en el mida del porus, o per una barrera de difusió química creada per una xarxa que cobreix la superfície del suport. Aquesta xarxa està constituïda per polímers (naturals/sintètics) o proteïnes unides per enllaços covalents a la superfície exterior de la sílice. Boos i Rudolphi [151] completen aquesta classificació subdividint els suports RAM segons l'associació de les dues superfícies. Aquests autors discerniren les fases amb superfícies que presenten diferents enllaços entre la superfície externa i interna (fase bimodal), i els suports amb enllaços semblants en les dues superfícies (fase unimodal). La fase bimodal es compon d'una superfície exterior hidrofílica amb una superfície interior hidrofòbica. Per tant, els suports RAM es poden dividir en quatre grups, tal com mostra la Taula 6.

Taula 6 - Classificació dels suports RAM

Estructura fase RAM	Barrera de difusió	Superfície	Exemple
	Física	Homogènia	Sílice combinada
	Física	Heterogènia	Superfície reversa interna (IRSP)
	Química	Homogènia	Fase hidròfoba protegida (SHP)
	Química	Heterogènia	Superfície semipermeable (SPS)

Font: Cassiano i col. [152]

Inicialment les columnes RAM han estat dissenyades i utilitzades especialment en el camp de l'anàlisi clínic. En la bibliografia es citen algunes aplicacions d'aquests materials com a sistemes de neteja i preconcentració en línia per a la determinació cromatogràfica de drogues, cafeïna, plaguicides, estimulants, etc., en matrius biològiques [153, 154]. A continuació es realitza una breu descripció dels principals tipus de columnes RAM.

A) Columnes RAM amb barrera física

Aquest tipus de columnes utilitzen com a mecanisme d'exclusió la mida del porus. Dins d'aquest grup de columnes hi trobem les *Internal Surface Reversed-phase* (ISRP), Akil diol Silica (ADS), i els suports formats per sílice porosa recoberta per un lligant combinat.

A₁) Suports ISRP

Suport desenvolupat en 1985 per Hagestam i Pinkerton, per a la injecció directa de matrius biològiques, va ser comercialitzat en 1986 per Regis Technologies (EEUU). Està format per partícules poroses de sílice amb la superfície exterior hidrofílica recoberta per grups diol-glicina que limiten l'adsorció de les macromolècules, i una superfície interna hidròfoba formada per un tripèptid (fenilalanina--fenilalanina--glicina o GFF) unit en l'interior dels porus de la sílice. GFF va ser elegit entre molts dels pèptids disponibles per la selectivitat cap a anàlits aromàtics amb càrrega positiva i una gran varietat de molècules neutres. La superfície exterior hidròfila, creada pel tripèptid original, és deguda a la glicina (Figura 3). Els suports GFF es caracteritzen per un diàmetre de porus de partícula d'aproximadament 80 Å, que permet l'exclusió de macromolècules com les proteïnes, de massa molecular superior a 20.000 Da [155]. Quan s'injecta una matriu biològica en aquest suport, les macromolècules són excloses de la regió de superfície interna per un mecanisme de exclusió per mida.

Per tal de millorar els resultats d'aquestes primeres columnes es va desenvolupar una segona generació de fases, enllaçant el pèptid de GFF a

la superfície de la sílice mitjançant una unió de glicidoxipropil, que permeten incrementar l'eficiència, retentivitat i reproductibilitat.

Són moltes les variables que poden afectar a la selectivitat del suport: la composició de la fase mòbil, la naturalesa dels anàlits o la utilització de dissolvents orgànics en la fase mòbil. Cal tenir en compte que elevats percentatges de dissolvents orgànics poden produir la precipitació de la matriu. El pH de treball de la columna ISRP es troba entre 2,5 i 7,5; no obstant això, l'interval òptim es troba entre 6,0 a 7,5. Les proteïnes i la glicina de la superfície exterior tenen càrrega negativa i, com a resultat d'això, les macromolècules amb càrrega negativa són repel·lides per aquesta fase.

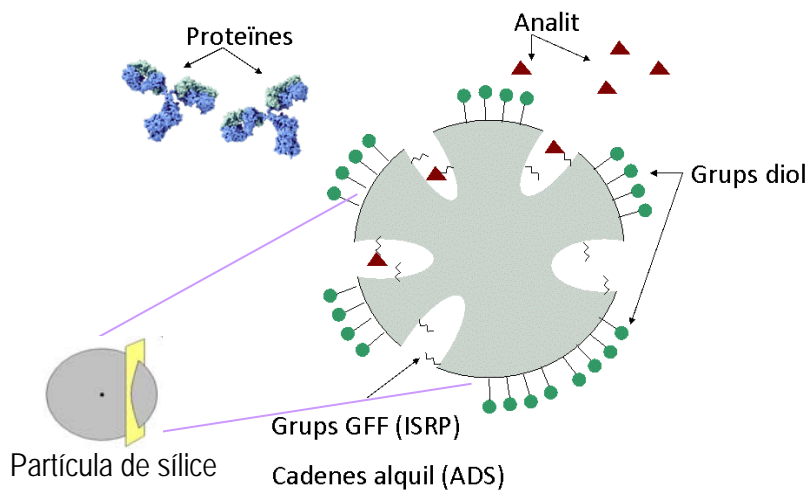


Figura 3 - Estructura dels suports ISRP i ADS

A₂) Suports Aquil-diol-silica (ADS)

Les sílices derivatitzades amb grups alquil–diols (ADS) (Figura 3) són una família de materials d'accés restringit modificats químicament, caracteritzats i optimitzats per al seu ús en el camp de l'anàlisi mediambiental.

Les partícules de ADS tenen una superfície externa hidrofílica (diols) que actua com a suport d'exclusió molecular, i una superfície hidrofòbica interna constituïda per partícules de sílice porosa, amb un diàmetre de porus de 60 Å, derivatitzada amb diferents fases reverses (C18, C4). El mecanisme de funcionament d'aquest tipus de suport es basa en el fet de que substàncies com les proteïnes no poden accedir a l'interior del suport i travessen la columna sense quedar retingudes. Els anàlits petits, en funció de la seua polaritat, interaccionen en major o menor extensió amb la fase reversa i són retinguts [156, 157]. Així doncs, per a molècules d'un mida superior a 10–15 KD el suport es comporta com una esfera impermeable que interacciona en la superfície pràcticament sense retenció, mentre que per a substàncies de baixa massa molecular i relativament apolars, el suport és porós i el seu comportament predominantment hidrofòbic.

Aquests tipus de suports s'han usat per l'anàlisi directe de diverses matrius biològiques com plasma, sèrum, orina, saliva, cultius cel·lulars, secrecions bronquials, llet i teixit [158].

A₃) Suport de sílice combinada

Fou introduït per ChromSpher BioMatrix (Varian Inc. Corporate, Palo Alto, USA) com un nou suport per la injecció directa de matrius biològiques [159, 160].

Consisteix en un suport de sílice porosa (amb un diàmetre de porus de 13 nm) unida amb un lligand que té propietats hidròfobes i hidròfiles, format amb grups poliglicols i fenils. Els primers eviten l'adsorció de proteïnes en el suport, mentre els segons proporcionen una interacció hidròfoba amb els anàlits petits (Figura 4).

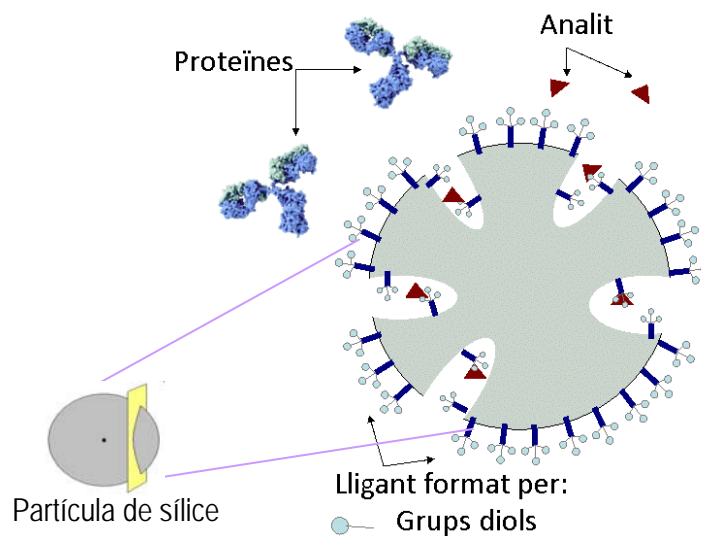


Figura 4 - Estructura dels suports de sílice combinada

B) Columnes RAM amb barrera química

Aquests grups de materials presenten un mecanisme macromolecular d'exclusió mitjançant una xarxa enllaçada per polímers o proteïnes naturals o sintètiques.

B₁) Suports SPS

Les columnes SPS (superfície semipermeable) van ser desenvolupades pel Regnier i Desilets [161], demostrant que un polímer de polioxietilè enllaçat a la superfície d'una fase inversa (C8 o C18) forma una capa hidròfila semipermeable que pot restringir l'accés de la proteïna a la fase estacionària i hidròfoba. Com en les columnes ISRP, els suports SPS estan constituïts per una superfície hidròfila exterior i una altra d'hidròfoba interna. La diferència és que les superfícies interiors i exteriors del SPS són sintetitzades, enllaçades de forma independent i unides covalentment a la superfície de la partícula de la sílice, permetent variar la superfície interna en funció de l'anàlit que es vol determinar. Així, trobem diferents fases internes com nitril, octil (C₈), ODS (C₁₈) i fenil (Figura 5). El mecanisme de retenció d'aquestes fases implica la formació de ponts d'hidrogen en la fase exterior mentre que a l'interior les interaccions són hidrofòbiques.

Els compostos polars interactuen principalment amb la fase externa i els no polars amb la fase interna. Els suports SPS permeten l'ús de tampons, en fase normal i en fase reversa. Les condicions d'assaig vénen limitades solament pel pH i el percentatge de dissolvent orgànic, que ha d'estar en l'interval adequat perquè no es produeixi la precipitació de les proteïnes

de la mostra. La vida útil d'aquests tipus de suports és equivalent a la dels suports ADS [162].

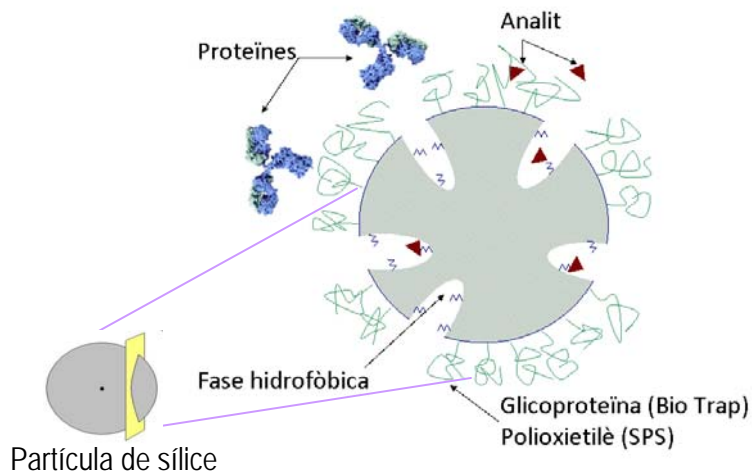


Figura 5 - Estructura dels suports SPS i BioTrap

B₂) Sílice recoberta per una proteïna

Aquest suport utilitza una xarxa de proteïnes en la superfície externa de la sílice en lloc d'utilitzar un polímer (Figura 5). Va ser introduït per Hermansson i Grahn en 1994 [163] i fou comercialitzat sota el nom de BioTrap. El suport està constituït per partícules de sílice porosa amb una superfície externa recoberta de proteïnes plasmàtiques humanes, en concret una α_1 -glicoproteïna (AGP). Aquest fet fa que la fase externa sigui compatible amb les mostres proteïques que no poden penetrar en els porus (10 nm). Els grups hidròfobs (C_8 o C_{18}) de la superfície interior són els responsables de la interacció amb els anàlits de mida petita.

Actualment, el suport de BioTrap està disponible amb un polímer hidròfob (BioTrap MS) i permet que s'utilitzin en un interval de pH més ampli (d'entre 2 a 10).

B₃) Materials funcionalment mesclats (*mixed-functional material*)

En 1994, un polímer de silicona recoberta amb sílice funcionalitzada va ser introduït per Kanda [164] per a la injecció directa de mostres biològiques. Aquest concepte de "*funcionalment mesclat*" va ser comercialitzat sota el nom de Capcell Pak MF (Figura 6). Ambdues superfícies internes i externes consisteixen en una mescla de grups hidròfils, com polioxietilè, i grups hidròfobs, com l'estirè, que s'injecten en un polímer de silicona (8 nm). Les cadenes llargues de polioxietilè limiten l'accés a macromolècules. Per tant, els components de la matriu interactuen solament amb la zona hidròfila, no s'adsorbeixen en la xarxa polimèrica, i elueixen en el volum mort.

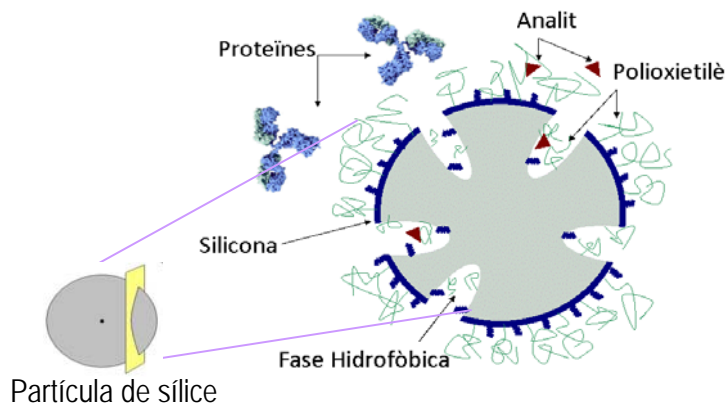


Figura 6 - Estructura d'un suport funcionalment mesclat

B₄) Fase hidròfoba protegida (SHP)

En 1988, un nou disseny per a l'anàlisi directe de matrius biològiques va ser desenvolupat per Gisch i col. [165]. Va ser introduït en el mercat sota el nom de Hisep i està basat en sílice recoberta per una xarxa hidròfila d'òxid de polietilè assemblada a grups fenils (hidrofòbics) (Figura 7). Les macromolècules no poden penetrar la capa de polímer, mentre que les petites molècules interactuen amb grups hidròfobs.

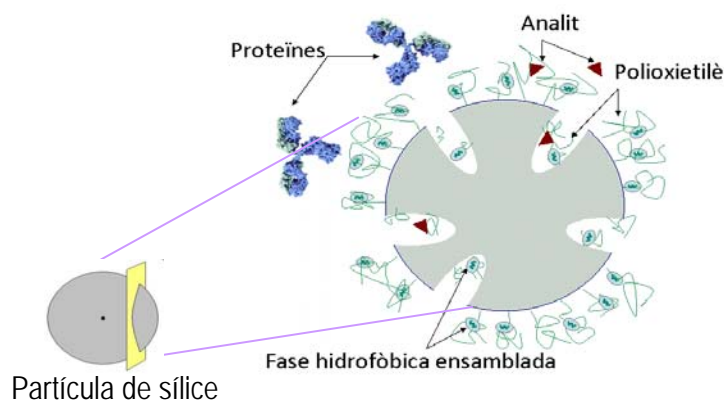


Figura 7 - Estructura dels suports SHP

En la Taula 7 es resumeixen les principals característiques dels suports RAM com són la seva composició, el mida de porus, i discriminació molecular en la fase interna del suport.

Taula 7 - Característiques dels suports RAM

Tipus suport RAM	Mida porus (nm)	Discriminació molecular (KD)	Superfície Externa	Superfície Interna
Barrera Física				
ISRP	8	20	Alcadiols	GFF
ADS	6	10-15	Alcadiols	Alquil
Sílice combinada	13	33	Grups poliglicols enllaçats amb grups fenils	
Barrera Química				
SPS	10	25	Polioxetilè	nitril, octil, fenil
Sílice recoberta	10	25	Glicoproteïna (AGP)	octil, octildecil
SHP	12	30	Xarxa d'òxid de polietilè assembletat amb grups fenil	
Materials funcionalment mesclats	12	30	Polioxetilè i estiré en una base de polímer de sílicona	

Per altra banda, tal com mostra la Taula 8, els RAM han estat desenvolupats especialment per a l'anàlisi directe de fluids biològics, l'eliminació quantitativa de macromolècules com les proteïnes, i per a l'extracció dinàmica i l'enriquiment en línia de petites molècules com drogues, plaguicides, antibiòtics, etc, mitjançant la injecció directa de mostres biològiques de sèrum, orina, plasma, etc .

Taula 8 - Aplicació dels suports RAM per l'anàlisi de diferents substàncies

Anàlits	Suport RAM comercial	Ref.
Antibiòtics		
Amoxicilina (sèrum)	SPS C ₁₈	166
Cefpiramida (plasma)	GFF	167
Ceftazidimme (sèrum)	ADS RP-8 ADS	168
Fàrmacs		
Baialina (sèrum)	Capcell Pak MF Ph-1	169
Clenbuterol (sèrum)	ADS RP-18 ADS, GFF, SPS	170
Carbamazepine (plasma)	Hisep	165
Alcaloids (plasma)	BioTrap C18	171
Barbiturics (sèrum)	Capcell Pak MF Ph-1	172
Antiepilectics (sèrum)	GFF II	173
Agent Anxiolitic (plasma)	BioTrap C18	174
Atropina (plasma)	ADS XDS	175
Benzodiazepina (orina)	ADS RP- 8 ADS	176
Epirubicin (plasma)	ADS RP- 4 ADS	177
Plaguicides		
Triazols (orina)	GFF II	178

S'han realitzat estudis de capacitat de la columna per comprovar el volum de plasma que tolera cadascun dels suports sense que es vegin afectades les seues propietats. En tots els casos el volum de plasma es de l'ordre de mil·lilitre i com es comprova en la Taula 9, la columna ADS és la que suporta un volum de plasma més elevat, fins a un total de 100 mL.

Taula 9 - Volum de plasma tolerat per diferents suports RAM

Tipus de suport	Volum de plasma que suporta (mL)	Ref.
IRSP	6-7	179
ADS	80-100	180
SPS	50	162
BioTrap	30	181
Capcell Pak MF	5	182
SHP	16	183

1.5.3 Immunosensor homogeni-heterogeni

Els suports RAM poden ser utilitzats per a realitzar immunoassaigs competitius com el que es vol desenvolupar. Un cop produïda la immunointeracció amb la fase homogènia (veure apartat 1.5.1), el suport atraparà el traçador lliure (Hp*) en la fase reversa interna, però interaccionarà molt dèbilment amb l'immunocomplex (Ab-Hp*), que podrà detectar-se directament. Aquest comportament és diferent al que es duu a terme amb altres tipus de materials com la proteïna G, que captura el immunocomplex i deixa passar el traçador lliure [184]. En la Figura 8 es mostra un esquema d'un immunosensor que podria ser interessant ja que combina les avantatges dels suports cromatogràfics descrits anteriorment i els immunareactius.

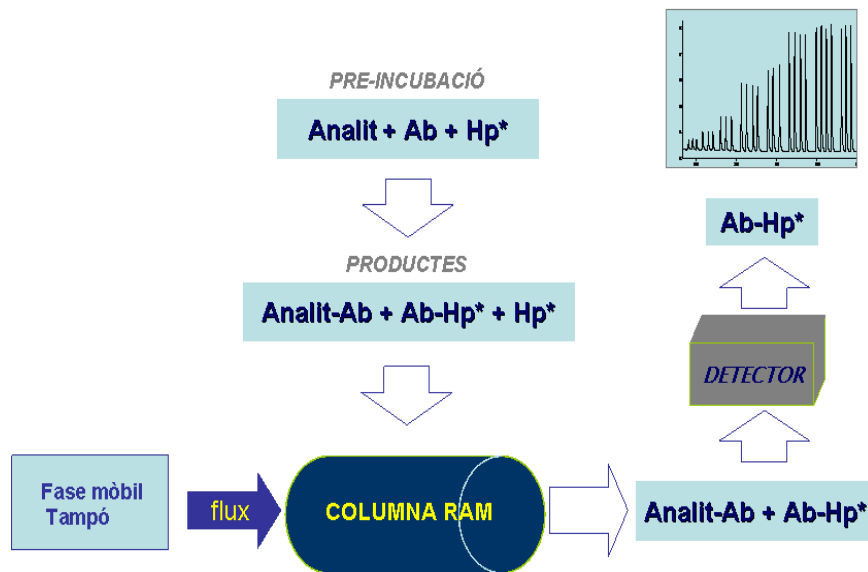


Figura 8 - Esquema de l'immunosensor

Els suports RAM ja s'han utilitzat amb èxit no solament en la neteja de mostres en bioanalítica, sinó també en immunoassaigs de flux amb alta capacitat de mostreig per a la determinació, per exemple, de triazines i fenols en aigua [185, 186]. En aquests casos, per obtenir el traçador s'ha de posar a punt una ruta de síntesi per a cada molècula de fluoròfor o marcador i traçador. Aquest fet és una important limitació d'aquest tipus de sistemes.

Respecte a la detecció, aquesta pot ser dual, ja que pot mesurar-se la senyal generat pel traçador unit al Ab o la del traçador lliure després que aquest hagi eluït. En el primer cas, la lectura del senyal és directa, la

columna s'anirà saturant de traçador lliure i solament seran necessàries etapes de regeneració quan s'hagi superat la seua capacitat [187].

En aquest sentit, la elevada capacitat de les columnes unit a les baixes concentracions d'anàlit i de traçador utilitzades en immunoassaigs, permetran realitzar una gran quantitat de assaigs sense necessitat de regeneració. Això implica una reducció del temps d'anàlisi, ja que no es requereix una etapa addicional per a eluir o revelar el traçador retintut en l'interior dels porus abans de la detecció [187].

1.5.4 Problemàtica amb els traçadors

La síntesi de nous traçadors és un dels problemes que es plantegen en el desenvolupament d'immunosensors homogenis-heterogenis (H-H). Aquests han de tenir les propietats físico-químiques (polaritat, mida, etc.) adequades per a que el traçador lliure quedi retintut en l'interior del suport.

El major inconvenient d'aquest tipus de sistemes és la necessitat d'utilitzar marcadors de mida petita que puguin ser atrapats en l'interior dels porus dels materials d'accés restringit. Per aquesta raó, en el desenvolupament d'un format d'assaig homogeni seguit de la separació cromatogràfica és necessari l'ús de traçadors no enzimàtics. Els traçadors enzimàtics, degut les seves dimensions, no són atrapats en l'interior del suport i elueixen juntament amb l'immunocomplex sense permetre la separació de les dues espècies. A més, la utilització d'enzims requereixen una etapa d'incubació amb el substrat, incrementant la duració dels assaigs.

Per altra banda, la utilització de marcadors no enzimàtics planteja diferents problemes. L'obtenció de traçadors requereix la unió dels haptens funcionalitzats amb grups capaços d'unir-se al marcador, que a la vegada ha d'estar funcionalitzat amb grups per tal que es doni la reacció.

El desenvolupament de traçadors fluorescents suposa la conjugació directa del fluoròfor a l'haptè competidor. Aquest procés és relativament fàcil quan el marcador utilitzat és un enzim, ja que l'haptè és una molècula que es dissenya per a poder ser acoblada fàcilment a proteïnes. No obstant, quan l'haptè s'ha de conjuguar a una altra espècie química, s'ha de posar a punt una ruta de síntesi per a cada parell haptè-marcador, en funció dels grups funcionals que presenten ambdues espècies.

En vista de la problemàtica plantejada, resulta interessant estudiar una via de marcatge de fluoròfors a haptens amb caràcter general, que doni com a resultat una molècula suficientment petita com per a que sigui capturada pel suport d'accés restringit.

Una via general d'unió d'haptens (funcionalitzats amb grups $-COOH$) a marcadors fluorescents seria utilitzar oligonucleòtids, amb diferent número de bases, marcats amb un fluoròfor. Aquest procediment és senzill i s'hi poden utilitzar diferents fluoròfors. Aquesta via sintètica es pretén realitzar amb oligonucleòtids sintètics, com a pont entre l'haptè i el marcador. Actualment existeix la possibilitat d'obtenir seqüències de nucleòtids qualsevol longitud i característiques, el que fa referència a l'ordenació de les bases. Per altra banda, els oligonucleòtids presenten una estructura lineal amb un mida en funció del nombre de bases (1700

Daltons en oligos de 3 bp). Poden presentar diferents grups terminals en les posicions 3' i 5' modificables a convenença, presentant nombrosos exemples en la bibliografia [188]. Aquest fet fa que l'obtenció i purificació de traçadors basats en oligonucleòtids sigui senzilla i relativament econòmica.

La via proposada permetrà, a més, l'ús de marcadors fluorescents que presenten un gran rendiment de fluorescència i, a ser possible, un temps de decaïment prolongat; aquest fet ajudarà a eliminar possibles interferències en el cas de que la mostra presentés autofluorescència, com és el cas de algunes matrius proteiques.

A la vista de les característiques d'aquests traçadors, amb un mida al voltant dels 5000 Daltons, tots els suports d'accés restringit descrits en l'apartat 1.5.2.1 són potencialment compatibles i poden ser candidats per utilitzar en el desenvolupament de nous immunosensors amb diferents formes d'operació i especialment en el format que s'ha anomenat homogeni-heterogeni.

OBJECTIUS

2. OBJECTIUS

L'objectiu d'aquesta tesi és el desenvolupament d'un nou format d'assaig anomenat homogeni-heterogeni, i la seva aplicació en un sistema immunosensor que faci possible la determinació de residus de contaminants orgànics en líquids, com l'aigua, o en mostres prèviament preparades per l'anàlisi en dissolució.

Aquest format permet conjuguar les avantatges inherents als assaigs homogenis (senzillesa i rapidesa), amb les del format heterogeni (sensibilitat i selectivitat), de manera que puguin ser usats per al cribratge de mostres en temps real. Amb aquesta finalitat, es va plantejar la resolució de diferents aspectes fonamentals

- ↳ Estudi de diferents suports (fases estacionaries) d'accés restringit (RAM) per realitzar la separació dels productes de la immunoreacció que es du a terme en dissolució
- ↳ Estudi de procediments generals i efectius de marcatge de fluoròfors amb haptens, basats en la utilització d'oligonucleòtids amb propietats físico-químiques adequades per poder ser utilitzats amb materials d'accés restringit
- ↳ Selecció de marcadors i densitat de marcatge
- ↳ Desenvolupament d'un protocol de treball
- ↳ Caracterització del sistema sensor i aplicació analítica

MATERIALS I MÈTODES

3.1 PATRONS I REACTIUS

3.1.1 Oligonucleòtids

Els oligonucleòtids utilitzats, anomenats SYM seguit d'un número, foren: SYM 16: 5' FI-TGGTGGATCG-NH₂ 3', subministrat per Molbiol (Berlin, Alemanya). SYM 18: 5' FI-TAG-C7-NH₂ 3', SYM 20: 5' FI-TAGTA-C7-NH₂ 3' i SYM 29: 5' 6FAM-TAG-NH₂ 3' subministrats per Sigma-Proligo (Sigma-Aldrich, Espanya) i SYM18-3FI, subministrat pel Grup de Química d'àcids nucleics, Química i Farmogologia Molecular de Institut de Recerca Biomèdica (Barcelona). Les estructures dels diferents oligonucleòtids es mostren en la Figura 9.

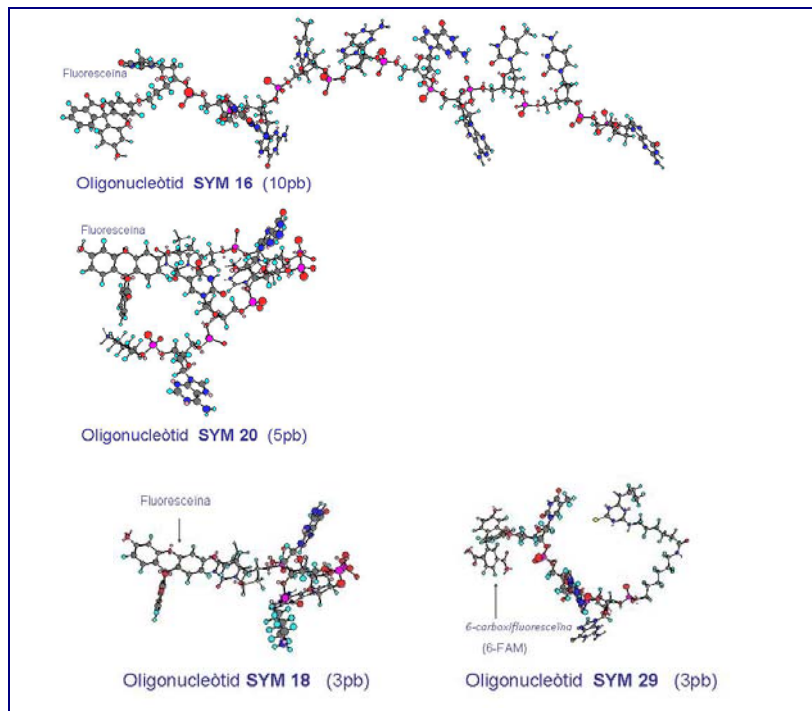


Figura 9 - Estructura espacial dels oligonucleòtids utilitzats

3.1.2 Plaguicides

Els patrons de s-triazines: atrazina, irgarol, desetilatraxina, ametrina, prometrina, deisopropilatrazina, terbutilazina, terbutrina, simazina, terbumetron i propazina, van ser subministrats per Dr. Ehrenstorfer (Augsburg, Alemanya) i Riedel de Haën (Seelze-Hannover, Alemanya), amb una puresa del 96,5-99,7 %.

Els patrons de sulfonamides: sulfatiazol, sulfacetamida, sulfisoxazol, sulfametazina, sulfametoxipiridazina, sulfapiridina, sulfametizol, sulfametoxazol, sulfaguanidina, sulfamerazina, sulfadiazina, sulfasalazina, N4- ftalilsulfatiazol, sulfanilamida i sulfadimetoxina foren adquirits a Sigma (Madrid, Espanya).

Les dissolucions estàndard foren preparades en metanol i emmagatzemades a -80 °C.

3.1.3 Reactius i tampons

La hemocianina extreta del mol·lusc *Megathura crenulata* (KLH), N-Hidroxisuccinimida (NHS), N,N'-diciclohexilcarbodiimida (DCC) varen ser sumministrats per Boehringer (Mannheim, Alemanya), i els dissolvents orgànics qualitat HPLC, per Scharlau (Barcelona, Espanya). L'aigua desionitzada es generà amb un sistema Millipore Milli-Q system (Bedford, MA, USA).

Els tampons utilitzats en els assaigs foren els següents:

Tampó fosfat salí (PBS): Na_2HPO_4 8 mM, NaCl 137 mM i KCl 2,7mM, pH 7,5

Tampó carbonat (CB): Na_2CO_3 15 mM i NaHCO_3 35 mM, pH 9,6

3.1.4 Haptens

Atrazina

La síntesis de l'haptè N-(4-cloro-6-isopropilamino-[1,3,5]triazin-2-il)-6-acid Aminohexanoic), anomenat 2d, així com la producció de l'anticòs policlonal de conill, per mitja de l'immunització de amb l'haptè 2d unit covalentment a KLH a traves de les lisines com està descrit en la bibliografia [189]. A continuació es detalla breument el protocol seguit per a l'obtenció dels anticossos policlonals. El procediment realitzat fou el següent:

0,5 mL del conjugat, KLH-haptè (200 µg/mL), s'injecten intramuscularment en conilles New Zealand*California, amb 0,5 mL d'un adjuvant de Freund complet en la primera immunització, i 0,5 mL de adjuvant de Freund incomplet en les següents. Les immunitzacions es realitzen cada 21 dies, i 10 dies després de cada immunització es duen a terme sangries amb la finalitat de conèixer el títol i les propietats del sèrum de cada animal. Després de diferents cicles d'immunització i sangria, es recull tota la sang de l'animal i es deixa coagular durant una nit a 4 °C.

El sèrum se separa per centrifugació, i s'afegeix azida sòdica (0,02%) com a conservant s'emmagatzema a -80 °C

Les estructures químiques de la triazina i de l'haptè 2d es mostren en la Figura 10.

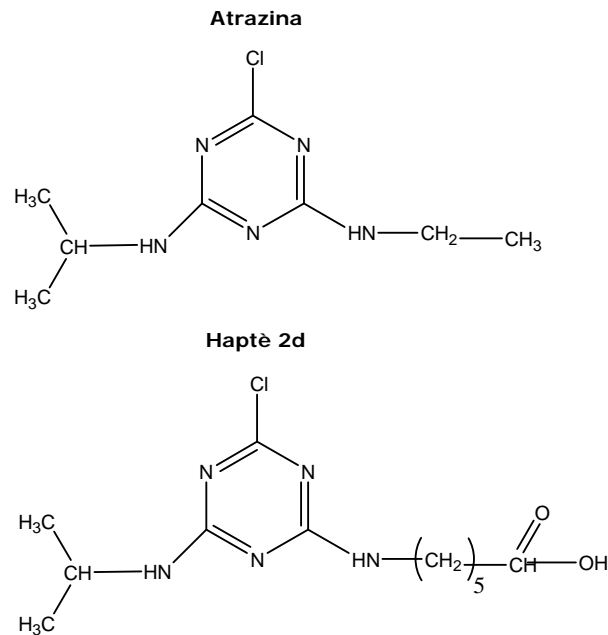


Figura 10 - Estructura de l'atrazina i l'haptè 2d

Sulfatiazol

La metodologia utilitzada per a la síntesis de haptè anomenat S3 (2-(4-amino-benzesulfonilamino)-1,3-tiazol-4-il] àcid acètic) i el S4 (6-(4-amino-bezesulfonilamino) àcid nicotínic), així com per a la producció de l'anticòs policlonal de conill, utilitzant com a immunògens els haptens S3 i S4 units covalentment a KLH, també foren prèviament [189]. La Figura 11 mostra l'estructura química del Sulfatiazole i del haptens S3 i S4.

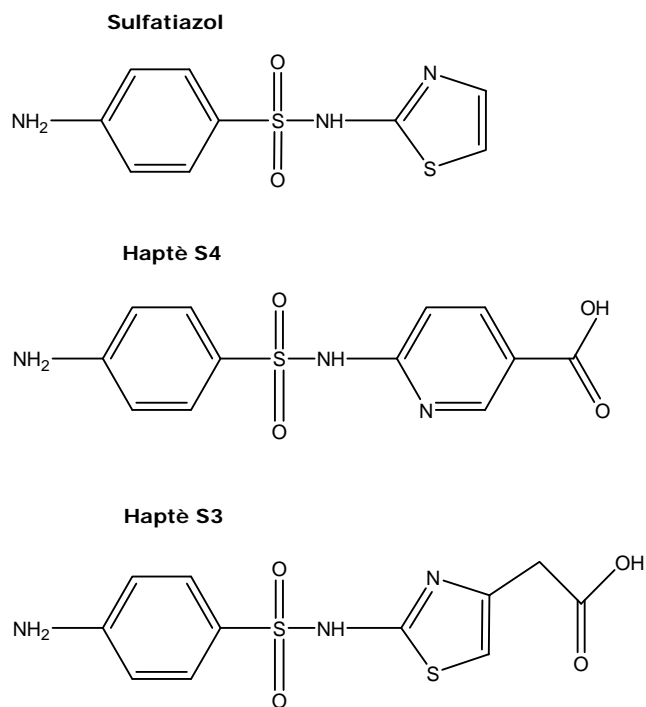


Figura 11 - Estructura del Sulfatiazole i dels haptens S4 i S3

3.2. INSTRUMENTACIÓ

Per la manipulació de líquids, s'ha utilitzat un cromatògraf líquid Agilent 1050 Series HPLC, dotat amb un loop de 20 μL de Rheodyne (Roohnert Park, CA, USA). Aquest sistema incorporava un detector de fluorescència HP model 1046A i un detector UV, JASCO UV-1575. La columna usada per a la purificació dels traçadors fou la Oligo Zorbax 6,2 x 80 mm amb un mida de partícula de 5 mm (Agilent). Els resultats cromatogràfics es van recollir i emmagatzemar utilitzant una ChemStation de Agilent versió A.01.01.

Els quatre suports RAM assajats foren:

- LiChorspher RP-18 ADS (Alkyl-diol-silica), dimensions de la columna 25x4 mm, diàmetre del porus 60 Å, diàmetre de la partícula 25 µm (Merck, Alemanya).
- LiChorspher RP-4 ADS (Alkyl-diol-silica), dimensions de la columna 25x4 mm, diàmetre del porus 60 Å, diàmetre de la partícula 25 µm (Merck, Alemanya).
- ISRP GFF II, dimensions de la columna 50x4,6 mm, diàmetre del porus 80 Å, diàmetre de la partícula de 5 µm (Regis Technologies Inc., EEUU)
- SPS ODS, dimensions de columna 50x4,6 mm, diàmetre de porus 100 Å, diàmetre de partícula de 5 µm (Regis Technologies Inc., EEUU)

3.3 SÍNTESI DELS TRAÇADORS

Amb l'objectiu de desenvolupar un mètode de marcatge amb caràcter general, la metodologia de síntesis va consistir en acoblar el haptè a un oligonucleòtid prèviament funcionalitzat amb un fluoròfor a l'extrem 5' i amb un grup amino (-NH₂) a l'extrem 3', de manera que l'acoblament es produeixi a través del grup funcional àcid carboxílic del haptè i el grup amino de l'oligonucleòtid, mitjançant reaccions generals de acoblament de àcids carboxílics a proteïnes. Així doncs, per a la síntesis dels traçadors s'han utilitzat el mètode de l'èster actiu [191] i de l'anhídrid mixt.

Metodologia de l'èster actiu

Per la reacció de conjugació d'haptens a oligonucleòtids, la quantitat d'haptè varia en funció del compost a conjuguar. Així doncs, les quantitats usades foren: 6 mg pel traçador 2d, 6,1 mg pel S4, 6,3 mg pel S3, 4 mg pel triptòfan i 3mg pel àcid aspàrtic, tots ells dissolts en 20 µL de N'N'dimetilformamida (DMF).

Amb aquest mètode l'haptè s'activa mitjançant la reacció amb N-hidroxisuccinimida (2,6 g en 30 µL de N'N'dimetilformamida) i dicitclohexilcarbodiimida (4 mg en 20 mL de DMF), amb la formació de dicitclohexilurea, que precipita i es separa per centrifugació. L'activació de l'haptè es duu a terme en agitació, durant 4 h a temperatura ambient i protegida de la llum. Finalment, l'haptè activat s'addiciona sobre una dissolució de 12,5 µL de oligonucleòtid marcat amb un fluoròfor 2000 µMolar i 77,5 mL de tampó carbonat a pH 9,6 (Figura 12).

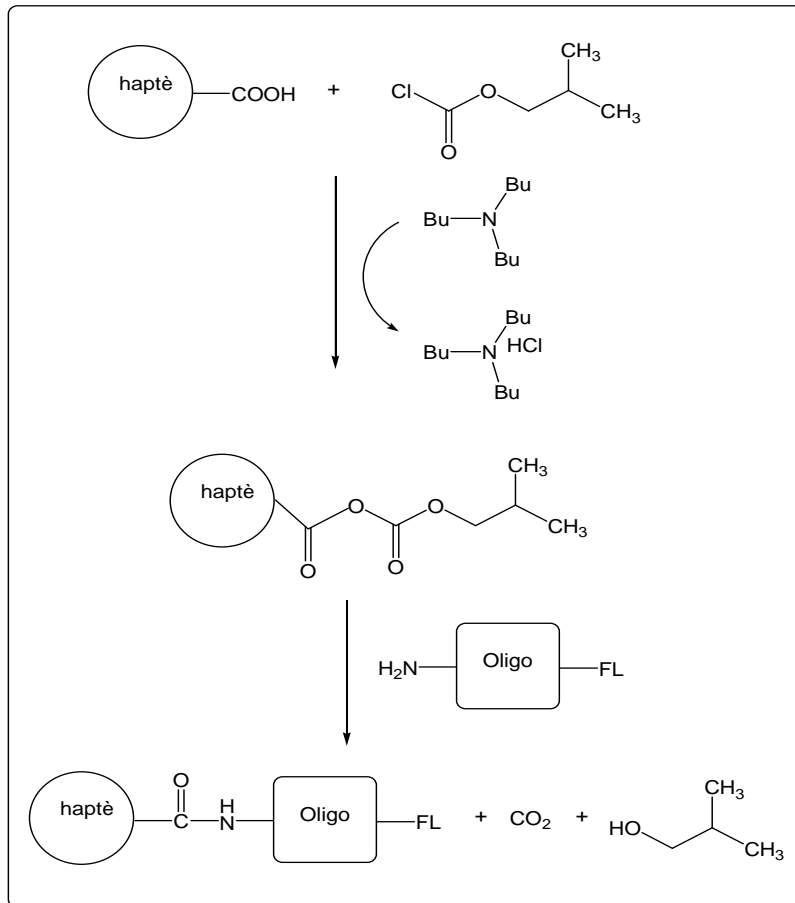


Figura 12 - Protocol d'acoblament d'haptens a oligonucleòtids aminats mitjançant el mètode de l'èster actiu

Metodologia d'anhídrid mixt

El mètode de l'anhidre mixt és altra tècnica d'acoblament de haptens a proteïnes que s'ha adaptat per realitzar l'acoblament de haptens a oligonucleòtids. Per la conjugació dels haptens les quantitats usades foren: 9,5 mg per l'haptè 2d, 9,1 mg per l'haptè S3 i 9,8 mg pel S4, en tots els casos en 40 μ L de DMF. L'haptè s'activa mitjançant la reacció amb 3,24

μL de cloroformat d'isobutil i 5,95 μL de tributilamina en dimetilformamida, durant una hora a temperatura ambient i protegida de la llum. L'haptè activat s'addiciona sobre una dissolució de 12,5 μL de oligonucleòtid marcat amb un fluoròfor 2000 μM i 77,5 mL de tampó carbonat a pH 9,6 (Figura 13).

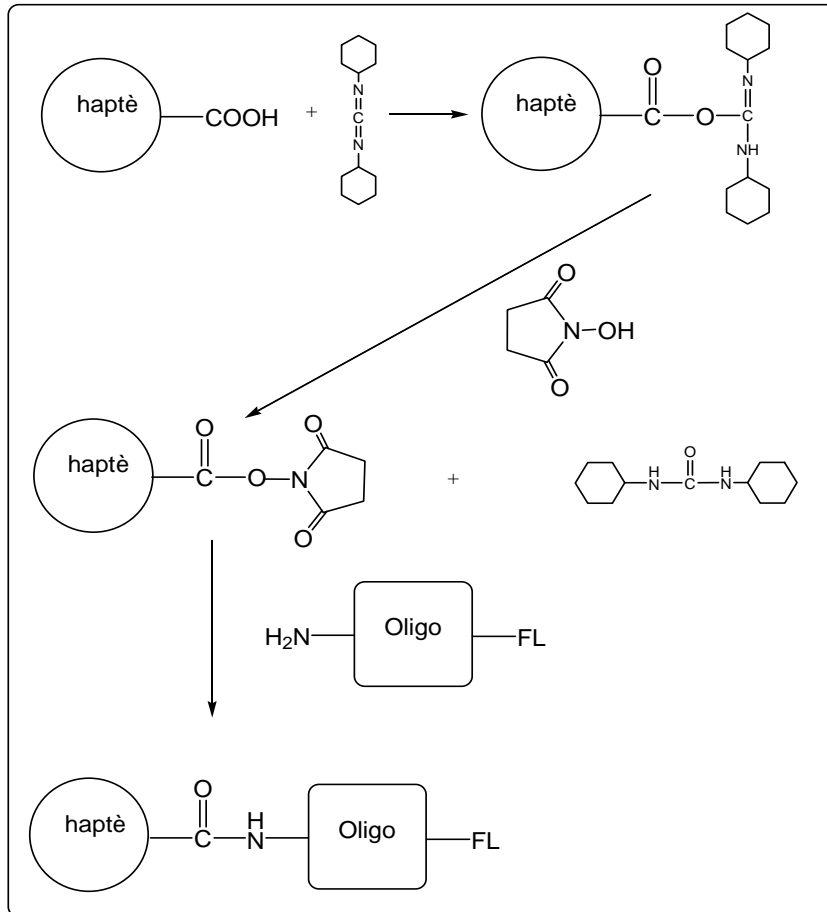


Figura 13 - Protocol d'acoblament d'haptens a oligonucleòtids aminats mitjançant el mètode del anhidrid mixt

3.4 PURIFICACIÓ DELS TRAÇADORS

Inicialment, la separació del conjugat haptè-oligonucleòtid (traçador) de la fracció de haptè que no s'ha unit es va dur a terme utilitzant cromatografia de exclusió molecular en gel Sephadex G-25. No obstant, degut a que el conjugat no té un mida molecular excessivament gran, a diferència dels conjugats típics haptè-proteïna, la separació presentà moltes dificultats, per la qual cosa es decidí utilitzar HPLC.

Per a posar a punt el procediment de purificació es va utilitzar un equip HPLC Agilent 1050 i una columna Zorbax Oligo Analytical, 6,2x801 mm (5-micron), dissenyada per a la separació de oligonucleòtids entre 3-48 pb. El mecanisme de retenció es basa en intercanvi iònic lligat a una fase reversa. Es va utilitzar un detector de fluorescència a diferent longitud d'ona, $\lambda_{\text{excitació}}$ 495 nm i $\lambda_{\text{emissió}}$ 519 nm per la purificació de les espècies marcades amb fluoresceïna, i, $\lambda_{\text{excitació}}$ 495 nm i $\lambda_{\text{emissió}}$ 525 nm, per les espècies marcades amb 6-carboxifluoresceïna (6-FAM).

Tal com mostra la Taula 10, la fase mòbil utilitzada fou diferent en funció del traçador a purificar. Així doncs, en els traçadors que contenen tres fluoresceïnes, els marcats en FAM i els formats pels haptens del sufatazol S3 i S4, s'utilitzà acetonitril en la fase mòbil, el qual va ser eliminat sota corrent de nitrogen després de recollir la fracció corresponent al traçador. Seguint les recomanacions de la bibliografia [192] es decideix treballar en gradient de força iònica (0-100% de B durant 60 min i 10 min de reequilibri) mitjançant la addició de NaCl 0,8 N. Les altres condicions de

treball foren: flux de fase mòbil de 1mL/min, volum d'injecció 20 µL i 25 °C de temperatura.

Taula 10- Fases mòbils utilitzades en la purificació dels traçadors

<i>TRAÇADOR</i>	<i>FASE MÒBIL</i>
2d-SYM18-3FI	A: PBS 0,02M, pH 7 B: PBS 0,02M, pH 7 amb NaCl 0,8 N
2d-SYM18-3FI	A: 20% ACN, 80% PBS 0,02M, pH 7 B: 20% ACN, 80% PBS 0,02M, pH 7 amb NaCl 0,8 N
2d-SYM 29-6FAM	A: 20% ACN, 80% PBS 0,02M, pH 7 B: 20% ACN, 80% PBS 0,02M, pH 7 amb NaCl 0,8 N
S4-SYM18-1FI	A: 10% ACN, 90% PBS 0,02M, pH 7
S3-SYM18-1FI	B: 10% ACN, 90% PBS 0,02M, pH 7 amb NaCl 0,8 N
S4-SYM18-3FI	A: 20% ACN, 80% PBS 0,02M, pH 7
S3-SYM18-3FI	B: 20% ACN, 80% PBS 0,02M, pH 7 amb NaCl 0,8 N

En aquestes condicions cromatogràfiques es va dur a terme la purificació de tots els traçadors sintetitzats en la tesis.

3.5 PROTOCOL DE TREBALL PER L'IMMUNOSENSOR H-H

L'assaig H-H es basa en un format competitiu directe, en el que la competició s'estableix en dissolució i posteriorment els productes de l'immunoreacció se separen mitjançant un suport d'accés restringit (RAM).

El procediment de l'assaig consisteix en mesclar i homogeneïtzar dissolucions d'anticòs, haptè marcat i problema, fent-la passar la mescla a través del suport RAM i seguint les següents operacions:

Pas 1 Activació de la columna RAM mitjançant la injecció de:

4 mL de metanol a 0,5 mL/min

1 mL de H₂O a 0,5 mL/min

2,5 mL de tampó fosfat pH 7 a 0,5 mL/min

Pas 2 Injecció de 1 mL de mescla d'immunoreactius a 0,5 mL/min

Pas 3 Rentat del suport RAM mitjançant la injecció de:

2,5 mL de H₂O a 0,5 mL/min

10 mL de metanol a 0,5 mL/min

Els immunoassaigs competitiu, ja siguin en fase homogènia com heterogènia, es basen en la competició entre l'anàlit i el traçador per unir-se a l'anticòs específic en quantitats limitants. La relació entre el senyal enregistrat i la concentració d'anàlit no es lineal, si no que les corbes de calibrat senyal vs el logaritme de la concentració de l'anàlit tenen forma sigmoide corresponent a l'equació:

$$Senyal = \frac{A_{max} - A_{min}}{1 + \left(\frac{[analit]}{I_{C50}} \right)^b} + A_{min}$$

A_{max} és l'asíptota màxima corresponent a el senyal en absència d'anàlit

A_{min} és l'asíptota mínima corresponent a el senyal en excés d'anàlit

b és la pendent de la corba en el punt d'inflexió

IC_{50} és el valor de la concentració de l'anàlit en punt mitja

Normalment es treballa en senyals normalitzades

$$\text{Senyal Normalitzada} = 100 \times \frac{B - B_{\infty}}{B_0 - B_{\infty}}$$

B_0 es el senyal absolut de la mostra en absència d'anàlit

B_{∞} es el senyal de fons o la produïa per una mostra contenint una gran excés d'anàlit

En la terminologia dels immunoassaigs és freqüent assimilar la sensibilitat del mètode amb la concentració d'anàlit que provoca una reducció de el senyal (inhibició), essent les valors d'inhibició més habituals el 50% i el 10%. La concentració d'anàlit que redueix el senyal màxim (A_{max}) un 50% és coneix com IC_{50} . La concentració d'anàlit que disminueix A_{max} un 10% es considera una estimació del límit de detecció de l'assaig (LOD). Un altre paràmetre d'interès és l'interval de treball que oscil·la entre les concentracions d'anàlit que disminueixen l' A_{max} el 20% i 80%

3.6 MOSTREIG I TRACTAMENT DE LA MOSTRA

L'immunosensor H-H desenvolupat es va aplicar al anàlisi d'atrazina i sulfatiazole en aigües. S'anàlitzaren mostres d'aigua mineral comercial, procedent de la llera del Túria i d'una estació depuradora d'aigües residuals (EDAR). A les mostres natives i fortificades amb l'anàlit d'interès a diferents nivells se'ls va ajustar la força iònica i el pH amb PBS 10x, així com el percentatge de dissolvent orgànic fins al 40% en metanol. Les mostres procedents de l'EDAR, es filtraren per gravetat utilitzant un filtre Watman nº 2.

RESULTATS I DISCUSSIÓ

4.1 ASSAIGS PRELIMINARS

El format d'assaig H-H aplicat al sistema sensor a desenvolupar es basa en efectuar la separació entre el traçador lliure i el complex anticòs-traçador després de la immunoreacció produïda en medi homogeni.

Així doncs, seguint l'esquema de la Figura 14, la reacció immunoquímica de competició es duu a terme en fase homogènia i, posteriorment, els productes d'aquesta se separen mitjançant un suport d'accés restringit.

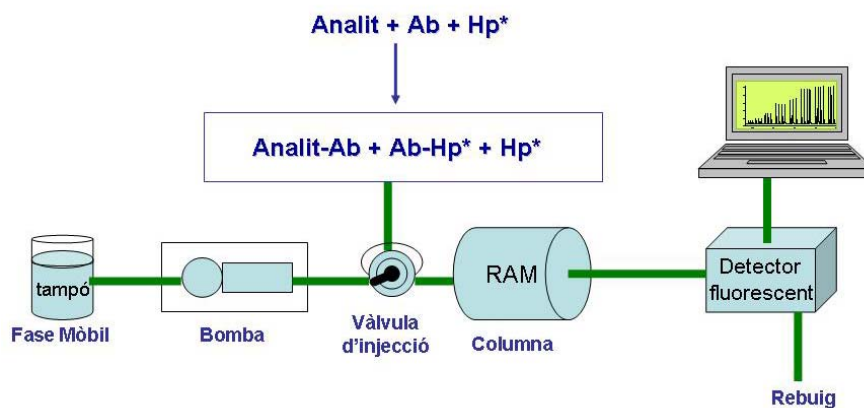


Figura 14 - Esquema del funcionament de l'immunosensor H-H

Els assaigs es realitzaren amb i sense fase estacionària amb la finalitat de comparar el senyal obtingut sense columna (pic corresponent al traçador, ja que l'Ab a les dissolucions de treball no genera senyal de fluorescència), a la que es va assignar arbitràriament el valor 100%, amb el senyal generat quan es treballa amb la columna.

A concentracions baixes d'anticòs, aquest està en defecte i, per tant, tot el traçador està en forma lliure retingut en l'interior de la columna. A

mesura que s'incrementa la concentració de Ab augmenta també la quantitat de immunocomplex format, i per tant s'observa un creixement del senyal analític.

Aquest format escurça el cicle d'anàlisi, ja que la competició en dissolució és molt ràpida. A més s'eliminen etapes de rentat de l'immunoreactor i, el que és més important, l'etapa de regeneració de la superfície del suport. Amb aquesta idea es plantejaren dos línies principals d'estudi:

- a) Tipus de suport RAM a utilitzar.
- b) Disseny d'un sistema traçador general basat en la utilització d'oligonucleòtids marcats amb un fluoròfor.

4.1.1 Estudi del tipus de fases estacionàries

Tal i com es descriu en la introducció (*apartat 1.5.2.1*), el suport RAM a utilitzar per a la separació dels productes de la immunoreacció ha d'aconseguir que el traçador lliure (Hp*) quedi retingut totalment en la fase interna del suport, mentre que l'immunocomplex (Ab-Hp*), que hi interacciona molt dèbilment, surti de la fase estacionària i es detecti directament.

Així, es va estudiar el comportament de les fases estacionàries ADS C18 i C4 davant els immunoreactius i productes de la immunoreacció. Aquestes fases es caracteritzen per tenir una superfície externa hidrofílica (diols) que actua com a suport d'exclusió molecular, i una superfície interna hidrofòbica (fase reversa), constituïda per partícules de sílice porosa derivatitzada amb alcans de diferent longitud de la cadena (C18 o C4),

amb un diàmetre de porus de 60 Å. Substàncies amb una massa molecular superior a 15 KD, com per exemple les proteïnes, no poden accedir a l'interior del suport i travessen la fase estacionària sense quedar retingudes. Els anàlits petits, en funció de la seva polaritat, interaccionen en major o menor extensió amb la fase reversa i són retinguts.

Abans de realitzar els assaigs, les fases estacionàries es van activar seguint les indicacions del fabricant. La Taula 11 mostra el procés d'activació del suport C18.

Taula 11 - Activació de la fase estacionària ADS C18

<i>Temps (min)</i>	<i>Fase Mòbil</i>	<i>Cabal (mL/min)</i>
0	2-propanol	0,5
8	H ₂ O	0,8
10	PBS 1x	0,5

Després d'activar la fase estacionària i abans d'iniciar els estudis de retenció amb molècules de mida petita, és convenient realitzar un bloqueig dels punts d'unió inespecífica mitjançant molècules de mida elevada, generalment proteïnes. En aquest assaig es va usar sèrum sanguini inespecífic de conill (100 µL) a una dilució 1/10000 (v/v).

Un cop activada la fase estacionària i bloquejats els punts inespecífics, es va injectar una dissolució de fluoresceïna, marcador a utilitzar en la preparació del traçador, i es controlà l'aparició o no de senyal a la sortida de la fase estacionària mitjançant un detector de fluorescència.

La injecció de diferents dissolucions de 1 mg/L de fluoresceïna, utilitzant PSB 1x com a fase mòbil, no donà lloc a cap senyal. Així, es va concloure

que la fluoresceïna quedava retinguda en l'interior dels porus del suport RAM.

Posteriorment, amb la finalitat de procedir a la neteja de la fase estacionària, es va dur a terme l'elució de la fluoresceïna utilitzant metanol com a fase mòbil, ja que segons la bibliografia [193] cal que la fase mòbil contingui dissolvents orgànics perquè l'elució sigui eficaç.

A continuació, i amb la finalitat de comprovar el comportament de la fase estacionària RAM en utilitzar una molècula de gran mida, com és el cas d'una proteïna, s'injectà una dissolució d'immunoglobulina unida covalentment a fluoresceïna. Els senyals fluorimètrics ens van indicar que la macromolècula no es retenia en la superfície interna de la fase estacionària i que aquesta eluïa completament amb el volum mort.

Una vegada comprovat el funcionament correcte del suport (retenint les molècules de mida petita i eluint les grans amb el volum mort) es va procedir a establir la capacitat de la fase estacionària. Per aquesta raó es van realitzar 170 injeccions seqüencials de 500 µL de fluoresceïna (un total de 85 µg, 0,256 µmols) sense que es registres cap senyal en el fluorímetre. Aquesta quantitat de fluoresceïna equival a 4000 injeccions de 20 µL d'una solució de 1 mg/L, és a dir, les fases estacionàries ADS C4 i C18 utilitzades presenten una capacitat de retenció molt elevada. Així, es poden dur a terme milers d'assaigs sense arribar a saturar-se.

Però amb l'ús continuat del suport va observar-se un augment de la pressió, probablement deguda a una obturació creixent de la fase estacionària. Per tal d'eliminar aquest problema, es van realitzar diferents

cicles de neteja amb diferents dissolvents orgànics, com 2-propanol, metanol i acetonitril, sense obtenir bons resultats. No obstant això, el procediment de neteja recomanat pel fabricant, utilitzant un gradient de tetrahidrofurà/H₂O (5:95 v/v) durant 5 min, va permetre disminuir la pressió i realitzar nous assaigs amb fluoresceïna i immunoglobulina marcada amb fluoresceïna.

Atès que aquest cegament podria ser a causa del bloqueig dels punts d'unió inespecífic, es va optar per eliminar aquesta etapa. En aquestes condicions, els assaigs duts a terme amb l'anticòs marcat indicaren que l'elució no era total amb el volum mort. Una estimació realitzada tenint en compte el senyal generat amb i sense columna, tal com s'ha indicat anteriorment, va permetre estimar el percentatge de l'elució al voltant d'un 70%. A la vista dels resultats obtinguts es va optar per realitzar un únic bloqueig inicial amb 10 x 20 µL d'una dissolució 1/500 (v/v) d'un sèrum inespecífic de conill i es va observar que, en aquest cas, l'elució de la immunoglobulina era del 100%. A més, no es produí cap obturació de la fase estacionària.

Així doncs, es va establir un procediment de treball basat en el bloqueig de les unions inespecífiques a l'inici de la vida útil de la fase estacionària i un protocol de neteja del suport després d'una jornada de treball. Les condicions utilitzades es recullen en la Taula 12.

Taula 12 –Protocol de bloqueig i neteja de fase estacionària ADS C18

	<i>Temps (min)</i>	<i>Dissolució (medi)</i>	<i>Cabal (mL/min)</i>
Bloqueig ^a	0,5	Sèrum de conill	0,5
Neteja	5	H ₂ O	0,8
	20	Metanol	0,5

^a A l'inici de la utilització de la fase estacionària

Un procediment similar es va realitzar amb la fase estacionària ADS C4 i tal i com succeïa amb la ADS C18, la dissolució de fluoresceïna (1 mg/L) era totalment retinguda després de realitzar més de 100 injeccions. Els assaigs realitzats amb la immunoglobulina marcada amb fluoresceïna van permetre comprovar que aquesta eluïa també amb el volum mort.

4.1.2 Influència del nombre de bases en la seqüència de l'oligonucleòtid

Per tal aprofundir en el coneixement del mecanisme de funcionament de les fases estacionàries RAM, es va estudiar com afectava la naturalesa de l'oligonucleòtid (seqüència de bases, longitud, mida, polaritat i hidrofobicitat, etc.) a la seva retenció. En primer lloc, es van utilitzar diferents seqüències d'oligonucleòtids marcats amb fluoresceïna (Taula 13).

Taula 13 - Característiques dels oligonucleòtids assajats

Oligonucleòtid	Seqüència	Nº Bases	Pes Molecular (daltons)
SYM 16- FI	5'FI-TGGTGGATCG-NH ₂ 3'	10	3000
SYM 20-1FI	5' FI-TAGTA-C7-NH ₂ 3'	5	2300
SYM 18-1FI	5' FI-TAG-C7-NH ₂ 3'	3	1700

Utilitzant PBS 1x a pH 7,5 com a fase mòbil, 20 µL de cadascun dels oligonucleòtids a una concentració de 1 mg/L es van injectar a les columnes ADS C18 i C4.

Tal com mostra la Taula 14, s'observaren diferències entre els tres oligonucleòtids independentment de la fase estacionària utilitzada. Per a ambdues fases estacionàries, s'observà que a mesura que disminueix el número de bases de l'oligonucleòtid, el percentatge que queda retingut en la fase estacionària augmenta, des d'un 68% pel oligonucleòtid de 10 bases fins a un 99% per al de 3 bases. Si observem els models tridimensionals (Figura 9), mentre que els oligonucleòtids de 3 i 10 bases mantenen l'estructura de cadena quan assoleixen la mínima energia, en l'oligonucleòtid de 5 bases es produeix el plegament de la macromolècula que, així, pot quedar més fàcilment retinguda dins dels porus de la fase estacionària RAM. Aquest fet pot explicar la escassa diferència en el percentatge d'elució entre els oligonucleòtids de 3 i de 5 bases.

Taula 14 - Percentatge d'oligonucleòtid retingut en les fases estacionàries ADS C18 i C4

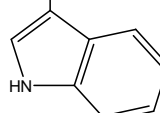
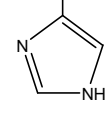
<i>Oligonucleòtid</i>	<i>C18 R(%)</i>	<i>C4 R(%)</i>
SYM 16-1FI	68,0	70,1
SYM 20-1FI	96,5	97,4
SYM 18-1FI	99,2	99,0

R-retenció

Un altre paràmetre a avaluar és com afecta la polaritat i càrrega d'una molècula a les interaccions amb la superfície interna de la fase estacionària i, per tant, a la seva retenció. Aquest estudi es va dur a terme utilitzant aminoàcids de diferent polaritat, índex hidropàtic, acidesa i basicitat.

Els aminoàcids seleccionats per aquest estudi foren: la glicina per ser el primer en la sèrie d'aminoàcids, petit, no polar i neutre; la valina per ser hidrofòbica; l'àcid aspàrtic i la histidina per les seves característiques àcides i bàsiques, respectivament; i el triptòfan per la seva mida i perquè presenta fluorescència, el que permet la seva detecció directa. Algunes de les característiques d'aquests aminoàcids es mostren en la Taula 15.

Taula 15 - Característiques físico-químiques dels aminoàcids estudiats

	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{H}_2\text{N}-\text{CH}-\text{C}-\text{OH} \\ \\ \text{H} \end{array}$	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{H}_2\text{N}-\text{CH}-\text{C}-\text{OH} \\ \\ \text{CH}-\text{CH}_3 \\ \\ \text{CH}_3 \end{array}$	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{H}_2\text{N}-\text{CH}-\text{C}-\text{OH} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{C}=\text{O} \\ \\ \text{OH} \end{array}$	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{H}_2\text{N}-\text{CH}-\text{C}-\text{OH} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{HN} \end{array}$ 	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{H}_2\text{N}-\text{CH}-\text{C}-\text{OH} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{N} \end{array}$ 
	Glicina (Gly)	Valina (Val)	Àcid aspàrtic (Asp)	Triptofan (Try)	Histidina (His)
M_r	75,07	117,15	133,10	204,23	155,16
Punt isoelèctric	5,97	5,96	2,77	5,89	7,47
$pK_1 (-\text{COOH})$	2,21	2,27	1,88	2,38	1,78
$pK_2 (-\text{NH}_3^+)$	9,15	9,52	9,60	9,39	9,17
pK_{radical}			3,65		5,97
Polaritat	No polar	no polar	Polar	no polar	Polar
Acidesa i basicitat	Neutra	Neutra	Àcid	Neutra	Bàsic
Index Hidropàtic *	-0,4	4.2	-3,5	-0,9	-3,2

*Escala que combina la hidrofobicitat i hidrofilitat de les cadenes laterals; s'usa per a predir l'afinitat dels aminoàcids en un ambient aquós (valors negatius) o un ambient hidròfob (valors positius).

L'espectre UV de les dissolucions aquoses dels aminoàcids a una concentració de 100 mg/L indicà que la longitud d'ona de màxima absorbència era de 280 nm en tots els casos. Per tant, va ser la que es va

utilitzar per a realitzar l'estudi del suport RAM, amb detecció UV. Pel triptòfan i degut a les seves característiques, es va utilitzar també un detector de fluorescència a λ_{ex} 280 nm i λ_{em} 350 nm.

En primer lloc, l'estudi es va dur a terme amb el suport ADS C18, utilitzant PBS 1x a pH 7,5 com a fase mòbil i injectant 20 μL d'una dissolució de cada aminoàcid en un interval de concentracions de 100 a 2000 mg/L. En tots els casos els aminoàcids quedaven retinguts en la fase estacionària, la qual cosa du a la conclusió que la polaritat, hidrofobicitat o hidrofilitat de molècules de petita mida no influeix en el funcionament d'aquest tipus de fases estacionàries.

4.1.3 Via general de marcatge

Per a comprovar el funcionament de la fase estacionària amb el traçador a utilitzar en el desenvolupament del sensor es va dissenyar una via de marcatge de l'oligonucleòtid utilitzat com a traçador amb caràcter general, emprant oligonucleòtids marcats amb fluoresceïna en l'extrem 5' i amb un grup amino terminal en 3'. L'oligonucleòtid utilitzat permet la conjugació directa a l'haptè a través del grup àcid (-COOH) mitjançant el mètode de l'èster actiu [191]. Quan s'utilitzà el mètode de l'anhidre mixt [190] no s'aconseguí la conjugació de l'oligonucleòtid a l'haptè.

La Figura 15 ens mostra l'estructura del primer traçador sintetitzat, 2d-SYM16-1Fl, per unió de l'oligonucleòtid SYM 16 (10 bases) a l'haptè 2d de l'atrazina.

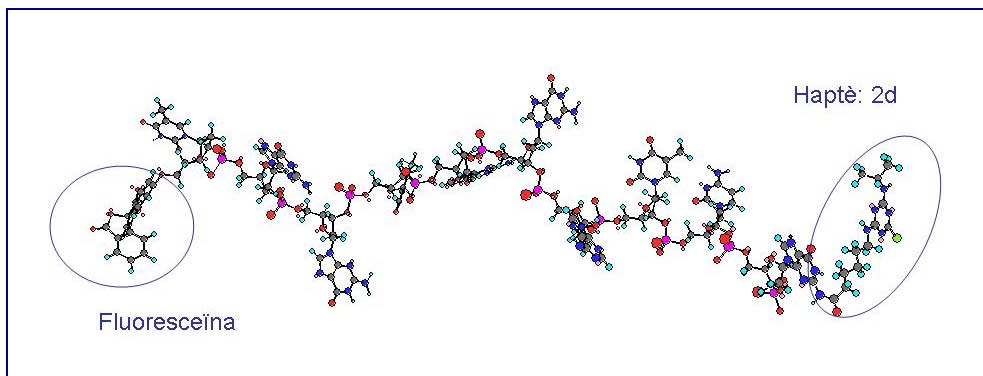


Figura 15 - Estructura del traçador 2d-SYM16 1F1

La purificació del traçador (2d-SYM16 1F1) amb la finalitat de separar la fracció de l'haptè no unida a l'oligonucleòtid es va realitzar, inicialment, utilitzant cromatografia d'exclusió molecular i Shephadex 25. Els resultats obtinguts no foren satisfactoris degut a que la mida del conjugat no permet la separació efectiva dels productes de la conjugació.

Una alternativa plantejada per a resoldre el problema va ser realitzar la purificació mitjançant HPLC amb una columna específica per a la separació d'oligonucleòtids Zorbax Oligo Analytical 6,2 x 801 mm 5-micron.

Com a fase mòbil i d'acord amb les recomanacions de la bibliografia [196], es va seleccionar tampó fosfat amb modificadors orgànics. Es van assajar tampó fosfat salí (PBS) i tampó fosfat (PB) a diferents concentracions entre 0,5x i 4x, amb un percentatge de modificador orgànic d'entre 1 i 20% (v/v).

Inicialment, i en règim isocràtic, s'assajaren diferents fases mòbils formades per PBS entre 0,5 i 4x i diferents percentatges (entre 1 i 20%) de

dos dissolvents orgànics (metanol i acetonitril). En cap de les fases mòbils estudiades, i variant el cabal des de 0,5 fins a 2 mL/min, s'aconseguí la separació de les espècies. A la vista dels resultats, i degut a que la separació d'oligonucleòtids millora en augmentar la força iònica del solvent en funció del temps, es decidí treballar en gradient de força iònica utilitzant NaCl a diferents concentracions (0,1, 0,5, 0,8 i 1 N). Així doncs, s'assaja inicialment una fase mòbil formada per:

A: 5% Metanol, 95% 0,02M PBS pH 7

B: 5% Metanol, 95% 0,02M PBS pH 7 amb 0,1 N NaCl

Amb aquesta fase, no es va produir l'elució de les espècies (oligonucleòtid lliure i traçador). Van quedar retingudes en l'interior de la columna i no s'observaren pics en el cromatograma. Els assaigs realitzats augmentant la força iònica amb NaCl fins a 1N i el percentatge de metanol fins al 20%, indicaren que encara que apareixen els pics en el cromatograma la resolució no fou l'adequada en cap de les fases estudiades, pel que es va decidir canviar el dissolvent per l'acetonitril (ACN).

Inicialment, i a un cabal de 1mL/min, s'assajà la següent fase mòbil

A: 5% ACN, 95% 0,02M, PBS pH 7

B: 5% ACN, 95% 0,02M, PBS pH 7 amb 1 N NaCl

En aquest cas tampoc s'observaren pics en el cromatograma, el que obligà a dur a terme nous assaigs augmentant la concentració salina i el percentatge de dissolvent orgànic.

Al realitzar la separació amb NaCl 0,5 N i un 20% d'acetonitril, s'observà la separació de les dues espècies amb un temps de retenció (tr) de 59 min

pel traçador. A concentracions de NaCl 0,8 i 1 N s'observaren temps de retenció inferiors (14,9 i 34,3 min, respectivament). A la vista dels resultats, es decidí treballar amb 0,8 N de NaCl, donada l'escassa diferència en els temps d'elució del traçador i el menor contingut en sals de la fase mòbil, en un intent d'evitar sobrepressió en el sistema. Així doncs, les condicions finals per a dur a terme la separació foren:

A: 20% ACN 80% 0,02M PBS, pH 7

B: 20% ACN 80% 0,02M PBS, pH 7 amb 0,8 N NaCl

Per tal d'escurçar el temps de purificació es van realitzar assaigs augmentant el cabal de fase mòbil fins a 2mL/min; però el sistema es sobrepressionà a mesura que s'incrementà el cabal (250-280 bars), de manera que se seleccionà com a òptim 1mL/min.

Així doncs, un cop es van estudiar les diferents composicions i gradients de fase mòbil, les condicions cromatogràfiques òptimes per a dur a terme la purificació del traçador foren les següents:

<i>Columna</i>	Zorbax Oligo Analytical 6.2 x 801 mm, 5-micron
<i>Fase mòbil</i>	A: 20% ACN, 80% PBS 0,02M, pH 7 B: 20% ACN, 80% PBS 0,02M, pH 7 amb 0,8 N NaCl
<i>Gradient</i>	0-100% de B durant 40 min i 10 min de re equilibri
<i>Temperatura</i>	25 °C
<i>Cabal</i>	1 mL/min
<i>Detecció</i>	Fluorescent ($\lambda_{excitació}$ 495nm i $\lambda_{emissió}$ 519nm)
<i>Volum d'injecció</i>	20 μ L

En la Figura 16 es mostra el cromatograma corresponent a l'oligonucleòtid SYM16-1FI dissolt en tampó carbonat, abans de la conjugació a l'haptè, en el que s'observa un pic a un temps de retenció 15,2 min. Després de la conjugació a l'haptè 2d i de l'etapa de purificació en les condicions optimitzades, el cromatograma mostra dos pics (Figura 17), un corresponent al conjugat 2d-oligonucleòtid (tr 34,3 min) i l'altre a l'oligonucleòtid no conjugat (tr 14,9 min).

En el cromatograma es pot apreciar que la reacció de conjugació no havia estat total, obtenint-se un rendiment del 85%, aproximadament. Donat que en la dissolució de conjugació encara restava oligonucleòtid lliure i haptè sense conjugat, així com altres possibles subproductes que podrien interferir en la immunoreacció, es va recollir la fracció entre tr 33 min i tr 37 min, corresponent teòricament al traçador.

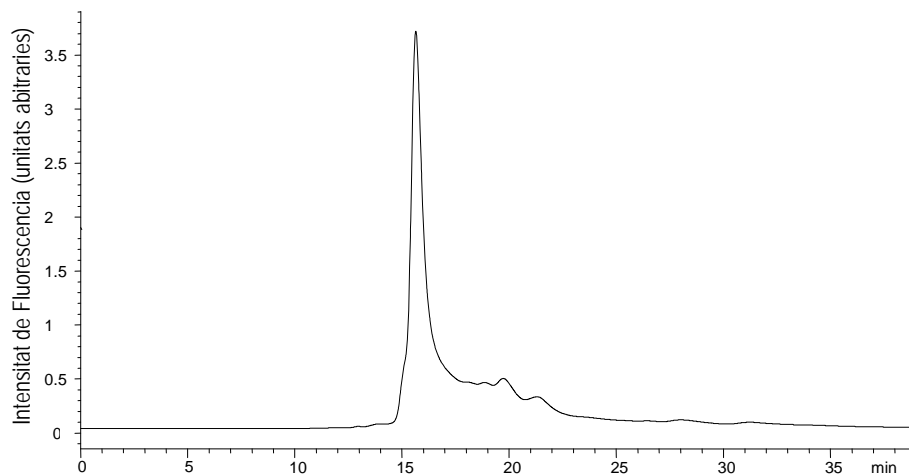


Figura 16 - Cromatograma de l'oligonucleòtid SYM 16 1FI

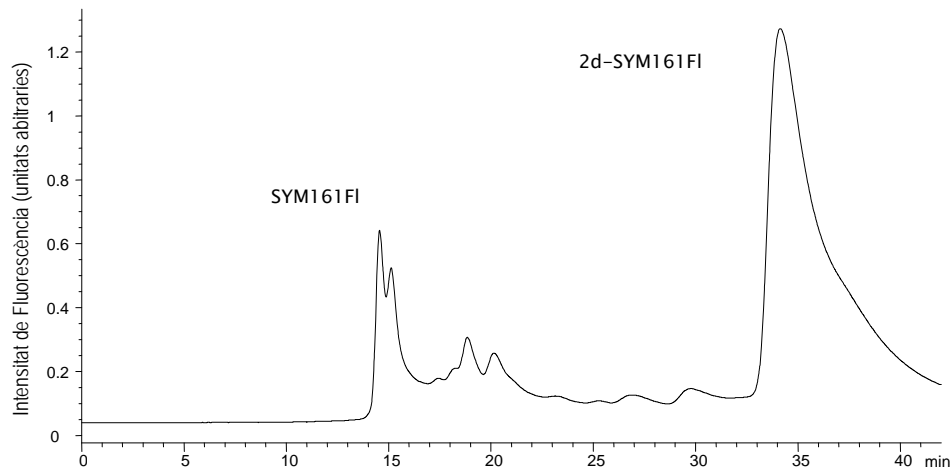


Figura 17 - Cromatograma dels productes de la reacció de conjugació de l'oligonucleòtid SYM16 1FI a l'haptè 2d

Amb la finalitat de verificar la presència del traçador en la fracció recollida es va estudiar la resposta obtinguda amb un sensor de captura per a atrazina, prèviament desenvolupat [36], utilitzant com a traçador 2d-peroxidasa i el conjugat 2d-oligo marcat (separat en la columna) com anàlit.

L'assaig de captura es basa en un format competitiu directe, en el que la competició s'estableix en dissolució i posteriorment l'immunocomplex format es capturat en un suport de proteïna A/G. El procediment de l'assaig (Figura 18) consisteix en mesclar i homogeneïtzar dissolucions d'anticòs, haptè marcat i problema, fent passar la mescla a través d'un reactor que conté la proteïna A/G. Després del rentat del reactor amb tampó fosfat, per a eliminar les espècies que no han quedat unides en la proteïna A/G, es va procedir al revelat, tot injectant el substrat enzimàtic HPPA. Un cop obtinguda el senyal, la regeneració del reactor es va dur a

terme mitjançant la injecció d'una dissolució de glicina/HCl a pH 2 com a desorbent.

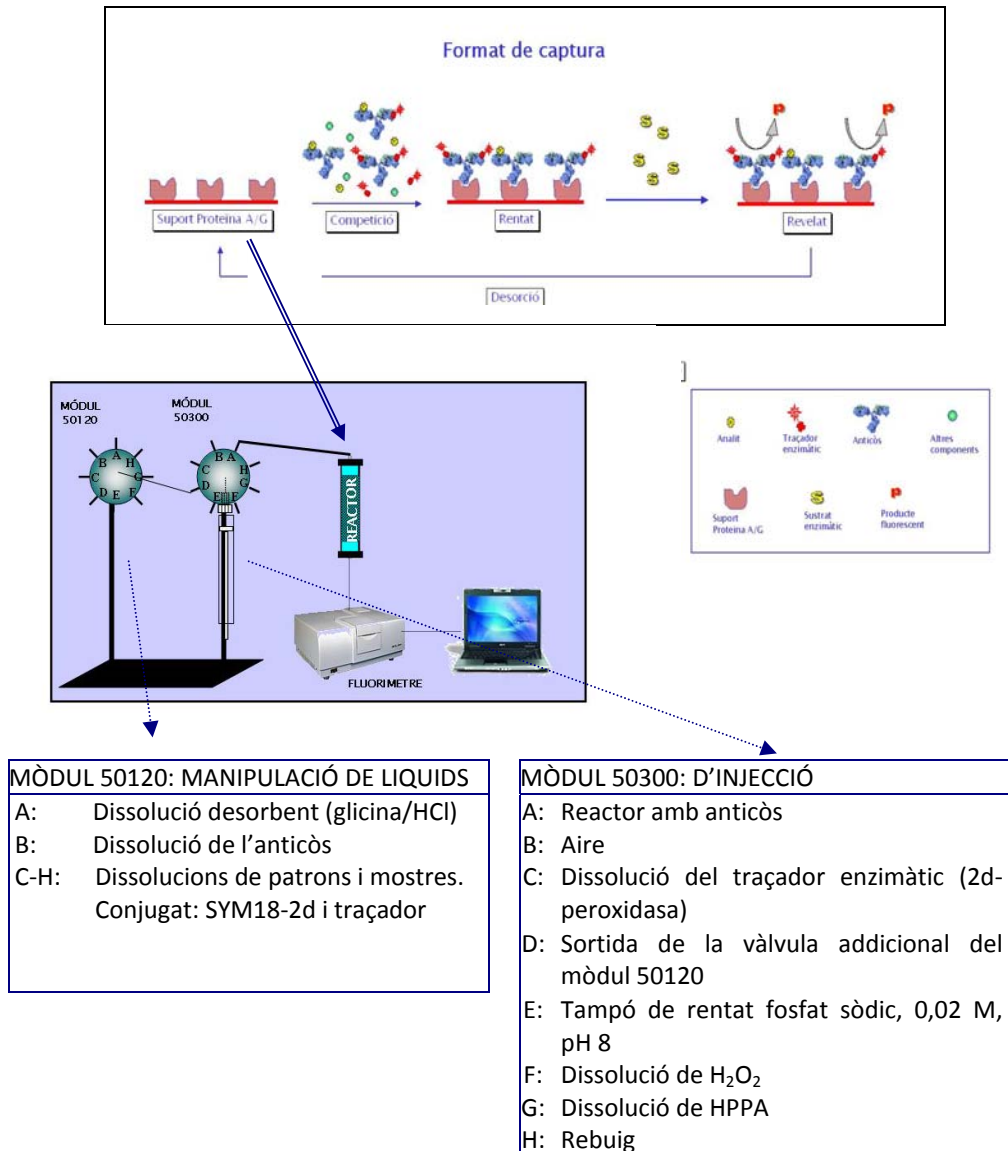


Figura 18 - Esquema del funcionament l'immunosensor de captura

Les operacions bàsiques realitzades amb el sensor de captura s'esquematitzen en la Taula 16. El temps total de l'assaig fou de 23 min.

Taula 16 – Etapes bàsiques de funcionament de sensor de captura

<i>Pas</i>	<i>Operació</i>
1	Mesclat de la mostra (0,8 mL), traçador (0,2 mL) i anticòs (0,2 mL)
2	Injecció de 1 mL de mescla a 0,25 mL/min
3	Rentat del reactor amb 3 mL de tampó fosfat, pH 8, a 1 mL/min
4	Mescla de HPPA (0,3 mL, 0,8 g/L) amb H ₂ O ₂ (0,3 mL, 0,012 %)
5	Injecció de 0,2 mL de mescla
6	Incubació de la mescla en el reactor
7	Rentat del reactor amb 1,5 mL de tampó fosfat a 2 mL/min Registre del pic
8	Desorció amb 2,5 mL de dissolució 0,1 M glicina/HCl pH 2 a 0,5 mL/min
9	Rentat del reactor amb 3 mL de tampó fosfat a 1mL/min Fi del cicle

Els resultats de l'assaig no foren els esperats. El conjugat no inhibeix la unió de l'anticòs al traçador 2d-peroxidasa. Aquest fet era una prova que no s'havia format l'immunocomplex i, per tant, el conjugat 2d-oligo es va poder veure afectat per l'ús de dissolvents orgànics en la fase mòbil durant l'etapa de purificació.

Per aquest motiu, es va procedir a assajar un nou procés de purificació del traçador, de manera que s'eliminà l'ús d'acetonitril en la fase mòbil.

Les condicions cromatogràfiques utilitzades foren:

<i>Columna</i>	Zorbax Oligo Analytical 6,2x 801mm, 5-micron
<i>Fase mòbil</i>	A: PBS 0,02M, pH 7 B: PBS 0,02M, pH 7 amb 0,8 N NaCl

<i>Gradient</i>	0-100% de B durant 60 min i 10 min de reequilibri
<i>Temperatura</i>	25 °C
<i>Cabal</i>	1 mL/min
<i>Detecció</i>	Fluorescent ($\lambda_{\text{excitació}}$ 495 nm i $\lambda_{\text{emissió}}$ 519 nm)
<i>Volum d'injecció</i>	20 μ L

En aquestes condicions es va analitzar una dissolució d'oligonucleòtid original en tampó carbonat i la dissolució procedent de la reacció de conjugació del haptè 2d. Els cromatogrames obtinguts es mostren en les figures 19 i 20, respectivament. En les noves condicions, els temps de retenció de l'oligonucleòtid SYM 16 1Fl fou de 34,4 min (Figura 19), gairebé el doble de l'obtingut en les condicions anteriors (tr 15,2 min) .

Tal com es mostra en la Figura 20, el cromatograma de la dissolució de conjugació mostra un a pic a un tr de 46,4 min que podria correspondre al traçador (SYM16-2d). Així, es va recollir la fracció entre 46-49 min, una alíquota de la qual s'analitzà mitjançant el sensor de captura.

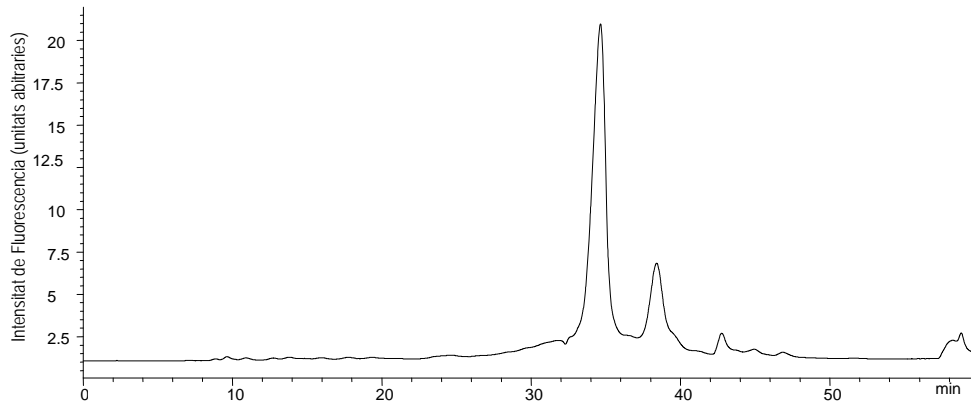


Figura 19 - Cromatograma corresponent a l'oligonucleòtid SYM 16-1FI

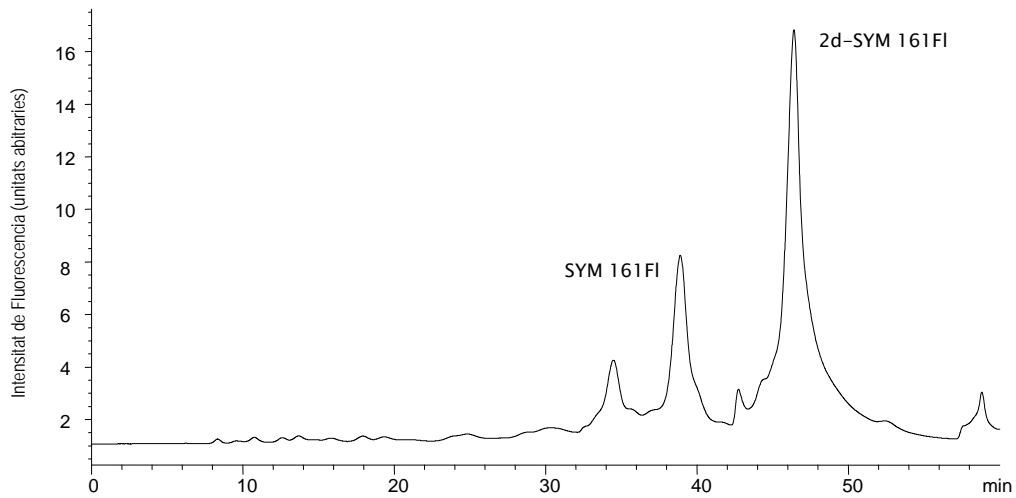


Figura 20 - Cromatograma dels productes de la reacció de conjugació de l'oligonucleòtid SYM16-1FI a l'haptè 2d

Com en el cas anterior, com anàlit es va usar una alíquota del conjugat de l'oligonucleòtid SYM16-2d, i com traçador el conjugat 2d-peroxidasa. En aquest cas, es va observar que el conjugat inhibia la unió de l'anticòs al traçador 2d-peroxidasa, fet que indicava que aquell s'estava unint específicament al conjugat 2d-oligo.

Així doncs, els assaigs realitzats permeteren assegurar que es formava l'immunocomplex i que la fracció recollida contenia el traçador purificat. Un cop establertes les condicions òptimes de purificació, es van sintetitzar i purificar altres traçadors mitjançant la unió de l'haptè 2d a oligonucleòtids de menor mida. Així es van sintetitzar els traçadors anomenats 2d-SYM18-1FI i 2d-SYM20-1FI, utilitzant oligonucleòtids de 5 i 3 bases, respectivament. Les estructures dels nous traçadors s'esquematitzen en la Figura 21 (a i b).

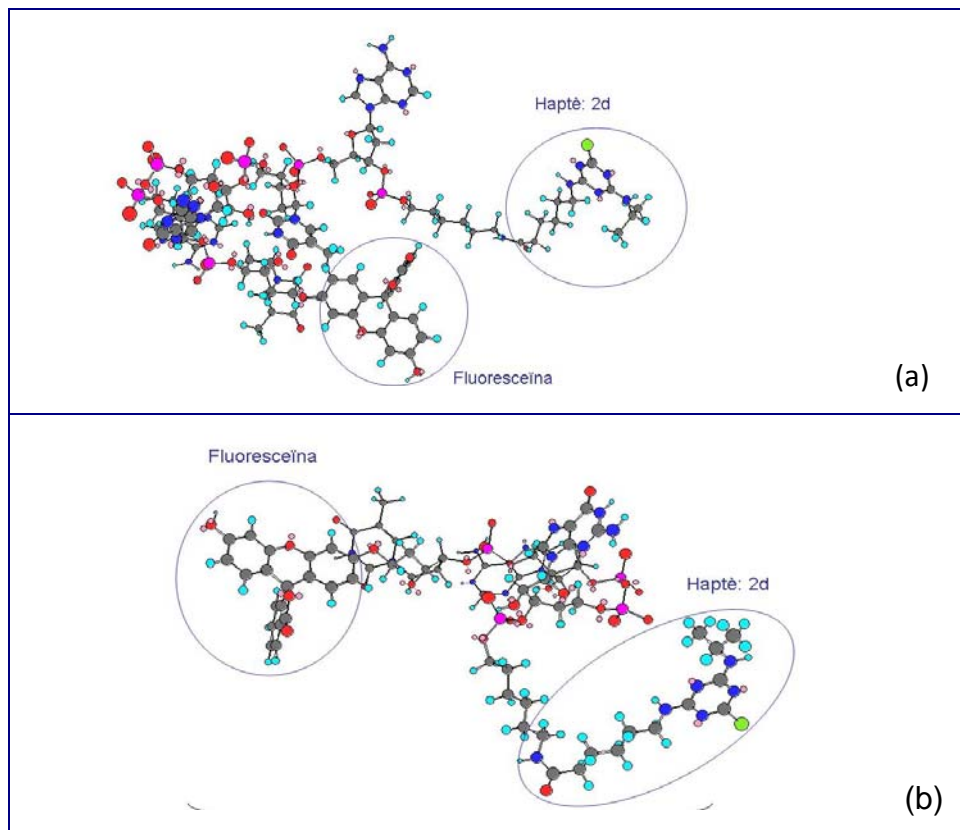


Figura 21 - Estructura dels traçadors 2d-SYM 20-1FI (a) i 2d-SYM18-1FI (b)

Després de purificar els traçadors, seguint el protocol desenvolupat prèviament, es va procedir a estudiar el seu comportament en les fases estacionàries ADS C18 i C4. Així doncs, s'injectaren 20 µL de dissolucions 1/4 (v/v) dels traçadors 2d-SYM16-1FI, 2d-SYM 20-1FI, 2d-SYM18-1FI utilitzant com a fase mòbil PBS 1x a pH 7,5.

Pràcticament no es van observar diferències entre el comportament de l'oligonucleòtid sol i del traçador (oligonucleòtid-2d), i tal i com passava en el cas dels oligonucleòtids, a mesura que augmentava la longitud del traçador el percentatge d'aquests que eluïa de la columna disminuïa (Taula 17). Tant el traçador format per oligonucleòtid de 3 com el de 5 bases queden igualment retinguts dins del suport. Aquest fet podria explicar-se degut a que l'oligo SYM20-1FI de 5 base aconsegueix la mínima energia quan es troba en forma plegada, tal com mostra la Figura 21.

Taula 17- Percentatge d'oligonucleòtid retingut amb les fases estacionàries ADS

<i>Traçador</i>	<i>C18</i>	<i>C4</i>
	<i>(%)</i>	<i>(%)</i>
2d-SYM 16-1FI	65,0	70,0
2d-SYM 20-1FI	96,0	96,0
2d-SYM 18-1FI	98,8	98,6

Per aquesta raó, tots els assaigs d'optimització posteriors es realitzaren utilitzant l'oligonucleòtid de menor nombre de bases (SYM18) i el traçador 2d-SYM18-1FI. Cal fer notar que el traçador 2d-SYM20-1FI també podria ser utilitzat, ja que el percentatge que queda retingut és més del

95%.

Un cop conegut el comportament del traçador, utilitzant oligonucleòtids de diferent longitud, calia observar què ocorria en canviar l'haptè 2d per una altra molècula. Per aquest motiu, es va realitzar un estudi amb la finalitat de conèixer el comportament en les fases estacionàries RAM, dels traçadors formats pels diferents aminoàcids estudiats anteriorment (veure Taula 15).

En primer lloc es va dur a terme la conjugació de l'oligonucleòtid SYM 18-1Fl a triptòfan i l'àcid aspàrtic, utilitzant el mètode de l'èster actiu.

En aquest cas la purificació no va ser fàcil, possiblement degut a la reactivitat intrínseca dels aminoàcids per la presència d'un grup amino i un grup àcid en la pròpia molècula. És possible que es produeixi una reacció intermolecular d'aquest dos grups i, per tant, un augment en el nombre de subproductes de conjugació, provocant no un pic definit sinó una banda ampla a tr 16 i 34 min, tal i com mostra la Figura 22 per l'àcid aspàrtic.

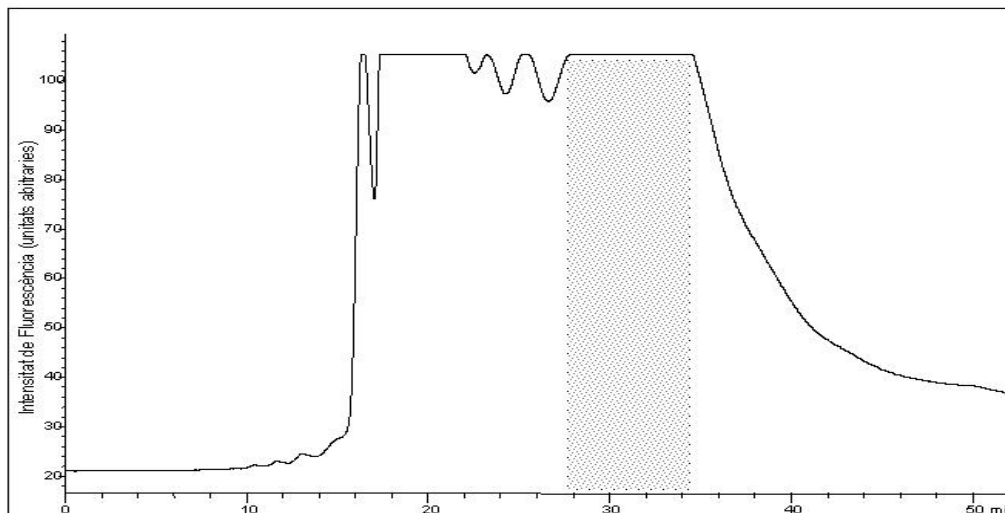


Figura 22 - Cromatograma dels productes de la reacció de conjugació de l'oligonucleòtid SYM18-1FI a l'àcid aspàrtic

Tot i amb això, es van recollir 6 fraccions de 1mL entre tr 28 i 34 min, sabent que poden estar impures. El mateix procediment es va aplicar amb el conjugat triptòfan-SYM 18-1FI.

Es van preparar diferents dilucions entre 1/20 a 1/5 (v/v) de les dues fraccions recollides, 20 μ L dels quals s'injectaren en la fase estacionària ADS C18, utilitzant PBS 1x a pH 7,5 com a fase mòbil. Tal com mostra la Taula 18, no s'observen diferències entre els dos aminoàcids conjugats, en els percentatges de retenció en la fase estacionària, que foren del 96,6 % i 95,8 % pel conjugat de l'àcid aspàrtic i del triptòfan, respectivament. Aquest comportament fou similar al que es produeix amb el traçador per a l'atrazina 2d-SYM18-1FI.

Taula 18 – Percentatge de traçador que es reté en la fase estacionària ADS C18

<i>Traçador</i>	<i>(%)</i>
2d-SYM18-1FI	98,8
àcid aspàrtic-SYM18-1FI	96,6
triptòfan-SYM18-1FI	95,8

A la vista dels resultats obtinguts, s'observà que l'espècie que marca el comportament del traçador en les fases estacionàries ADS són les característiques de l'oligonucleòtid (nº de bases i estructura espacial), ja que en canviar l'haptè pràcticament no varia el percentatge de traçador retingut en la fase estacionària.

4.2 DESENVOLUPAMENT DE L'IMMUNOSENSOR H-H

Amb els traçadors (2d-SYM18-1FI, 2d-SYM20-1FI) purificats i la bateria d'anticossos disponibles (anomenats KLH-2d I, KLH-2d II, KLH-2d III, KLH-2d IV) per a dur a terme la immunoreacció, es va procedir a l'optimització d'una sèrie de paràmetres que afecten a l'assaig, com ara: tipus de fase mòbil a utilitzar, concentració dels immunoreactius, format de treball "directe o indirecte" i tolerància a dissolvents orgànics, així com el tipus de fase estacionària (ADS C18 i C4, ISRP, SPS).

4.2.1 Fases estacionàries ADS C18 i C4

Donat que la reacció immunoquímica es duu a terme en dissolució, les primeres variables a estudiar foren la composició de la fase mòbil (tipus

de tampó, força iònica i pH) i concentració d'immunoreactius (anticòs i traçador).

Les fases RAM utilitzades inicialment foren les estudiades en els assaigs previs, ADS C18 i C4. Per ajustar les concentracions de traçador i d'anticòs de manera que originin senyals absoluts de magnitud acceptable, es van assajar diferents solucions de traçador entre 1/2 i 1/10 (v/v), i d'anticòs entre 1/5000 i 1/50 (v/v).

En primer lloc, l'estudi es va dur a terme utilitzant el traçador 2d-SYM18-1Fl i l'anticòs KLH 2d II, parell utilitzat prèviament en els assaigs ELISA [184].

Per a estudiar el comportament dels immunoreactius en les fases ADS, els assaigs es van dur a terme sense anàlit; és a dir, sense que es produeixi la reacció de competició.

Els assaigs es realitzaren amb i sense fase estacionària mitjançant una vàlvula auxiliar de sis vies, amb la finalitat de comparar el senyal obtingut sense fase estacionària (pic corresponent al traçador, ja que l'Ab a les dissolucions de treball no genera senyal de fluorescència), al qual es va assignar arbitràriament el valor 100%, amb el senyal generat quan es treballa amb la fase estacionària RAM, que ens indica la quantitat de immunocomplex format. Inicialment es va usar la fase estacionària C18, PBS 1x a pH 7,5 com a fase mòbil i un cabal de 0,5 mL/nim, condicions usades en els assaigs anteriors.

A concentracions baixes d'anticòs aquest està en defecte, i per tant, gairebé tot el traçador està en forma lliure retingut en l'interior de la fase

estacionària. A mesura que s'incrementa la concentració d'anticòs augmenta també la quantitat de l'immunocomplex format i, per tant, s'observà un creixement del pic enregistrat. Tal com mostra la Figura 23, la mínima concentració d'anticòs que proporciona un senyal pràcticament equivalent al generat "sense fase estacionària" fou 1/200 (v/v), establint-la com a òptima. Respecte al traçador 2d-SYM18-1FI, el millor senyal s'obtingué a una dilució 1/4 (v/v) . Tant en la Figura 23, com en la resta de figures que es presenten per a l'optimització dels paràmetres de l'immunoassaig, només s'han representat els valors mitjans de les mesures per tal de simplificar-ne la presentació, ja que el que es vol observar és una tendència en els resultats.

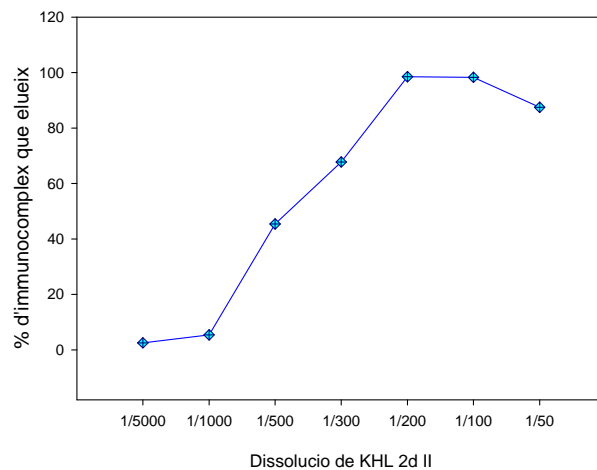


Figura 23 - Percentatge l'immunocomplex que elueix de la fase estacionària ADS C18 a diferents concentracions d'anticòs

Utilitzant les concentracions d'immunoreactius seleccionades, es va

procedir a optimitzar la composició de la fase mòbil i el cabal de treball. A un cabal constant de 0,4 mL/min, es va estudiar l'efecte de la força iònica emprant diferents dilucions de tampó fosfat salí (PBS), de 1x a 5x. Com es veu en la Figura 24a, pràcticament no s'observen diferències en la resposta obtinguda a les diferents concentracions de PBS assajades, encara que el percentatge d'immunocomplex eluït fou lleugerament superior amb PBS 2x i 4x. Es decideix treballar amb el tampó PBS 2x, ja que presenta una concentració de sals més baixa i per tant no provoca tants problemes de sobrepressió en la fase estacionària.

Posteriorment, es van assajar diferents pHs entre 7,5 i 5, mantenint la força iònica constant (PBS 2x). Com s'observa en la Figura 24b, a pH 7 es va assolir el major percentatge d'elució de l'immunocomplex, aproximament el 100%, seleccionar-ho com a òptim pels següents assaigs.

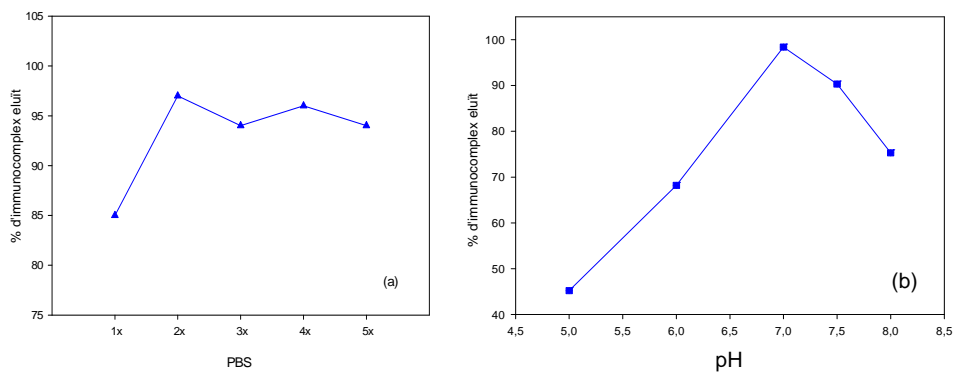


Figura 24 - Percentatge l'immunocomplex que elueix de la fase estacionària ADS C18 a diferent força iònica (a) i pH (b)

Finalment, es va procedir a estudiar la influència de el cabal en l'interval

de 0,1 a 3 mL/min, elegint com a òptim 0,5 mL/min, ja que cabals inferiors produeixen una major dispersió dels pics i temps d'assaigs més llargs, i cabals superiors provoquen un increment de pressió en el sistema i acabar produint fuites. Així doncs, les condicions òptimes de treball del sistema amb la fase estacionària ADS C18 foren:

Fase mòbil	PBS 2x, pH 7
Cabal	0,5 mL/min
Dissolució de traçador (SYM18-2d)	1/4 (v/v)
Dissolució d'anticòs (KHL 2d II)	1/200 (v/v)

En aquestes condicions, la fase estacionària ADS C18 funcionà de forma correcta, retenint el traçador lliure i eluint pràcticament el 100% de l'immunocomplex format.

Després d'establir les condicions d'assaig de la immunoreacció, es van dur a terme assaigs competitiu utilitzant atrazina com anàlit. Com es pot apreciar en la Figura 25, que mostra el registre dels senyals obtinguts amb diferents concentracions d'atrazina, a mesura que disminueix la concentració d'anàlit hi ha una disminució de la reproductibilitat en el senyal.

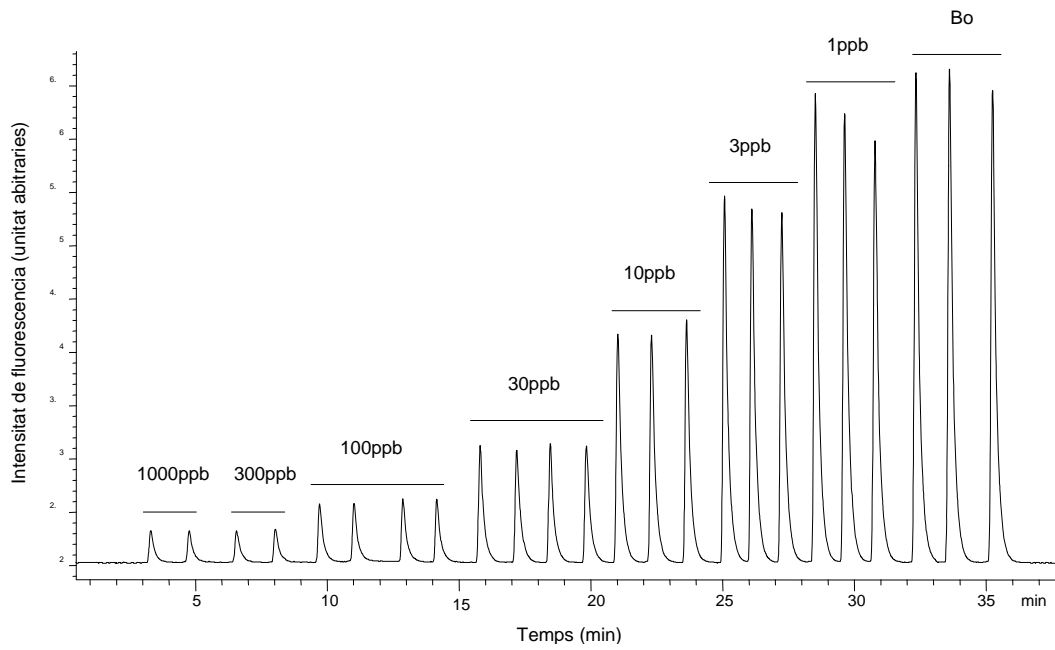


Figura 25 – Registre del calibratge per a l'atrazina utilitzant la fase estacionària ADS C18 (n=6)

Un estudi similar realitzat amb la fase estacionària ADS C4 indicà que les condicions de treball òptimes foren les mateixes que les obtingudes en utilitzar la fase estacionària ADS C18. La Figura 26 mostra les corbes de calibratge obtingudes utilitzant ambdues fases estacionàries (ADS C18 i C4) i, com es pot veure, no existeixen diferències apreciables en l'ús d'una o altra.

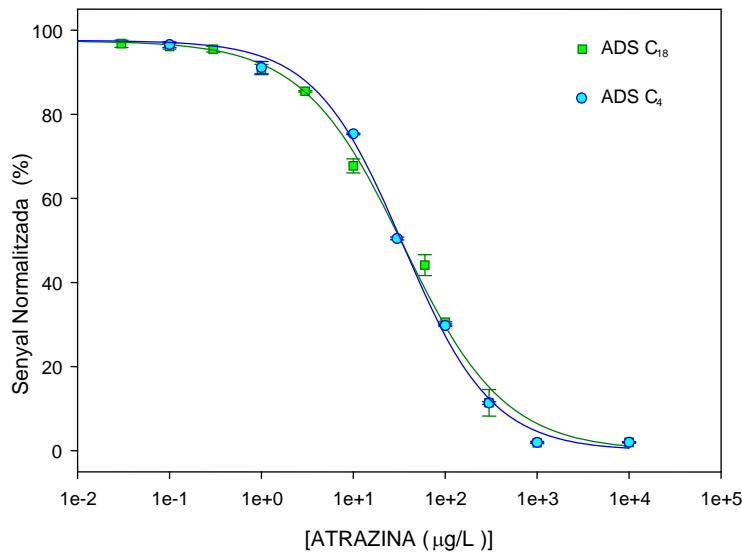


Figura 26 - Corbes de calibratge de l'atrazina obtingudes amb l'immunosensor en les fases estacionàries ADS (n=6)

En la Taula 19 es recullen les característiques analítiques dels assaigs per a l'atrazina en funció del tipus de fase estacionària utilitzada. A pesar de que no existeixen diferències apreciables, la sensibilitat i el rang de treball foren lleugerament millors en utilitzar la fase estacionària ADS C18.

La precisió del mètode, determinada a partir dels resultats obtinguts (n=10) utilitzant un patró d'atrazina de 30 µg/L, fou també major amb la fase estacionària C18. Així, es va seleccionar aquesta com més sensible i robusta.

No obstant això, aquests resultats podien millorar de manera que el sensor desenvolupat pogués ser utilitzat per aigües potables, per a les

quals la U.E. ha establert el valor màxim admissible en 0,1 µg/L.

Taula 19 – Característiques analítiques pel sistema atrazina de l’immunosensor en funció de la fase estacionària RAM

Fase estacionària	IC ₅₀ (µg/L)	LD (µg/L)	Interval de treball (µg/L)	RSD (%)
ADS C18	29,3	1,5	4,2 - 181,1	0,8
ADS C4	32,7	2,2	6,4 - 151,3	1,9

LD: IC₁₀, Interval de treball: IC₂₀ - IC₈₀

En les condicions de treball optimitzades prèviament i donat que es disposava d’una bateria de quatre anticossos, KLH-2d I, KLH-2d II, KLH-2d III, KLH-2d IV, es van dur a terme una sèrie d’assaigs amb la finalitat de seleccionar aquell anticòs que proporcionés les millors prestacions analítiques. Les corbes de calibratge obtingudes amb les dues fases estacionàries assajades, així com les prestacions assolides es mostren en la Figura 27 i la Taula 20, respectivament.

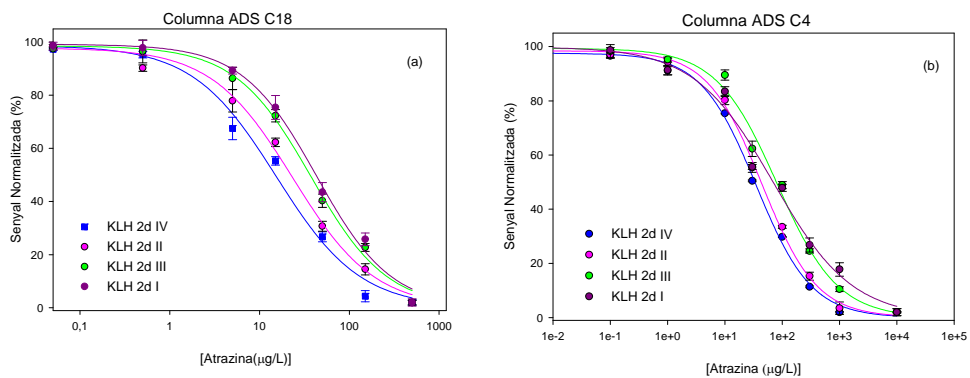


Figura 27 – Corbes de calibratge de l’atrazina obtingudes amb l’immunosensor en funció de l’anticòs utilitzat (n=4)

Amb independència de la fase estacionària RAM utilitzada, la major sensibilitat (menor valor de IC_{50}) s'assoleix amb l'anticòs KLH 2d-IV. Quan s'utilitzen els anticossos KLH-2d IV i KHL-2d II, s'aconsegueixen uns valors de LD i IC_{50} inferiors amb la fase estacionària ADS C18 que amb la ADS C4. En comparar els millors resultats amb les dues fases s'observa que, mentre que amb la fase estacionària ADS C18 s'aconsegueix un valor de IC_{50} de 14,5 $\mu\text{g/L}$, amb la fase estacionària ADS C4 aquest valor és gairebé el doble (31,78 $\mu\text{g/L}$) amb la qual cosa es produeix una disminució significativa de la sensibilitat.

Taula 20 - Característiques analítiques pel sistema atrazina amb immunosensor utilitzant diferents anticossos

Fase estacionària	IC_{50} ($\mu\text{g/L}$)	LD ($\mu\text{g/L}$)	Interval de treball ($\mu\text{g/L}$)	RSD (%)
ADS C18				
KLH 2d-I	40,5	4,7	10,6 – 153,7	1,2
KLH 2d-II	29,3	1,5	4,2 – 181,1	1,8
KLH 2d-III	36,6	3,4	8,7 – 138,8	1,3
KLH 2d-IV	14,5	1,2	3,1 – 64,3	2,6
ADS C4				
KLH 2d-I	66,1	2,1	7,6 – 604,7	1,4
KLH 2d-II	32,7	2,20	6,4- 151,3	1,9
KLH 2d-III	77,7	4,2	13,8 – 414,1	1,6
KLH 2d-IV	31,8	2,2	6,4 – 151,7	1,8

Així doncs, i a la vista del resultats obtinguts amb els diferents anticossos i fases estacionàries ADS estudiades, es seleccionà com a òptim l'anticòs KHL 2d IV i la fase ADS C18.

4.2.1.1 Influència de dissolvents orgànics

Per poder aplicar un mètode immunoquímic a l'anàlisi de residus de plaguicides, aquests han de presentar certes propietats com ser hidrofílics, no volàtils i estables en aigua. Apareixen, per tant, certs inconvenients derivats de la baixa solubilitat d'aquestes substàncies. La determinació de concentracions de l'ordre de $\mu\text{g/L}$ de compostos més lipofílics, com alguns dels plaguicides més utilitzats i, a més, en matrius complexes, requereixen aplicar etapes d'extracció, neteja i preconcentració. Aquest fet implica, generalment, treballar amb dissolvents orgànics com metanol, acetonitril, acetona o hexà, entre altres. Així doncs, si l'extracte de la mostra a analitzar s'obté amb un percentatge de dissolvent orgànic, és molt important estudiar la influència d'aquests dissolvents en l'immunoassaig.

Els dissolvents orgànics es classifiquen, generalment, per una sèrie de propietats físico-químiques (punts d'ebullició, pressió de vapor, calor de vaporització, índex de refracció, viscositat, densitat, tensió superficial, constant dielèctrica, polaritzabilitat, conductivitat específica, etc). Una de les escales més utilitzades per a la classificació dels dissolvents és la sèrie eluotròpica d'ús freqüent en cromatografia i processos de separació, encara que n'hi ha d'altres. Així, Gramitic i col. [194] proposen una classificació general dels dissolvents orgànics basada en descriptors moleculars en lloc de propietats físico-químiques. Utilitzant eines quimiomètriques elaboren una classificació general aplicada a dissolvents, obtenint models de regressió capaços de predir les seves propietats físico-

químiques. Les escales uniparamètriques estan basades en un sol paràmetre; generalment la polaritat. El valor de ET (paràmetre de Reichardt) definit com un paràmetre de polaritat és el més utilitzat. En contrast, les aproximacions multiparamètriques associen cada classe d'interacció solut-dissolvent amb un paràmetre independent. Aquests paràmetres depenen de l'acidesa de l'enllaç d'hidrogen (α), la basicitat de l'enllaç d'hidrogen (β) i la polaritzabilitat (π^*). Molts estudis han demostrat una relació entre dos grups de paràmetres en dissolvents purs i mescles. En la Taula 21 s'indiquen els paràmetres solvatocròmics per alguns dels dissolvents orgànics més utilitzats [195]. En base a aquests paràmetres, els dissolvents a estudiar foren: acetonitril, que s'inclou en el grup de dissolvents polars apròtics, relativament bàsic i moderadament polar; i 2-propanol i metanol, que pertanyen al grup format per dissolvents anfipròtics (alcohols i aigua) amb marcades propietats per a formar ponts d'hidrogen.

Taula 21 - Paràmetres solvatocròmics per alguns dissolvents orgànics

Dissolvent	α	β	π^*
Èter dietílic	0,00	0,55	0,58
Tetrahidrofura	0,00	0,55	0,58
Acetona	0,08	0,48	0,74
Acetat d'etil	0,00	0,45	0,55
Nitrobenzè	0,00	0,39	1,01
Acetonitril	0,19	0,55	0,58
Tetraclorur de carboni	0,00	0,00	0,28
Cloroform	0,44	0,00	0,58
2-propanol	0,76	0,95	0,48
Metanol	0,93	0,62	0,60
Aigua	1,17	0,18	1,09

Així doncs, la utilització de dissolvents orgànics en el tractament, concentració i neteja de mostres fa necessari l'estudi de la influència i el comportament dels immunoreactius en aquests medis. El principal avantatge pràctic de la tolerància dels immunoreactius als solvents orgànics és que aquests no hauran d'eliminar-se abans de l'assaig, disminuint així el nombre d'etapes del procés i, per tant, els errors associats i la durada de l'assaig. Aquest fet permetrà dur a terme determinacions amb un temps d'anàlisi més curt i fàcilment aplicable en línia.

Els solvents orgànics afecten tant a l'estabilitat de l'oligonucleòtid com a l'activitat de l'anticòs. Les conseqüències són canvis reversibles i irrevocables de conformació de l'anticòs, i modificacions en les energies lliures de les molècules [194].

La capacitat dels dissolvents orgànics d'interferir amb les propietats fisicoquímiques de les proteïnes és força coneguda gràcies a les investigacions sobre el comportament dels anticossos (Ab) en medis orgànics [202]. En els assaigs de transferència de fase, els anticossos romanen en el medi aquós mentre que l'antigen es troba en la fase orgànica i és en la interfase on transcorren les reaccions immunoquímiques.

Els canvis en la hidrofobicitat dels dissolvents, constant dielèctrica i contingut en aigua del medi de reacció poden afectar a la capacitat de reconeixement de l'anticòs, que altera invariablement la seva especificitat i reactivitat [203], així com la capacitat del dissolvent de desplaçar la capa

d'aigua que rodeja l'haptè i l'anticòs [204]. El fet de que els Abs puguin retenir la seva activitat en dissolvents orgànics, fa possible realitzar els anàlisis directes dels extractes obtinguts en aquest medis. A més, la possibilitat d'utilitzar Abs en un sistema aquós-orgànic eliminarà l'etapa d'evaporació del dissolvent, disminuint els possibles problemes de contaminació, degradació, etc, la qual cosa farà més versàtil aquest tipus d'assaigs. Així doncs, l'afinitat de l'anticòs està relacionada amb la polaritat del dissolvent i la solubilitat de l'haptè en el propi dissolvent [200].

Per altra part, la presència de dissolvents orgànics pot afectar a l'estabilitat de l'oligonucleòtid utilitzat durant la síntesi del traçador. No obstant això, en el protocol de purificació desenvolupat s'utilitzen mescles aquoses de dissolvent, ja s'ha demostrat que els oligonucleòtids poden tolerar percentatges de dissolvents orgànics en la fase mòbil fins al 20%.

Estudis duts a terme sobre la influència dels dissolvents orgànics en els immunoassaigs desenvolupats en placa ELISA [201] indiquen que en rares ocasions es poden sobrepassar concentracions de dissolvents miscibles amb els reactius aquosos de treball superiors al 10% (v/v). En general, la sensibilitat que arriba en medi orgànic és menor, però aquesta pot estar compensada per la preconcentració de l'anàlit en el propi dissolvent.

En el cas de l'immunosensor H-H, la utilització de dissolvents orgànics també pot afectar a les característiques del suport RAM. La bibliografia [148] recull diferents estudis en què es demostra que quan s'usen percentatges elevats de dissolvents orgànics en la fase mòbil, en matrius

que contenen grans quantitats de proteïnes (per exemple, plasma, sang o orina) es produeix la precipitació d'aquestes en l'interior del suport. Aquest fet provoca la seva absorció en la fase estacionària la qual cosa produeix canvis en el temps de retenció, augment de la pressió i disminució de la capacitat de la fase estacionària. Per això és recomanable no usar percentatges de dissolvents orgànics superiors al 20% en la fase mòbil.

Així doncs, resulta necessari conèixer el comportament de tot el sistema immunoquímic en aquests medis orgànics.

En el sistema proposat en aquesta tesi el modificador orgànic no està en la fase mòbil, sinó en la dissolució de la mostra que s'injecta en la fase estacionària. Per tant, es realitzaren diversos assaigs utilitzant diferents percentatges (0-80%) de metanol, acetonitril i 2-propanol, i les fases estacionàries ADS C18 i C4.

Primerament, es va determinar el percentatge de retenció del traçador dins la fase estacionària en funció del dissolvent utilitzat (sense l'addició de dissolvent era del 100%). Es va observar que, donat el canvi de polaritat que provoca l'addició de dissolvents, es produïa l'elució progressiva del traçador a mesura que augmentava la concentració de dissolvent (Figura 28a).

En comparar el efecte del tipus de dissolvent es va observar que l'acetonitril provoca un major percentatge d'elució del traçador, inclús a concentracions inferiors. Percentatges del 80% d'acetonitril provocaren l'elució del 78% del traçador. No obstant això, quan s'usà 2-propanol o

metanol al mateix percentatge, la retenció del traçador fou major, produint-se una elució del 19% i 17%, respectivament. En comparar els resultats aconseguits amb les dues fases estacionàries en presència de 2-propanol i metanol, s'observà que el comportament fou pràcticament igual en els dos suports, mentre que en presència d'acetonitril l'elució del traçador és major en la fase estacionària ADS C4.

A continuació es va estudiar el comportament de l'immunocomplex en aquests medis i s'observà que si aquest manté la seva estructura elueix de la fase estacionària, però si hi ha un trencament de l'immunocomplex anticòs-traçador, el primer queda retingut en l'interior del suport i, per tant, hi ha una disminució del senyal. Aquesta disminució fou proporcional a la quantitat d'immunocomplex fragmentat. La ruptura de l'immunocomplex ve donada pel percentatge i tipus de dissolvent orgànic utilitzat.

En el comportament de l'immunocomplex no s'observen diferències apreciables quan s'utilitza la fase estacionària ADS C18 o la C4.

Quan es va utilitzar acetonitril al 20% el senyal disminuí fins a un 50% (percentatge que correspon a la quantitat de l'immunocomplex fraccionat). Mentre que quan el dissolvent fou el 2-propanol o metanol el percentatge d'immunocomplex que eluí, fou del 84% i 91%, respectivament. Aquest fet indica que el fraccionament és menor, i s'estima una disminució d'un 16% pel 2-propanol i 9% per metanol (Figura 28b).

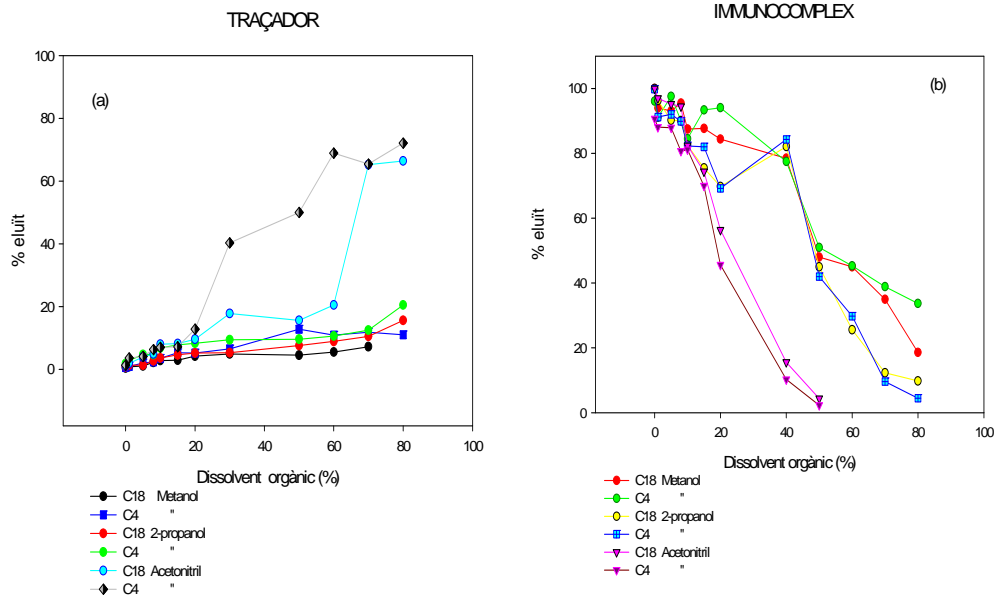


Figura 28 - Influència del dissolvent orgànic en l'immunoassaig utilitzant les fases estacionàries ADS. (a) Percentatge de traçador que elueix (b) Percentatge de immunocomplex que elueix

En resum, dels tres dissolvents assajats, l'acetonitril és el menys tolerat, mentre que el comportament és similar quan s'usa 2-propanol i metanol. Així doncs, els dissolvents que es poden emprar en l'immunoassaig són el metanol i el 2-propanol, establint 40% com a percentatge màxim de dissolvent tolerable, ja que tant la quantitat de traçador que queda retinguda en la fase estacionària com la quantitat d'immunocomplex que elueix és superior al 80%.

Finalment, es va procedir a estudiar l'efecte dels dissolvents orgànics en el funcionament global de l'immunosensor H-H, utilitzant el sistema model

atrazina. Per això es van realitzar un seguit de corbes de calibratge amb els tres dissolvents (15%) i amb les dues fases estacionàries assajades (Figura 29) i s'observà que la competició té lloc en tots els casos.

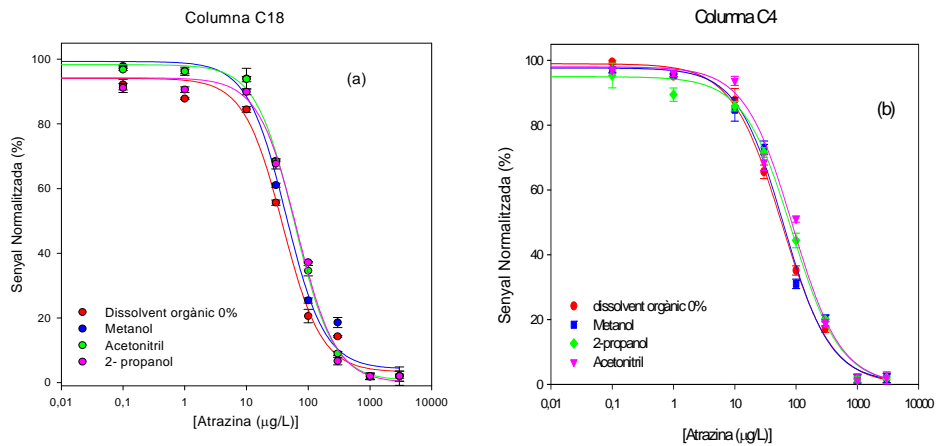


Figura 29 – Corbes de calibratge de l'atrazina en presència de dissolvent orgànic (15%) (n=4)

La Taula 22 mostra les característiques analítiques dels assaigs realitzats en els diferents medis orgànics assajats (15%) en comparació amb les establertes en medi aquós. S'observa que, en tots els casos, els valors de IC_{50} i LD són més elevats en medi orgànic, la qual cosa provoca una pèrdua de sensibilitat en l'immunoassaig amb independència de la fase estacionària RAM utilitzada.

La major sensibilitat (valors de IC_{50} i LD inferiors) s'aconsegueix a l'utilitzar metanol. Amb la fase estacionària ADS C18 i utilitzant qualsevol dels tres dissolvents els valors de IC_{50} foren inferiors als assolits amb la fase estacionària ADS C4.

Taula 22 - Característiques analítiques pel sistema atrazina de l'immunosensor en medi orgànic

Fase estacionària	IC ₅₀ (µg/L)	LD (µg/L)	Interval de treball (µg/L)	RSD (%)
ADS C18				
0 % dissolvent orgànic	14,5	1,2	3,1-64,3	2,6
15 % Acetonitril	48,8	7,7	19,9-158,2	3,5
15 % 2-propanol	58,5	9,7	15,9-167,0	1,6
15 % Metanol	42,9	4,7	16,6-132,1	2,4
ADS C4				
0 % dissolvent orgànic	31,8	2,2	6,4-151,7	1,8
15 % Acetonitril	77,0	8,9	15,9-207,2	3,5
15 % Metanol	58,2	5,9	18,2-283,7	2,8
15 % 2-propanol	84,2	9,7	21,8-296,3	2,1

A la vista dels resultats obtinguts, es va plantejar realitzar un nou calibratge amb 40% de dissolvent orgànic, percentatge màxim que tolera l'immunoassaig. Cal recordar que el dissolvent orgànic es troba en la dissolució on es produeix la immunoreacció i no en la fase mòbil; per tant, en injectar la dissolució en la fase estacionària hi ha una dilució en la fase mòbil (PBS 2x). Tal com mostra la Figura 30, a aquest percentatge de dissolvent solament s'observà competició quan s'usà metanol.

La Taula 23 mostra les prestacions obtingudes en usar metanol al 40%. Com es pot apreciar, i tal i com passava amb el 15% de dissolvent orgànic, hi ha una pèrdua de sensibilitat, però aquesta pèrdua es gairebé la mateixa en augmentar el percentatge de dissolvent del 15 al 40%. Els valors de IC₅₀ aconseguits amb la fase estacionària C18 foren 42,9 i 54,2 µg/L per al 15% i 40%, respectivament.

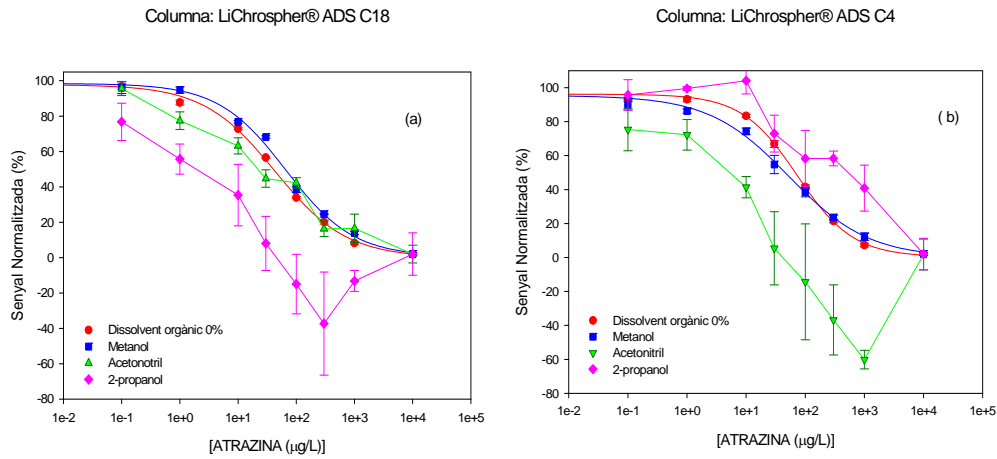


Figura 30 - Corbes de calibratge de l'atrazina amb l'immunosensor en presència de dissolvent orgànic al 40% ((n=4)

Taula 23 – Característiques analítiques pel sistema atrazina amb l'immunosensor utilitzant dissolvent orgànic al 40%

Fase estacionària	IC ₅₀ (µg/L)	LD (µg/L)	Interval de treball (µg/L)	RSD (%)
ADS C18				
0% dissolvent orgànic	14,5	1,2	3,1-64,3	2,6
40% metanol	54,2	2,4	8,6-294,2	11,3
ADS C4				
0% dissolvent orgànic	31,8	2,2	6,4 – 151,7	1,8
40% metanol	62,6	2,7	9,0 – 414,1	12,3

En resum, les condicions òptimes per a l'immunoassaig utilitzant els suports ADS són:

Suport	ADS C18
Fase mòbil	PBS 2x, pH 7
Cabal	0,5 mL/min
Volum de mostra	20 µL
Dissolvent	Metanol fins a un 40% (v/v) (quan sigui necessari)
Traçador	SYM18-2d, Dilució 1/4 (v/v)
Anticòs	KHL 2d IV, Dilució 1/200 (v/v)

Així doncs, i a la vista dels resultats, quan s'utilitzen dissolvents orgànics en l'immunoassaig, hi ha una disminució de la sensibilitat, assolint valors de IC_{50} tres i quatre vegades superiors en 15% i 40% de metanol, respectivament, que quan es treballa en absència de dissolvents. Per tant, la metodologia desenvolupada es útil per a aigües de rec i d'EDAR. Si es vol obtenir una major sensibilitat i estendre el mètode a aigües potables es podrà incloure una etapa prèvia de preconcentració.

4.2.2 Fases estacionàries ISRP i SPS

Com s'ha descrit en la bibliografia, les fases estacionàries SPS i ISRP es van usar en estudis similars als de les fases estacionàries ADS C4 i C18, per la determinació de drogues, fàrmacs, hormones en sang, plaguicides en sòls, entre altres. Locascio-Brown i col. [33] en un treball en el que comparen diferents suports RAM per a la determinació de fenitoina en sèrum mitjançant immunoassaig, indiquen que la fase estacionària IRSP fou la

que proporcionà millor resultats.

4.2.2.1 Fase estacionària ISRP

El comportament de la fase estacionària ISRP s'estudià seguint un esquema similar al descrit per a les fases ADS. Donat que la reacció immunoquímica es duu a terme en dissolució, les primeres variables estudiades foren la composició de la fase mòbil (tipus de tampó, força iònica i pH) i la concentració de reactius. Inicialment els assaigs es van realitzar amb les condicions dels immunoreactius optimitzades previament (l'apartat 4.2.1.1): una dilució 1/4 (v/v) del traçador SYM18-2d i 1/200 (v/v) de l'anticòs KHL 2d IV.

Per a assajar el comportament del traçador es va utilitzar un cabal de 0,5 mL/min i diferents concentracions de fase mòbil (PBS 0,5x, 2x, 4x, 5x). En tots els casos el traçador quedava retingut totalment en l'interior de la fase estacionària. No obstant això, quan els assaigs es van dur a terme amb la mescla anticòs i traçador no s'observà cap senyal, la qual cosa indicava que l'immunocomplex format també quedava retingut en l'interior del suport, independentment de la força iònica i del pH.

Per aquesta raó, es va estudiar l'efecte de l'addició de modificadors orgànics (metanol, acetonitril i 2-propanol) en la fase mòbil a dues concentracions, 5 i 20%.

Com mostra la Figura 31, en canviar la polaritat de la fase mòbil varia el percentatge de retenció del traçador. Amb independència de la concentració de PBS, quan s'utilitzà una fase mòbil amb un 5% de

modificador orgànic (Figura 31a) la retenció del traçador fou superior al 98%, excepte en el cas d'utilitzar PBS 5x, i 5% acetonitril, on s'observà una retenció inferior (86%).

Al augmentar el percentatge de dissolvent orgànic en la fase mòbil fins al 20% (Figura 31 b), el comportament va ser diferent. Amb 20% d'acetonitril el percentatge d'elució del traçador fou superior al 50%, en tots els assaigs. En altres dissolvents i fins a una concentració de fase mòbil de PBS 2X el percentatge de traçador retingut en la fase estacionària fou superior al 80% però a partir d'aquest valor, en augmentar la força iònica també ho feia el percentatge d'elució fins a un 85 i 96% en metanol i 2-propanol, respectivament.

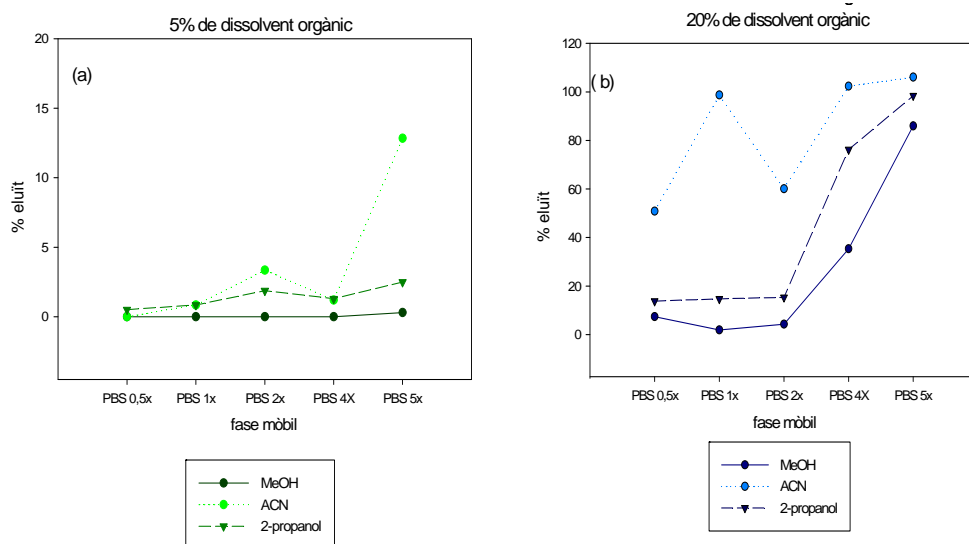


Figura 31 – Influència del percentatge de modificador orgànic en la retenció del traçador en la fase ISRP amb dissolvent orgànic al 5%(a) i 20% (b)

Seguidament, es va estudiar el comportament de l'immunocomplex en els tres dissolvents orgànics, en funció de la força iònica (PBS entre 0,5x a 5x) i la concentració d'anticòs. Tot hi que, inicialment es treballà amb una dilució 1/200 (v/v), es van dur a terme diferents assaigs amb dilucions entre 1/50 i 1/500 (v/v).

Al estudiar la influència del percentatge de modificador orgànic en la retenció de l'immunocomplex (Figura 32), el comportament fou diferent en funció de la concentració i el tipus de dissolvent.

Per a percentatges del 5%, l'elució de l'immunocomplex fou inferior al 30% en tots els casos, la qual cosa indicava que aquestes condicions no són útils per a l'assaig ja que no es discrimina entre l'immunocomplex i el traçador lliure, que queden retinguts en la fase estacionària amb el mateix percentatge. Per a percentatges de dissolvent més elevats (fins al 20%), el comportament varia en funció del dissolvent. En metanol, amb independència de la concentració salina i de l'anticòs, l'elució de l'immunocomplex fou inferior al 50% en tots els casos (Figura 32a). En utilitzar acetonitril, la resposta fou diferent en funció de la força iònica del medi. A PBS 2x es produeix una elució al voltant del 100%, mentre que a PBS 4x es va observar una gran variabilitat en elució de l'immunocomplex, que va des de 50,7% (en una dilució d'anticòs 1/50 (v/v)) a 194,4% (a dilució de 1/200 (v/v)) (Figura 32b). Finalment, amb 2-propanol al 20% la retenció de l'immunocomplex augmenta (Figura 46c) a mesura que disminueix la força iònica.

En resum, les condicions que produeixen un major percentatge d'elució de l'immunocomplex i una retenció total del traçador foren les establertes com òptimes per a realitzar l'assaig, seleccionar-se PBS 1x en 20% de 2-propanol, ja que en aquestes condicions l'immunocomplex elueix en un 98% (Figura 32a) mentre que el traçador quedava retingut en un 82% (Figura 31).

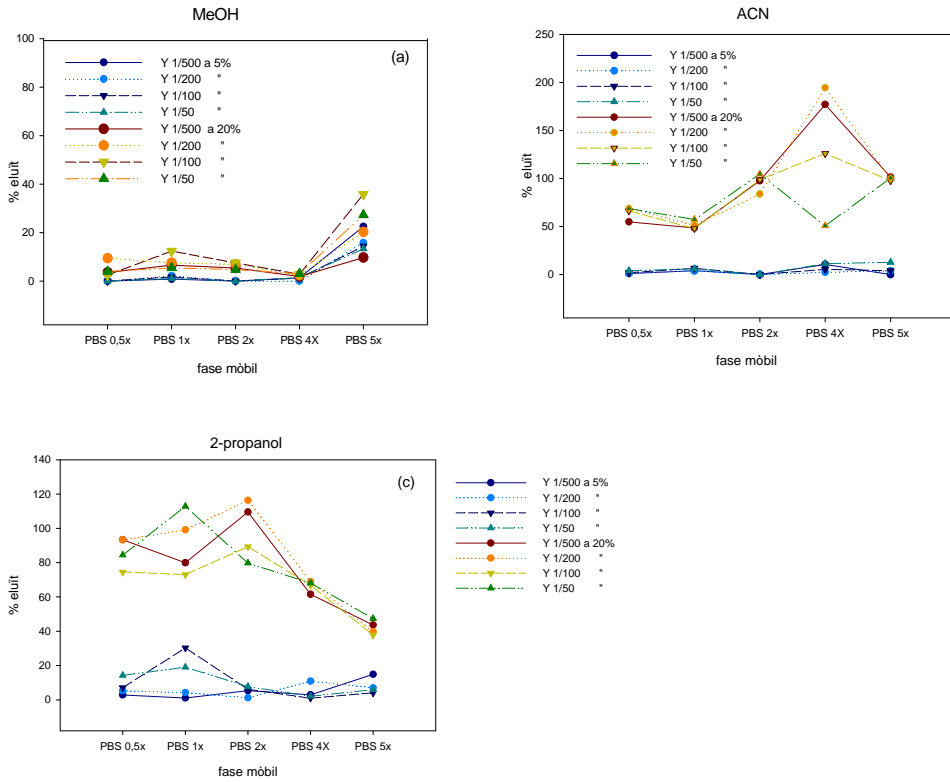


Figura 32 - Percentatge d' immunocomplex que elueix de la fase estacionària ISRP en addicionar dissolvent orgànic

Els assaigs de competició per a l'atrazina duts a terme en les condicions

optimitzades (Figura 33) indicaren que la fase estacionària ISRP produïa una separació cromatogràfica del traçador no retingut i de l'immunocomplex format, que elueixen a diferent temps de retenció. Aquest fet provoca un senyal més complex, ja que hi ha un solapament de pics, i un temps d'assaig superior (4,5 min) a l'aconseguit amb les fases estacionàries ADS C18 i C4 (2 min).

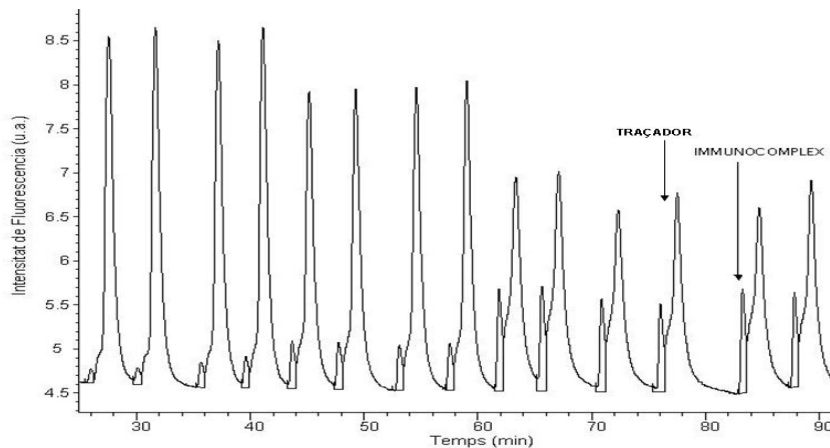


Figura 33 – Registre del calibratge d'atrazina utilitzant la fase estacionària ISRP ($n=6$)

La corba de calibratge obtinguda en les condicions optimitzades mostrà que la competició tenia lloc (Figura 34). S'observà que la sensibilitat era inclús superior (IC_{50} 10,23 $\mu\text{g/L}$ i LD 0,65 $\mu\text{g/L}$) a l'assolida amb les fases estacionàries ADS (IC_{50} 14,5 $\mu\text{g/L}$ i LD 1,2 $\mu\text{g/L}$ en la fase estacionària C18). No obstant això, l'interval de treball fou inferior (2,1-44,9 $\mu\text{g/L}$) i els valors de RSD superiors (36,8 %) als obtinguts en les fases estacionàries ADS (2,3 %), i per tant menys reproducible. Aquest fet podria estar associat amb la complexitat del senyal obtingut i amb el solapament dels pics.

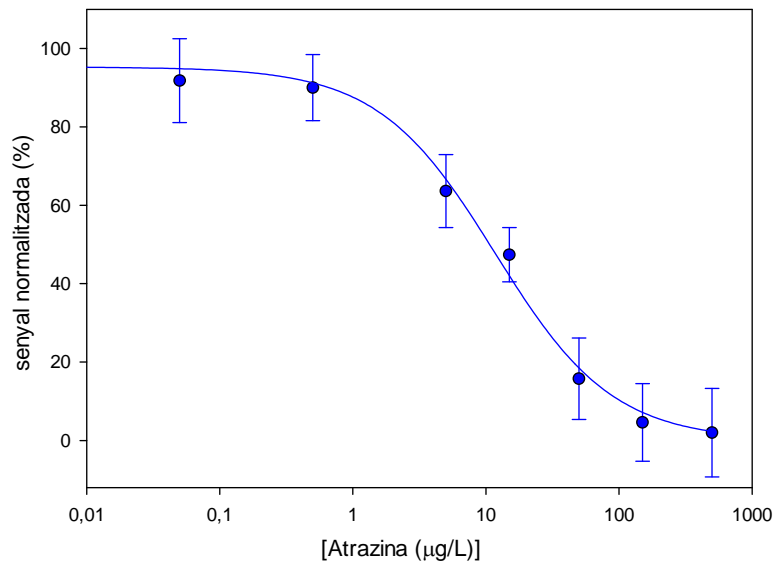


Figura 34 - Corba de calibratge de l'atrazina amb l'immunosensor en la fase estacionària ISRP (n=6)

Finalment, s'ha de tenir en compte el temps d'assaig, paràmetre molt significatiu per a elegir el tipus de fase estacionària a utilitzar en l'immunosensor H-H. Aquest ha de ser el més curt possible per tal d'obtenir una elevada freqüència de mostreig i poder realitzar lectures *on line*.

Mentre que amb la fases estacionàries ISRP es requereixen 5 min per a realitzar una mesura, amb les ADS la mesura es pot dur a terme tant sols en 2 min.

Tot i que s'ha aconseguit una millor sensibilitat, no s'assoleix la requerida per a aplicar directament la metodologia desenvolupada a la determinació d'atrazina en aigües potables. Amb la fase estacionària IRSP el senyal

cromatogràfic aconseguït fou més complexa, amb solapament dels pics, el que implicà menor reproductibilitat i temps d'assaig més llargs. Cal destacar que l'interval de treball en la columna ADS és més ampli. Aquest fet permet realitzar dilucions en les mostres i per tant eliminar o disminuir l'efecte matriu, el què suposa una avantatge important front els sistemes amb rang dinàmic estret. Per tant es va descartar el suport IRSP com a fase estacionària òptima en l'immunoassaig.

4.2.2.2 Fase estacionària SPS

Finalment es va realitzar un estudi similar als anteriors utilitzant una fase estacionària SPS. Tal i com s'ha descrit en l'apartat 1.5.2., els suports SPS estan constituïts per dues superfícies, una hidròfila exterior i una hidròfoba interna, en aquests cas C_8 . El mecanisme de retenció d'aquestes fases implica la formació de ponts d'hidrogen en la fase externa i una interacció hidròfoba en la fase interna.

En primer lloc, utilitzant un cabal de 0,5 mL/min, s'estudià la influència de la concentració de PBS entre 0,5x a 5x en la fase mòbil mantenint el pH a 7, en el comportament del traçador i de l'immunocomplex. En quan a concentració d'immunoreactius inicialment s'elegí com a dilució del traçador l'optimitzada en les columnes ADS (1/4 (v/v)) i s'optimitzà la concentració d'anticòs.

Els assaigs realitzats es mostren en la Figura 35. En absència de modificador orgànic en la fase mòbil, el traçador queda totalment retingut en l'interior de la fase estacionària, mentre que

l'immunocomplex no elueix al 100%. En el millor dels casos (PBS 0,5x i una dilució de Ab 1/100 (v/v), l'elució era tant sols d'un 52,3 %.

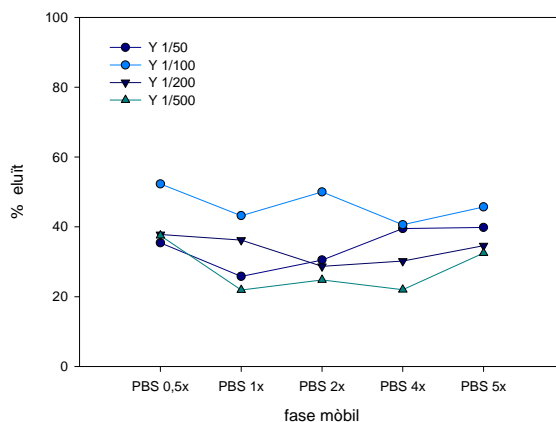


Figura 35 – Percentatge de l'elució de l'immunocomplex en la fase estacionària SPS

Per tant, i com en el cas de la fase estacionària IRSP, es van dur a terme una sèrie d'assaigs afegint en la fase mòbil diferents dissolvents orgànics (metanol, 2-propanol i acetonitril) al 5 i 20%, per a comprovar el percentatge de retenció de les dues espècies, traçador i immunocomplex. La Figura 36 mostra el comportament del traçador amb l'addició de modificador orgànic a la fase mòbil amb diferent força iònica. En presència de metanol i amb independència del percentatge d'aquest (5% o 20%), la fracció del traçador retingut en la fase estacionària disminueix a mesura que augmenta la força iònica.

No va succeir el mateix quan el dissolvent afegit fou acetonitril o 2-propanol. A baixos percentatges de dissolvent (5%), l'elució del traçador fou superior al 50%, excepte per a 2-propanol en PBS 2x que fou del 37%.

En augmentar el percentatge del dissolvents al 20%, l'elució del traçador fou pràcticament total (100%) en tots els casos.

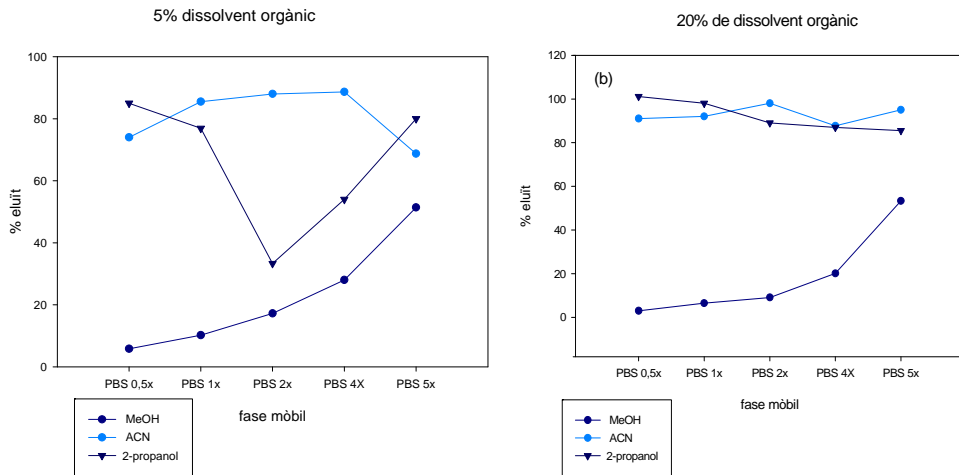


Figura 36 – Percentatge de l'elució del traçador en la fase estacionària SPS en funció del dissolvent orgànic i la proporció de la fase mòbil

Seguidament, es realitzaren diferents assaigs per a estudiar el comportament de l'immunocomplex variant la força iònica (PBS de 0,5x a 5x) i la concentració d'anticòs (entre 1/50 i 1/500 (v/v)), amb els tres dissolvents orgànics estudiats.

El comportament fou pràcticament el mateix pel als tres dissolvents amb independència del percentatge utilitzat (5% i 20%). En tots els casos, l'elució de l'immunocomplex fou superior al 75%. En metanol, l'elució oscil·là entre el 80 i el 105%, per a tots els assaigs realitzats a diferent força iònica, concentració d'anticòs i percentatges de dissolvent orgànic utilitzat (Figura 37a). En utilitzar acetonitril, especialment al 5% i amb PBS

0,5x, s'observà una gran variabilitat en l'elució de l'immunocomplex en funció de la dilució de l'anticòs, oscil·lant entre el 78% i 137% (Figura 37b). En l'assaig amb 2-propanol els resultats també foren força variables i a PBS 4x, l'elució de l'immunocomplex oscil·là entre el 84% i 157% (Figura 37c). Donat que a PBS 0,5x hi ha més dispersió en els resultats, i a baixes dilucions de l'anticòs el percentatge d'elució s'apropa al 80%, se seleccionà com a fase mòbil òptima la formada per PBS 1x (per a evitar la possible sobrepressió del sistema) i 5% de metanol.

En relació a la dilució d'anticòs, en les condicions òptimes de fase mòbil, no existeixen diferències significatives quan s'usà entre 1/50 i 1/200, seleccionant 1/200 pel menor consum d'immunoreactius en cada assaig.

En les condicions seleccionades es va assolir un major percentatge de retenció del traçador (91%), així com d'elució d'immunocomplex (98%).

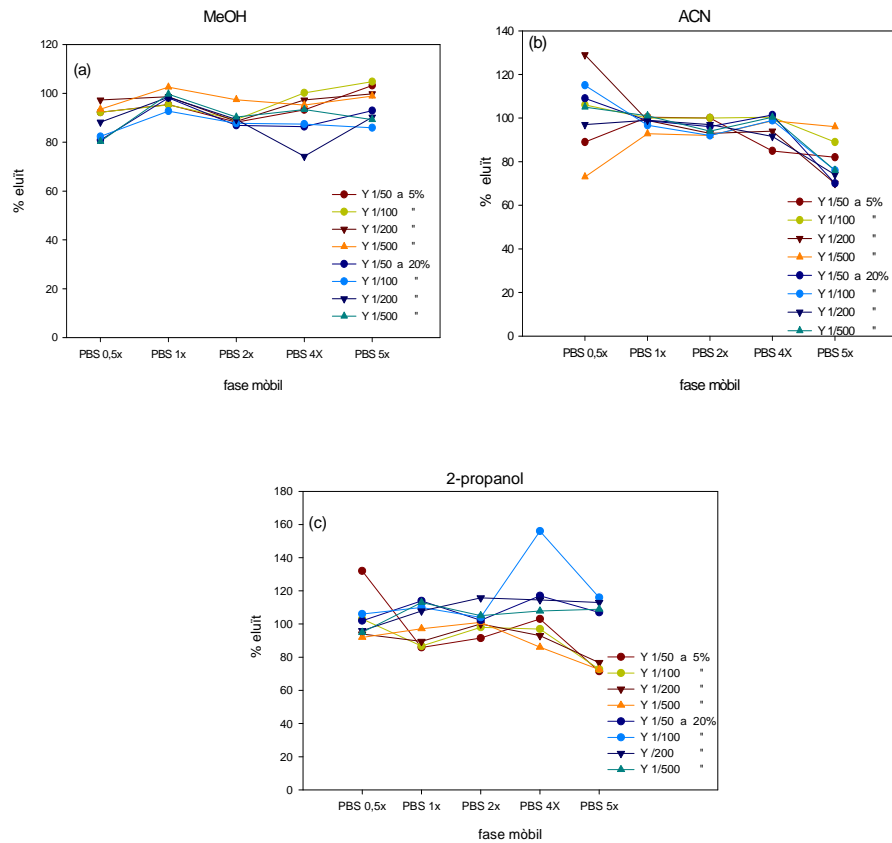


Figura 37 - Percentatge d'elució de l'immunocomplex en presència de dissolvents orgànics en funció de l'anticòs en la fase estacionària SPS

En les condicions òptimes (PBS 1x, 5% MeOH, dilucions 1/4 (v/v) de SYM18-2d i 1/500 (v/v) de KHL 2d IV) es van dur a terme els assaigs de competició, utilitzant com a anàlit atrazina. Igual que amb la fase estacionària IRSP, es produeix la separació del traçador que no és retingut i de l'immunocomplex (Figura 38). El pic de l'immunocomplex apareix a un temps de retenció de 1,3 min, mentre que el traçador ho fa a un tr de 3,5 min. A partir de la corba de calibratge representada en la Figura 39, pot

deduir-se que la sensibilitat de l'assaig fou major (IC_{50} 16,69 $\mu\text{g/L}$ i LD 0,01 $\mu\text{g/L}$) a l'aconseguida amb les fases estacionàries ADS, encara que com succeïa amb el suport IRSP l'interval de treball fou inferior (1,9–92,2 $\mu\text{g/L}$) i la precisió (RSD (%)) superior.

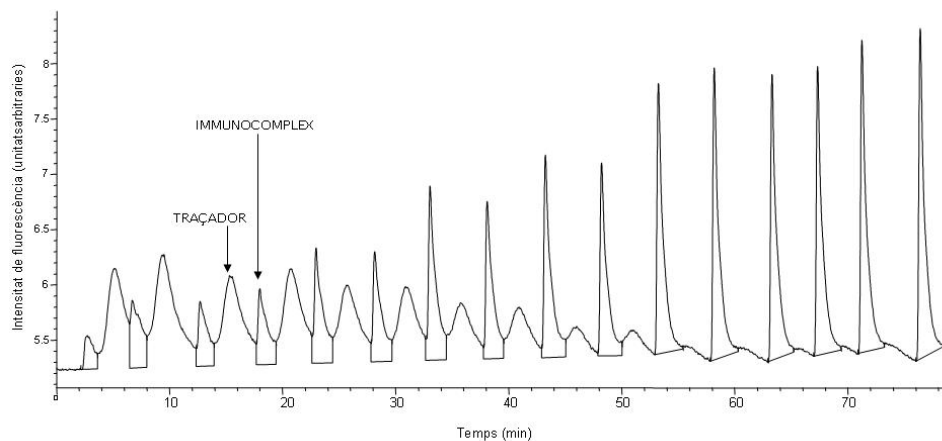


Figura 38 - Registre de calibratge de l'atrazina utilitzant la fase estacionària SPS (n=6)

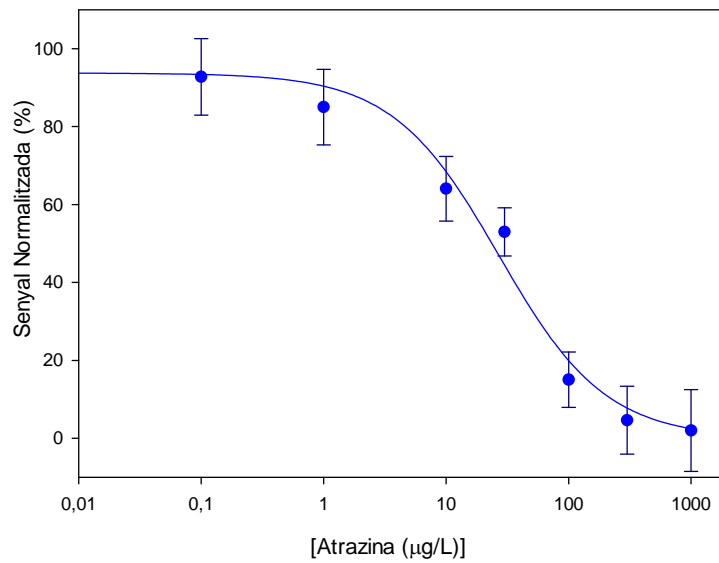


Figura 39 - Corba de calibratge de l'atrazina amb l'immunosensor amb la fase estacionària SPS

Pel que fa al temps d'assaig, en la fase estacionària SPS fou de 4 min, el doble al requerit en utilitzar les columnes ADS (2 min).

Tal i com passava amb la fase estacionària ISRP, tot i que amb la SPS es va aconseguir una millor sensibilitat, en el suport ADS C18 la reproductibilitat i el temps d'assaigs eren inferiors i el rang de treball era superior, la qual cosa possibilitava realitzar dilucions de la mostra per a eliminar o disminuir l'efecte matriu. Tots els assaigs realitzats ens van permetre triar com a òptima la fase estacionària ADS C18.

4.2.3 Influència del volum d'injecció de les fases estacionàries ADS

D'acord amb els resultats obtinguts amb les diferents fases estacionàries estudiades i un cop seleccionada la fase estacionària ADS C18 com la més adequada per al desenvolupament de l'immunosensor, es va procedir a assajar la influència del volum d'injecció en la sensibilitat.

La Figura 40 mostra les corbes de calibratge obtingudes per a l'atrazina utilitzant diferents volums de mostra (20, 50 i 200 µL). Com pot observar-se en la Taula 24, pràcticament no existeixen diferències en els valors de IC₅₀ i de l'interval de treball en funció del volum d'injecció. No obstant això, a mesura que s'incrementà el volum de mostra es produí un augment del LD i una disminució de la reproductibilitat. La capacitat de la fase estacionària no disminuï en incrementar el volum d'injecció de la mostra, però tampoc es produí un augment de sensibilitat. Així doncs, es seleccionà 20 µL com a volum d'injecció òptim, que a més presentava la avantatge de requerir un menor consum de reactius.

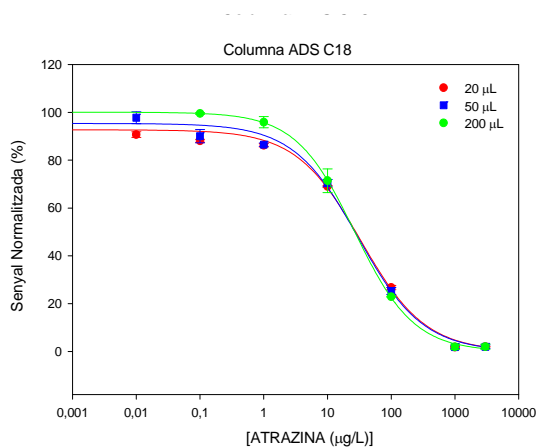


Figura 40 - Corbes de calibratge amb l'immunosensor a diferents volums d'injecció (n=3)

Taula 24 – Característiques analítiques per al sistema atrazina amb l'immunosensor en funció del volum d'injecció

Volum d'injecció (μL)	IC_{50} ($\mu\text{g/L}$)	LD ($\mu\text{g/L}$)	Interval de treball ($\mu\text{g/L}$)	RSD (%)
20	29,4	0,4	3,2-153,8	2,5
50	29,3	0,8	3,6-153,9	2,8
200	27,3	2,4	2,4-115,4	4,3

4.2.4 Comparació de formats d'assaig

En tots els assaigs realitzats anteriorment, el senyal mesurat fou la generat pel traçador unit a l'anticòs; és a dir, la de l'immunocomplex que elueix en el volum mort. En aquest cas, la lectura del senyal és directe. No obstant això, la detecció pot realitzar-se també mitjançant la mesura del generat pel traçador lliure, un cop eluït. En aquest format, denominat indirecte, es requereix una segona etapa d'elució per a alliberar el traçador retingut en l'interior del suport. Aquesta elució es pot realitzar mitjançant metanol. La Taula 25 ens mostra el temps requerit per a cada etapa de l'assaig, així com el medi de treball en els dos formats estudiats (directe i indirecte). En ambdós, el protocol d'activar la fase estacionària a l'inici de la jornada de treball, així com la neteja al final d'aquesta es realitzà de la mateixa manera. En el format directe, el senyal que es registra és el de l'immunocomplex format. Per tant, no requerí cap canvi de fase mòbil i el temps d'assaig és de 2 min. Quan es treballa en format indirecte, el senyal que es registra és el del traçador que ha quedat atrapat en el suport RAM. Per això és necessari realitzar un canvi de fase mòbil per la seva elució. Així doncs, el temps total d'assaig es més elevat, pràcticament quatre vegades més (8 min, Taula 25). En aquest temps

s'inclou l'elució de l'immunocomplex, la neteja del sistema amb aigua per eliminar les sals del sistema i evitar la precipitació en canviar la fase a metanol, i finalment, la neteja del sistema en aigua i re-equilibri amb PBS 2x.

Taula 25 – Condicions d'assaig en el format directe i indirecte

	<i>Format directe</i>		<i>Format indirecte</i>		
	<i>Temps</i>	<i>Fase</i>	<i>Temps</i>	<i>Fase</i>	
	<i>(min)</i>	<i>mòbil</i>	<i>(min)</i>	<i>Mòbil</i>	
Activació	0'	Metanol	0'	Metanol	
Inici jornada treball	8'	H ₂ O	8'	H ₂ O	
	10'	PBS 2x	10'	PBS 2x	
Assaig	2'	PBS 2x	2'	PBS 2x	Elució de l'immunocomplex
			1'	H ₂ O	Neteja sistema
			2'	Metanol	Elució del traçador
			1'	H ₂ O	Neteja del sistema
			2'	PBS 2x	Re-equilibri
Temps total					
d'assaig:	2'		8'		
Neteja	5'	H ₂ O	5'	H ₂ O	
<i>Fi jornada treball</i>	20'	Metanol	20'	Metanol	

Fase estacionària ADS ADS C18

Les corbes de calibratge per a l'atrazina obtingudes mitjançant els dos formats d'assaig es mostren en la Figura 41. En format directe es va aconseguir un valor de IC₅₀ de 14,5 µg/L, mentre que pel format indirecte

el valor fou gairebé el doble (IC_{50} 25,02 $\mu\text{g/L}$). Així doncs, tenint en compte tant la sensibilitat com el temps d'assaig, els millors resultats s'obtingueren en format directe i se seleccionà aquest com a format de treball.

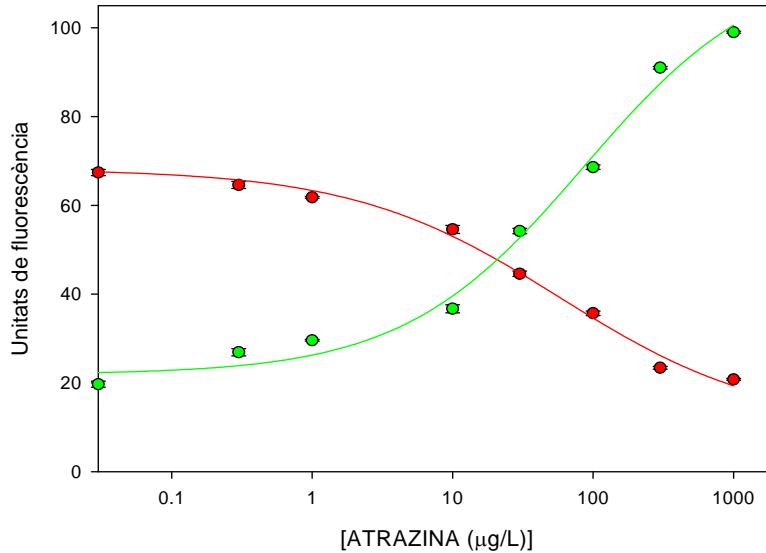


Figura 41 – Corbes de calibratge de l'atrazina amb l'immunosensor obtingudes en format directe (●) i indirecte (●)

Cal destacar que l'interval de treball és molt ampli. Aquest fet possibilita realitzar dilucions en les mostres i, per tant, eliminar o disminuir l'efecte matriu.

En resum, a partir de tots els assaig duts a terme es va concloure que les millors condicions de treball eren:

- Fase estacionària ADS C18
- Fase mòbil PBS 2x, pH 7

Cabal	0,5 mL/min
Detecció	Fluorescent ($\lambda_{\text{excitació}}$ 495 nm i $\lambda_{\text{emissió}}$ 519 nm)
Volum d'injecció	20 μ L
Format d'assaig	Directe
Ús de dissolvents	Metanol fins a un 40% (quan sigui necessari)

En aquestes condicions es va dur a terme l'estudi de repetibilitat i reproductibilitat del sensor.

Per a avaluar la repetibilitat de l'assaig es van analitzar, en dies diferents, 12 mostres d'aigua destil·lada fortificades amb atrazina a 15 μ g/L, després d'ajustar la força iònica i el pH amb PBS, així com el percentatge de MeOH (40%). Com mostra la Taula 26, les recuperacions obtingudes foren superiors al 95% en tots els casos, amb una bona precisió en les mesures.

Taula 26 - Estudi de repetibilitat de l'immunosensor en la determinació d'atrazina en aigua

	[Atrazina] (μ g/L) detectada	Recuperació (%)
Dia 1	14,49 \pm 0,51	96,6
Dia 2	14,38 \pm 1,01	95,8
Dia 3	14,43 \pm 0,60	96,2
n= 12	[atrazina] _{addic} = 15 μ g/L	

Per a avaluar la reproductibilitat del sensor s'analitzaren 12 mostres d'aigua destil·lada fortificades amb 15 μ g/L d'atrazina, en dies alternatius.

Els resultats obtinguts es mostren en la Taula 27. Entre dies les recuperacions mitjanes foren excel·lents (92%) i els valors de RSD < 1,5 %.

Taula 27 - Estudi de reproductibilitat de l'immunosensor en la determinació d'atrazina en aigua.

Mostres	[Atrazina] ($\mu\text{g/L}$) detectada			[Atrazina] $\mu\text{g/L}$ mitjana	Recuperació (%)	RSD (%)
	Dia 1	Dia 2	Dia 3			
1	14,8	14,2	13,9	14,30	95,33	0,46
2	14,3	14,9	13,7	14,30	95,33	0,60
3	15,0	14,1	13,9	14,34	95,60	0,60
4	13,6	14,9	15,1	14,53	96,87	0,81
5	14,3	15,9	14,7	14,97	99,78	0,83
6	14,2	13,8	14,1	14,03	93,56	0,21
7	15,3	12,9	15,3	14,52	96,80	1,40
8	13,8	14,8	13,8	14,13	94,22	0,58
9	14,6	15,3	14,1	14,68	97,89	0,58
10	14,7	14,9	15,2	14,93	99,56	0,25
11	14,3	12,3	15,0	13,88	92,53	1,42
12	14,9	14,5	14,3	14,57	97,11	0,31

n=6

4.2.5 Selectivitat. Reactivitat entrecruada

Un cop caracteritzat l'immunosensor, es va estudiar la selectivitat mitjançant assaigs de reactivitat entrecruada (RC) amb la finalitat de conèixer la capacitat que té l'anticòs de discriminar entre l'anàlit i altres compostos d'estructura similar.

En general, es considera que un compost interfereix sensiblement en l'assaig quan la seva RC és igual o superior al 10%.

Com mostra la Taula 28, en la determinació d'atrazina amb l'immunosensor H-H sols interfereixen la terbutilazina (23,5%) i la propazina (34,7%), igual que succeeix en els assaigs ELISA realitzats utilitzant els mateixos reactius [202].

Taula 28 – Selectivitat dels compostos relacionats amb l'atrazina

<i>Compost</i>	<i>IC₅₀</i> <i>(µg/L)</i>	<i>RC</i> <i>(%)</i>
Atrazina	14,5	100
Irgarol	> 1000	< 0,1
Desetilatrazina	> 1000	< 0,1
Ametrina	> 1000	< 0,1
Prometrina	> 1000	< 0,1
Deisopropilatrazina	> 1000	< 0,1
Terbutilazina	61,7	23,5
Terbutrina	> 1000	< 0,1
Simazina	> 1000	< 0,1
Terbumetron	> 1000	< 0,1
Propazina	41,7	34,7

RC- Reactivitat Entrecruada

En resum, amb l'immunosensor desenvolupat s'ha aconseguit una sensibilitat, expressada com IC₅₀ de 14,5 µg/L, paràmetre que augmenta fins a 54,2 µg/L quan l'assaig es realitza en un 40% (v/v) de metanol en la

dissolució. A més, es va aconseguir una alta repetibilitat i reproductibilitat, amb valors de recuperacions excel·lents ($> 92\%$ i $RSD < 1,5\%$) i una elevada selectivitat per a la determinació d'atrazina en aigües de rec i de EDAR, encara que per assolir la sensibilitat necessària per la determinació en aigües potables caldrà realitzar una etapa de preconcentració a les mostres.

4.3 ANÀLISI DE MOSTRES D'AIGUA MINERAL

L'immunosensor H-H desenvolupat es va aplicar a la determinació d'atrazina en aigua mineral. Atesa la sensibilitat assolida amb l'immunosensor (IC_{50} de $14,5 \mu\text{g/L}$), les mostres foren preconcentrades (ja que els nivells esperables en aquest tipus de mostres han de ser molt baixos) utilitzant discs d'extracció en fase sòlida de C18 [184]. El condicionament del cartutx d'extracció es va dur a terme amb 10 mL de metanol i, posteriorment, 5 mL d'aigua destil·lada per eliminar l'excés de dissolvent.

Es van analitzar 10 mostres d'aigua mineral de diferents procedències i amb les característiques indicades en la Taula 30. En primer lloc es va comprovar que, com era d'esperar, les mostres estaven lliures d'atrazina, per la qual cosa 1500 mL de cada una de les mostres es van dopar a dos nivells d'atrazina ($0,2$ i $0,5 \mu\text{g/L}$). El procés d'extracció tenia una durada de 60 min, mentre per a volums més alts de mostra el procés requeria més temps. Així, per exemple, per a l'extracció de 2000 mL de mostra foren necessaris 140 min.

Per a l'elució s'utilitzà metanol, ja que com s'ha indicat anteriorment aquest dissolvent era el que millor suporta l'immunoassaig, a més de ser el dissolvent utilitzat en el condicionament del disc Empore C18. El volum d'eluent és un paràmetre a determinar de manera que es produeixi l'elució total de l'anàlit sense provocar una dilució excessiva. Per tant, es va estudiar en quin interval elueix l'anàlit, passant successives fraccions de 1 mL de metanol pel disc i recollint les fraccions individualment. El mínim volum de metanol que va permetre l'elució total de l'anàlit en totes dues concentracions fou de 3 mL.

Després d'addicionar 4 mL d'aigua Millipore per a situar el percentatge de dissolvent en els nivells establerts prèviament per l'immunoassaig (40 % en metanol) i ajustar la força iònica, les mostres foren anàlitzades amb l'immunosensor H-H. Les recuperacions obtingudes oscil·laren entre 84 i 108% per a nivells d'addició d'atrazina de 0,5 µg/L, i entre 85 i 125% per a 0,2 µg/L, tal com mostra en la Taula 29.

Taula 29 - Determinació dl'atrazina en aigües mitjançant l'immunosensor

Nº mostra	[Atrazina] µg/L addicionada	[Atrazina] µg/L mesurada ^a	Recuperació (%)
1	0,0	<LD	-
	0,2	0,25 ± 0,08	125
	0,5	0,45 ± 0,02	90
2	0,0	<LD	-
	0,2	0,22 ± 0,01	110
	0,5	0,45 ± 0,07	90
3	0,0	<LD	-
	0,2	0,23 ± 0,06	115
	0,5	0,48 ± 0,10	96
4	0,0	<LD	-
	0,2	0,19 ± 0,09	95
	0,5	0,54 ± 0,03	108
5	0,0	<LD	-
	0,2	0,21 ± 0,03	108
	0,5	0,43 ± 0,06	98
6	0,0	<LD	-
	0,2	0,23 ± 0,07	115
	0,5	0,42 ± 0,04	84
7	0,0	<LD	-
	0,2	0,17 ± 0,06	85
	0,5	0,51 ± 0,01	102
8	0,0	<LD	-
	0,2	0,18 ± 0,06	90
	0,5	0,49 ± 0,08	98
9	0,0	<LD	-
	0,2	0,21 ± 0,08	105
	0,5	0,51 ± 0,07	105
10	0,0	<LD	-
	0,2	0,22 ± 0,05	110
	0,5	0,44 ± 0,04	88

^a Mitjana ± SD, n=6

Donat que amb l'immunoassaig no es pot assolir la sensibilitat requerida per a l'aigua potable es va plantejar la millora d'aquesta sense dur a terme l'etapa de preconcentració de la mostra, reduint el temps d'assaig.

Taula 30 – Característiques de les aigües anàlitzades

<i>Mostres</i>	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
<i>Origen</i>	Granada	Girona	Segòvia	Girona	Conca	Barcelona	Girona	Pirineus	València	Astúries
<i>Contingut en</i>										
<i>(mg/L)</i>										
Na^+	4,8	13,2	1	14,6	5,2	5,3	5,0	1.5	20.7	13.0
Ca^{2+}	27,2	38,5	4	36,2	58,3	3	78,0	3	86.6	69.0
Cl^-	2,8	16,2	< 1	6,4	7,9	4,6	-	0.6	39.7	8.7
K^+	< 1	1,1	-	1,6	1,1	1,1	-	0.4	1.3	3.9
Mg^{2+}	8,8	9,7	2	3,4	25,1	3,1	24,0	0.6	23.3	10.4
HCO_3^-	105	149	18	133,1	285,8	18	357	5.2	295.3	208.0
SO_4^{2-}	17,3	16,4	-	11,1	21,3	4	10,0	8.7	43.0	54.5
NO_3^-	5,8	3,3	2,8	-	2,1	1,2	3,8	< 1	16,5	-
<i>RS</i>	131	185	26	158	261	58	309	28	385	311

RS – Residu

4.4 ESTRATÈGIES PER A LA MILLORA DE LA SENSIBILITAT

La normativa europea vigent estableix 0,1 µg/L com a valor màxim admissible d'atrazina permessa en aigua potable. Donat que la sensibilitat aconseguida amb l'immunosensor H-H impedeix l'assaig directe de les mostres obligant a dur a terme una etapa d'extracció, es van proposar dues estratègies per tal de millorar-la. La primera va consistir en augmentar la relació de marcatge del traçador, utilitzant l'oligo SYM18 marcat amb tres molècules de fluoresceïna (màxim nombre de fluoresceïnes que permet introduir l'oligonucleòtid de 3 bases). La segona es va basar en la utilització de dues columnes ADS en sèrie, la primera utilitzada com a columna de neteja i la segona com a columna de separació dels productes de la immunoreacció.

4.4.1 Utilització d'un traçador amb major relació de marcatge

4.4.1.1 Síntesi i purificació del traçador amb tres fluoresceïnes

La síntesi del nou traçador es va realitzar mitjançant el mètode de l'èster actiu i la seva purificació per HPLC, utilitzant el protocol descrit anteriorment (apartat 4.1.3) pel traçador amb relació de marcatge 1:1 (SYM 18-1FI). En primer lloc es va dur a terme la conjugació de l'haptè 2d amb l'oligonucleòtid SYM 18 marcat amb 3 fluoresceïnes (SYM 18-3FI). La purificació del traçador amb la finalitat de separar la fracció de l'oligonucleòtid que no ha reaccionat no fou adequada, perquè en augmentar la polaritat del traçador aquest queda retingut a l'interior de la columna. Així doncs, es va estudiar l'efecte de l'addició de modificador

orgànic en aquesta etapa i es va mantenir invariables la resta de paràmetres. Per això, s'addicionaren diferents percentatges (entre 1% al 20%) d'acetonitril fins a aconseguir la separació de les dues espècies (oligo i traçador) amb una bona resolució. La separació òptima es produí treballant en gradient amb la següent fase mòbil:

Fase Mòbil A: 20% ACN, 80% PBS 0,02M, pH 7

B: 20% ACN, 80% PBS 0,02M, pH 7 amb NaCl 0,8 N.

La resta de condicions i el sistema utilitzat foren els descrits per una fluoresceïna.

Les Figures 42 i 43 mostren els cromatogrames corresponents a l'oligonucleòtid dissolt en tampó carbonat i a la dissolució de conjugació a l'haptè, obtinguts utilitzant les condicions òptimes de la separació. Com pot observar-se, en aquestes condicions l'oligo SYM 18-3Fl elueix a un *t_r* de 46,2 min, mentre que el traçador (2d-SYM 18-3Fl) ho fa a 58,1 min.

Tal i com es va comprovar en l'assaig amb oligonucleòtids amb 1 Fl, el percentatge de dissolvent orgànic afecta a l'estabilitat del traçador i posterior formació de l'immunocomplex. Per tant, aquest va ser eliminat sota corrent de nitrogen, després de recollir la fracció obtinguda entre 54 i 62 min.

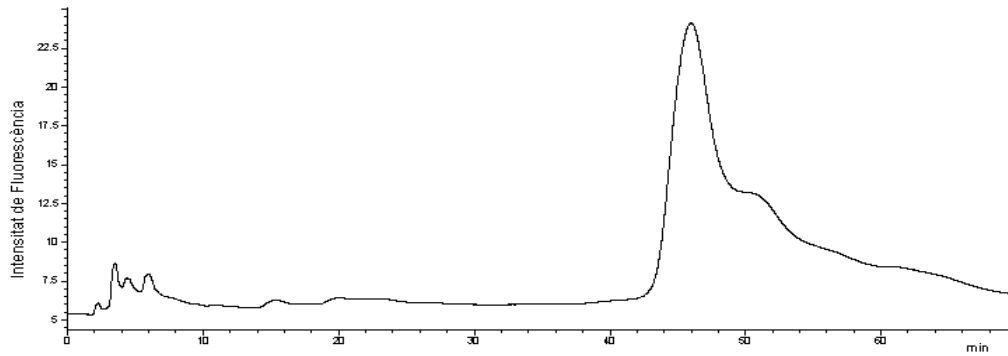


Figura 42 - Cromatograma de l'oligonucleòtid SYM18-3FI

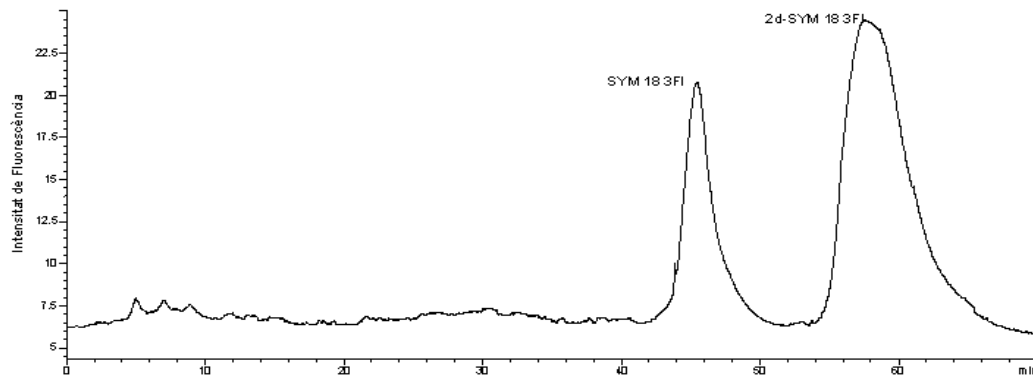


Figura 43 - Cromatograma dels productes de la reacció de conjugació de l'oligonucleòtid SYM18-3FI a l'haptè 2d

4.4.1.2 Optimització de l'immunosensor H-H amb el traçador (SYM 18-3FI)

Un cop purificat el traçador 2d-SYM 18-3FI es va procedir a estudiar el seu comportament en les fases estacionàries ADS C18 i C4, abans d'optimitzar les condicions de treball de l'immunoassaig. Tot i que amb el traçador SYM18-1FI s'aconseguien millors resultats amb la fase estacionària C18,

aquests foren similars als assolits amb la C4, i per tant aquest estudi, es decidí assajar les dues fases estacionàries.

Utilitzant l'immunosensor H-H i les condicions optimitzades amb el traçador amb una fluoresceïna, s'injectaren 20 µL d'una dissolució de traçador 1/4 (v/v) en els dos suports ADS. Després es comparà el senyal obtingut amb i sense la fase estacionària. Com mostra la Taula 31, l'elució fou del 7% i 5% amb les fases C18 i C4, respectivament, la qual cosa indicava que el traçador quedava retingut per sobre el 90% a l'interior del suport, amb independència del suport utilitzat. Aquest percentatge d'elució era similar al que s'assolí quan s'utilitzaven altres oligonucleòtids (SYM18 i SYM20) marcats amb una fluoresceïna

Taula 31 – Percentatge de retenció de diferents traçadors amb les dues fases estacionàries

<i>Traçador</i>	<i>ADS C18 (%)</i>	<i>ADS C4 (%)</i>
2d-SYM 18-3FI	93,0	95,0
2d-SYM 18-1FI	98,8	98,6
2d-SYM 20-1FI	96,0	96,0

Un cop purificat el traçador amb 3 fluoresceïnes (2d-SYM18-3FI) l'optimització de totes les variables que afecten a la resposta del sensor (concentració d'anticòs i traçador, fase mòbil, pH, força iònica i cabal) es va dur a terme de manera similar a la utilitzada amb el traçador 2d-SYM 18-1FI.

La mínima concentració de traçador necessària per a tenir un senyal absolut de magnitud acceptable fou la corresponent a una dilució 1/8

(v/v). Respecte a la dissolució òptima de l'anticòs, entre 1/5000 (v/v) i 1/50 (v/v), i tal com mostra la Figura 44a, la mínima concentració d'anticòs que proporciona un senyal pràcticament equivalent a la obtingut quan no s'utilitza fase estacionària fou 1/400 (v/v). Així doncs, se seleccionà aquesta com a òptima. Com en el cas de l'immunocomplex format amb el traçador amb una fluoresceïna, es va considerar que el senyal obtingut sense fase estacionària corresponia al 100%.

Els resultats dels assaigs realitzats amb diferents concentracions de tampó fosfat salí (PBS, 0,5x-4x) i pH (5-8) foren similars als obtinguts amb el traçador 2d-SYM 18-1FI, seleccionant PBS 2x i pH 7 (Figura 44b), com a òptim. Com es pot apreciar a la Figura 44, el comportament va ser pràcticament igual amb independència del suport (ADS C4 i C18).

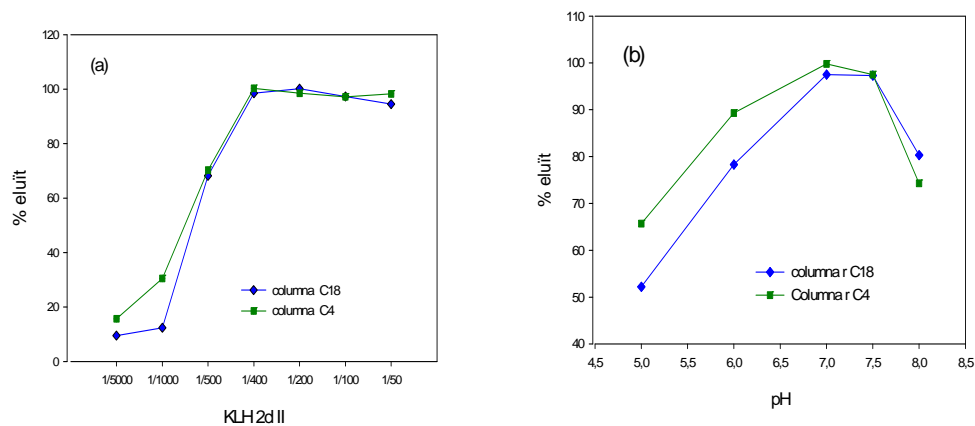


Figura 44 – Percentatge d'immunocomplex que elueix a diferent concentració d'anticòs (a) i pH (b)

En les condicions establertes es van dur a terme calibratges per a l'atrazina utilitzant les fases estacionàries ADS C18 i C4 (Figura 45). Els

paràmetres analítics obtinguts a partir de les corbes es recullen en la Taula 32. Encara que no existeixen diferències significatives en l'ús d'una o altra fase estacionària, en comparar els valors de IC_{50} i LD s'observà que aquests eren lleugerament inferiors en la fase estacionària ADS C4. La fase estacionària ADS C4 és més hidrofílica que la ADS C18, que conté una cadena alifàtica de major longitud, i per tant més hidrofòbica. El nou traçador ha augmentat el nombre de grups polars (-OH) deguts a les 3 fluoresceïnes unides a l'oligonucleòtid. Per tant, aquest queda més retingut dins la fase estacionària i la separació dels productes de la immunoreacció és més efectiva, la qual cosa dóna una major sensibilitat. En comparar els resultats amb els obtinguts amb el traçador amb una fluoresceïna (2d-SYM18-1FI) s'observà que els valors de IC_{50} i LD foren inferiors en totes dues fases estacionàries. Això posà de manifest que en augmentar la relació de marcatge la sensibilitat s'incrementà. Així, mentre que amb el traçador SYM 18-1FI s'aconseguien valors de IC_{50} de 14,5 $\mu\text{g/L}$ i 31,8 $\mu\text{g/L}$ per la fase estacionària ADS C18 i C4, respectivament, amb SYM 18-3FI els valors disminuïren fins a 6,6 $\mu\text{g/L}$ i 1,3 $\mu\text{g/L}$ (Taula 32).

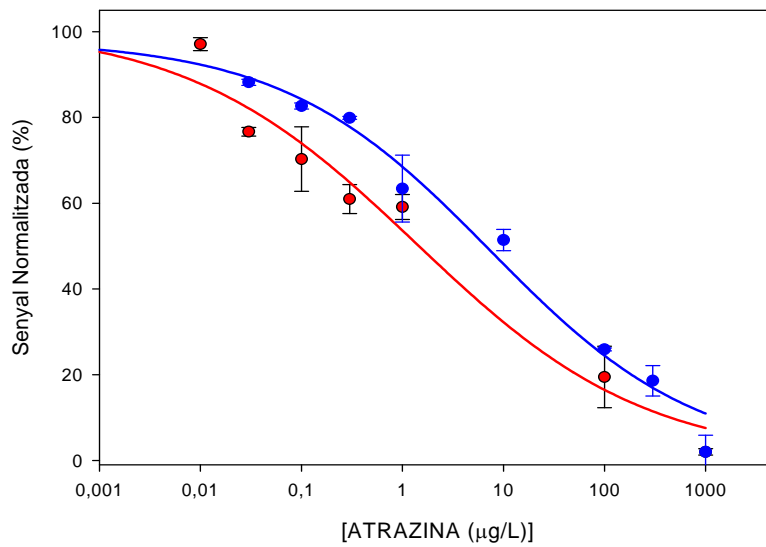


Figura 45 - Corbes de calibratge de l'atrazina amb l'immunosensor H-H utilitzant les fases estacionàries ADS C18(●) i C4(●) (n=6)

Taula 32 – Característiques analítiques per a l'atrazina amb l'immunosensor en funció de la fase estacionària RAM

Fase estacionària	IC ₅₀ (μg/L)	LD (μg/L)	Interval de treball (μg/L)	RSD (%)
ADS C18	6,6	0,02	0,20 – 177,82	5,3
ADS C4	1,3	0,01	0,04 – 51,30	3,7

Traçador 2d-SYM18-3FI

A partir d'aquest punt, tal i com s'havia fet amb el traçador amb relació de marcatge 1:1, es va procedir a seleccionar l'anticòs que proporcionava les millors prestacions, de la bateria d'anticossos disponibles (KLH-2d I, KLH-2d II KLH-2d III, KLH-2d IV).

Els resultats obtinguts en els assaig realitzats amb tots els anticossos i les dues fases estacionàries (ADS C18 i C4) es mostren en la Figura 46 i en la Taula 33.

Si comparem la sensibilitat en funció de l'anticòs utilitzat (KHL-2d I, KHL-2d II, KHL-2d III, KHL-2d IV) i atenem al valor de IC_{50} , l'assaig més sensible s'obtingué quan es treballà amb l'anticòs KHL 2d IV amb independència de la fase estacionària, mentre que el menys sensible correspon a l'anticòs KHL 2d I i KHL 2d III per les fases estacionàries ADS C18 (Figura 46a) i ADS C4 (Figura 46b), respectivament.

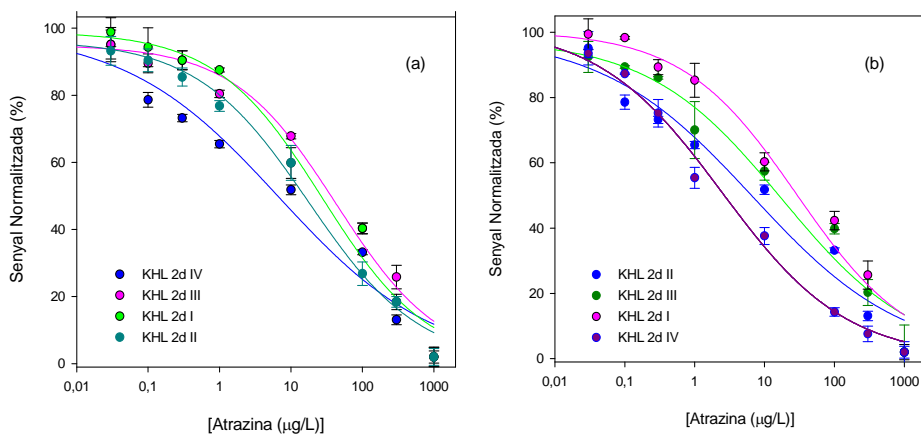


Figura 46 - Corbes de calibratge de l'atrazina amb l'immunosensor utilitzant la bateria d'anticossos i les columnes ADS C18 (a) i ADS C4 (b) (n=4)

Taula 33 - Característiques analítiques per a l'atrazina amb l'immunosensor en funció de l'anticòs i de la fase estacionària ADS utilitzats

ADS C4	IC ₅₀ (µg/L)	LD (µg/L)	Interval de treball (µg/L)	RSD (%)
ANTICÒS				
KLH 2d I	28,64	0,47	2,13 – 371,83	5,2
KLH 2d II	6,44	0,02	0,18 – 207,54	4,9
KLH 2d III	15,90	0,08	0,65 – 339,81	3,2
KLH 2d IV	1,31	0,01	0,04 – 51,32	3,7
ADS C18				
ANTICÒS				
KLH 2d I	25,02	0,52	2,32 -- 283,21	3,4
KLH 2d II	15,26	0,14	0,98 – 189,34	2,5
KLH 2d III	35,80	0,33	2,50 – 388,73	3,6
KLH 2d IV	6,62	0,02	0,20 – 177,82	5,3

Com quan es treballa amb el traçador marcat amb una fluoresceïna (SYM 18-1FI), els millors resultats per totes dues columnes s'aconsegueixen amb l'anticòs KLH 2d IV. En resum, les condicions seleccionades com a òptimes per a dur a terme l'immunoassaig, utilitzant el marcador amb tres fluoresceïnes són:

Suport	ADS C4
Traçador	2d-SYM18-3FI: Dilució de 1/8 (v/v)
Anticòs	KLH 2d IV: Dilució de 1/400 (v/v)
Fase mòbil	PBS 2x, pH 7
Cabal	0,5 mL/min

En utilitzar el traçador amb més relació de marcatge, es produeix una millora apreciable de la sensibilitat de l'assaig, aconseguint valors de IC₅₀

(1,3 µg/L) inferiors als assolits amb el traçador amb una fluoresceïna (IC₅₀ 14,5 µg/L).

4.4.1.3 Anàlisi de mostres fortificades

El sistema H-H amb el traçador de tres fluoresceïnes es va aplicar també a la determinació d'atrazina en mostres d'aigua mineral, prèvia preconcentració mitjançant discs d'extracció en fase sòlida C18.

Les mostres d'aigua anàlitzades foren les utilitzades anteriorment (en l'apartat 4.3) les característiques de les quals es troben en la Taula 27. A 1500 mL de cadascuna de les mostres, s'addicionaren concentracions conegudes d'atrazina a dos nivells de concentració (0,05 i 0,1 µg/L). El condicionament del disc i l'elució de l'anàlit es van realitzar utilitzant les condicions descrites en l'apartat 4.2.5 (10 mL de metanol/5 mL d'aigua pel condicionament i 3 mL de metanol per a l'elució de l'anàlit).

Després d'ajustar la força iònica i el pH dels extractes, aquests s'anàlitzaren utilitzant l'immunosensor en les condicions optimitzades. En la taula 34 es poden observar els bons resultats obtinguts amb totes les mostres. Pel nivell més alt de fortificació (0,1 µg/L) es van obtenir recuperacions entre 73,3 i 111,3%, amb una precisió de les mesures que en el pitjor dels casos fou del 32,7%. En el cas de les mostres fortificades amb atrazina a 0,05 µg/L, les recuperacions oscil·laren entre 89,3 i 116,7%, amb una bona precisió en les mesures (23,3% en el pitjor dels casos).

Taula 34 - Anàlisi de mostres d'aigua utilitzant l'immunosensor

Mostres	[Atrazina] addicionada ($\mu\text{g/L}$)	[Atrazina] recuperada ^a ($\mu\text{g/L}$)	RSD (%)	Recuperació (%)
M1	0	<LD	-	-
	0,05	0,039 \pm 0,006	12,5	90,7
	0,1	0,11 \pm 0,02	15,7	110,0
M2	0	<LD	-	-
	0,05	0,051 \pm 0,006	10,2	111,3
	0,1	0,1 \pm 0,01	6,0	96,7
M3	0	<LD	-	-
	0,05	0,051 \pm 0,009	20,8	111,3
	0,1	0,09 \pm 0,03	23,3	86,7
M4	0	<LD	-	-
	0,05	0,049 \pm 0,009	18,7	93,3
	0,1	0,11 \pm 0,07	28,7	113,3
M5	0	<LD	-	-
	0,05	0,04 \pm 0,01	22,5	94,0
	0,1	0,07 \pm 0,01	7,9	73,3
M6	0	<LD	-	-
	0,05	0,055 \pm 0,004	6,0	116,7
	0,1	0,08 \pm 0,02	27,2	76,7
M7	0	<LD	-	-
	0,05	0,049 \pm 0,005	11,5	89,3
	0,1	0,09 \pm 0,03	32,7	93,3
M8	0	<LD	-	-
	0,05	0,049 \pm 0,006	12,4	89,3
	0,1	0,1 \pm 0,02	14,8	103,3
M9	0	<LD	-	-
	0,05	0,06 \pm 0,01	23,3	106,7
	0,1	0,1 \pm 0,01	7,4	95,0
M10	0	<LD	-	-
	0,05	0,06 \pm 0,01	24,4	106,7
	0,1	0,1 \pm 0,01	7,4	95,0

^aMitja \pm SD, n=4 amb el traçador amb tres fluoresceïnes

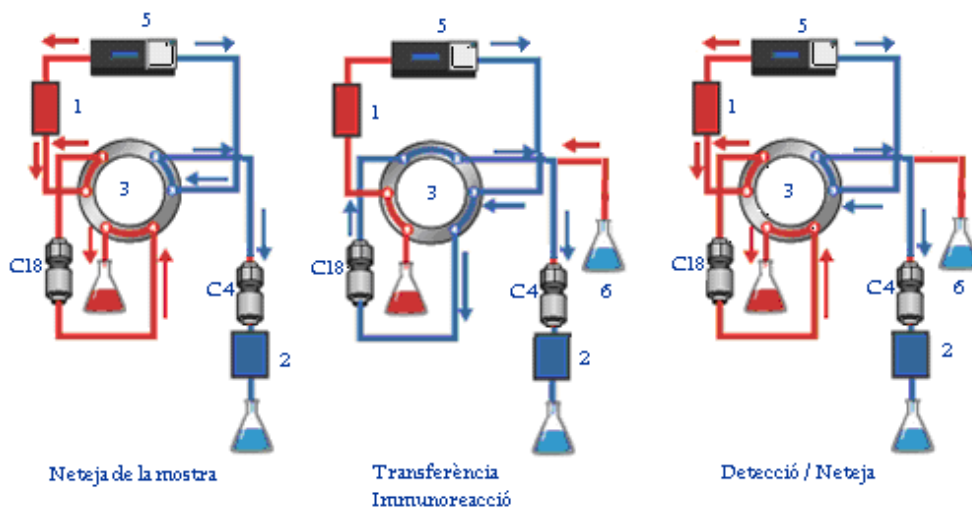
Utilitzant el traçador 2d-SYM18 amb tres fluoresceïnes s'ha aconseguit una major sensibilitat (IC_{50} : 1,3 $\mu\text{g/L}$) que amb el traçador amb una fluoresceïna (IC_{50} : 14,5 $\mu\text{g/L}$). Així doncs, emprant el traçador amb la màxima relació de marcatge es va aconseguir assolir una sensibilitat suficient per a determinar el contingut en atrazina en mostres ambientals: aigua de rec, extractes de sol, etc., [69]. En el cas de requerir major sensibilitat caldrà incloure en el procediment analític una etapa de preconcentració. Per últim, cal assenyalar que seria necessari utilitzar immunoreactius més sensibles (major constant d'afinitat) per a millorar la sensibilitat, eliminant l'etapa de preconcentració de l'anàlit. Amb tot, això no es contempla en aquesta tesi, donat que el que es pretén és aprofundir en el comportament del biosensor.

4.4.2 Sistema de preconcentració mitjançant dues fases estacionàries en sèrie C18 –C4

A diferència dels assaig *en batch*, els immunosensors presenten l'avantatge de poder incorporar-se a un format de treball altament automatitzat. En aquest sentit s'investigà efectuar l'extracció de l'anàlit i la seva determinació de manera conjunta. Per aquest motiu es connectaren dues columnes RAM en sèrie, la primera utilitzada com a fase estacionària de neteja i preconcentració, i la segona per a realitzar la separació dels productes de la immunoreacció.

L'ús de dues fases estacionàries RAM en sèrie ha estat descrit en la bibliografia per a la seva aplicació en cromatografia [198] i s'han

aconseguit bones recuperacions en la determinació de diürètics en plasma. Així doncs, es va realitzar un assaig, utilitzant la fase estacionària ADS C18 com a columna de neteja i de preconcentració, i la ADS C4 com a columna analítica per a realitzar la separació dels productes de l'immunoassaig, degut a que aquesta fou la que proporcionà major sensibilitat amb el traçador de tres fluoresceïnes. L'esquema del muntatge de les dues fases estacionàries en sèrie es mostra a la Figura 47.



- 1: Injector
- 2: Detector
- 3: Vàlvula de sis vies
- C18: Columna ADS C18. Columna de neteja i preconcentració
- C4: Columna ADS C4. Columna d'immunoseparació
- 5: Bomba
- 6: Immunoreactius

Figura 47 - Esquema del sistema immunosensor H-H amb dues columnes en sèrie

Per a predir el funcionament del sistema, en primer lloc es realitzaren assaigs amb la finalitat de conèixer el comportament del traçador en la fase estacionària de neteja ADS C18, utilitzant 10 mL d'una dissolució aquosa 1/8 (v/v) del traçador SYM18-3Fl. Donada la petita mida del traçador, era d'esperar que el seu comportament fora similar al de l'atrazina, amb l'avantatge de poder determinar-lo directament. Es comprovà que el traçador quedava completament retingut en la fase estacionària. Per a la seva posterior elució es van utilitzar diferents percentatges de metanol en la fase mòbil (0-100%). Com es mostra en la Figura 48, percentatges de metanol superiors a 50% provoquen l'elució de més del 45% de traçador. Però no és fins a percentatges superiors al 90% que aquesta és aproximadament del 100%. Per tant, es decideix realitzar l'elució de l'anàlit en metanol al 100% i posteriorment, abans de l'addició del immunoreactiu, ajustar la força iònica, pH i percentatge de dissolvent orgànic, a les condicions òptimes de l'assaig.

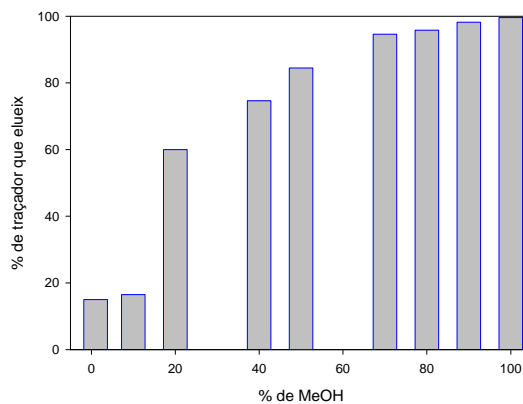


Figura 48 - Estudi de l'elució del traçador en la fase estacionària ADS C18 en funció del percentatge de metanol

Posteriorment es va procedir a optimitzar altres paràmetres, com el cabal d'injecció de la mostra en la fase estacionària de neteja i el cabal d'elució de l'anàlit (l'atrazina) en metanol. Quant al cabal d'injecció, es van realitzar assaigs entre 0,5 a 4 mL/min i s'observà que a partir de 2,5 mL/min la pressió de la fase estacionària augmentava fins als 250 bars. Atès que la sobrepressió del sistema no va permetre treballar de forma correcta a partir d'un cabal superior a 2 mL/min, es va seleccionar aquest com el cabal de treball. Pel que fa al cabal d'elució, es van realitzar assaigs en un interval de 0,5 a 2 mL/min. Tal com mostra la Figura 49, a mesura que augmenta el cabal d'elució disminueix el percentatge de traçador que es recupera. Així doncs, se seleccionà 0,5 mL/min com a òptim.

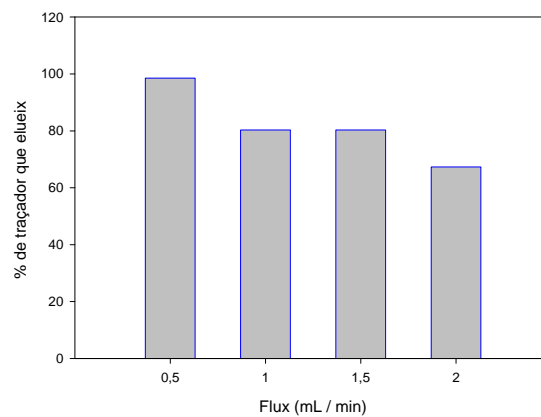


Figura 49 - Percentatge l'elució del traçador en la fase estacionària ADS C18 en funció del cabal d'elució

Amb les condicions prèviament seleccionades per a l'immunoassaig (fase mòbil PBS 2x, pH 7, dilucions 1/8 (v/v) del traçador 2d-SYM18-3FL de i 1/400 (v/v) de l'anticòs KLH 2d IV), cabal d'injecció de la mostra i d'elució

en la etapa de preconcentració de 2 mL/min i 0,5 mL/min, respectivament, i cabal d'injecció en la columna analítica de 0,5 mL/min, condicions establertes anteriorment (*apartat 4.8.6.1.2*). Es van obtenir sis corbes de calibratge per atrazina, ajustant en tots els casos la concentració de metanol (40% (v/v)). La corba de calibratge mitjana es mostra en la Figura 50.

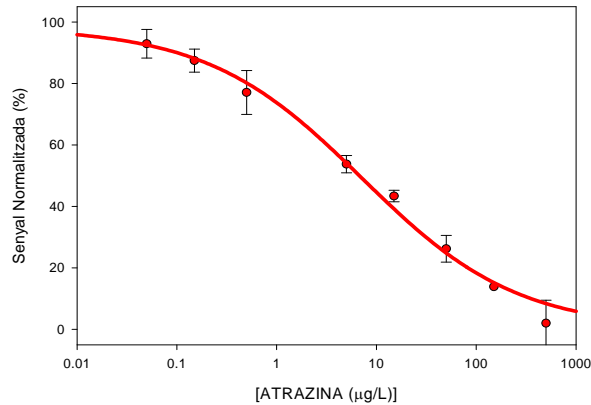


Figura 50 - Corba de calibratge de l' atrazina obtinguda amb l'immunosensor amb etapa prèvia de preconcentració (n=6)

Tal i com mostra la Taula 35, els valors de IC_{50} i LD obtinguts amb el sistema de dues columnes en sèrie (IC_{50} 6,4 i LD 0,099) foren similars als aconseguits en utilitzar el sistema H-H amb la fase estacionària C18 (IC_{50} 6,6 i LD 0,022). La diferència radica en que amb les columnes en sèrie es pot realitzar la preconcentració de la mostra i, per tant, la possible determinació d'atrazina per sota el límits establerts.

Taula 35 – Característiques analítiques pel sistema atrazina amb l'immunosensor utilitzant les dues fases estacionàries

<i>Fase estacionària</i>	<i>IC₅₀</i> <i>(µg/L)</i>	<i>LD</i> <i>(µg/L)</i>	<i>Interval de treball</i> <i>(µg/L)</i>	<i>RSD</i> <i>(%)</i>
ADS C18-ADS C4	6,4	0,10	0,5 – 80, 5	5,6
ADS C18	6,6	0,02	0,20 – 177,8	2,8
ADS C4	1,3	0,01	0,04 – 51,3	3,7

Posteriorment es procedí a establir els nivells òptims d'aquells paràmetres relacionats amb la preconcentració (volum de mostra, concentració d'anàlit) que pot suportar la fase estacionària ADS C18, així com el volum necessari per a eluir l'anàlit. Per aquest estudi es realitzaren una sèrie d'assaigs amb diferents volums d'aigua destil·lada dopada amb atrazina a nivells de concentració entre 0,01 i 1000 µg/L, realitzant l'elució amb diferents volums de MeOH d'entre 0,2 i 1 mL.

Com s'observa en la Taula 36, la fase estacionària permet treballar amb un volum de mostra de fins a 100 mL (sense que s'apreciïn sobrepressions en el sistema). En tots els casos s'aconsegueixen bones recuperacions (entre 89 i 123 %). Tan sols quan la concentració d'atrazina addicionada fou 0,01 µg/L, la recuperació baixà fins al 70%.

Pel que fa al volum d'elució, les recuperacions foren acceptables per a tots els volums de metanol assajats (1 mL i 0,2 mL). Així doncs, per a assolir una major preconcentració en les mostres, es decidí treballar amb 100 mL de mostra i 0,2 mL de metanol com eluent.

Taula 36 - Percentatge de recuperació d'atrazina en funció del volum de mostra i eluent

Volum mostra (mL)	[Atrazina] addicionada ($\mu\text{g/L}$)	Volum elució (mL)	[Atrazina] recuperada ($\mu\text{g/L}$)	Recuperació (%)
10	1000	1	476 \pm 15,4	119
10	1	1	4,92 \pm 9,1	123
10	1	0,2	21,8 \pm 8,4	109
50	1,2	0,2	116,6 \pm 6,7	97,1
50	0,3	0,2	32,5 \pm 12,3	108,3
20	0,3	0,2	11,4 \pm 9,5	95,5
100	0,1	0,2	20,2 \pm 7,8	101
50	0,05	0,2	4,45 \pm 6,4	89
100	0,05	0,2	9,0 \pm 4,2	90
100	0,01	0,2	3,8 \pm 9,8	70

Les condicions seleccionades foren les utilitzades per a l'anàlisi de deu mostres d'aigua mineral, natives i fortificades a dos nivells (0,1 i 0,05 $\mu\text{g/L}$).

El protocol d'assaig consistí en preconcentrar l'anàlit a partir d'una mostra de 100 mL d'aigua mineral fortificada utilitzant la fase estacionària ADS C18 a un cabal 2 mL/min. Després d'eluir l'atrazina amb 0,2 mL de metanol a un cabal de 0,5 mL/min i d'ajustar el percentatge de dissolvent orgànic al 40%, es va dur a terme la mescla amb els immunoreactius (traçador i anticòs). Finalment, 20 μL s'injectaren en l'immunosensor (que utilitza la fase estacionària ADS C4).

En la Taula 37 es poden observar els bons resultats obtinguts en l'aplicació de l'immunosensor H-H, amb dues columnes RAM a mostres d'aigua natives i fortificades a 0,1 i 0,05 µg/L. Les recuperacions obtingudes en les mostres fortificades a 0,1 µg/L oscil·laren entre el 78,7 i 118,9%, amb una RSD (%) acceptable.

Amb les mostres fortificades a 0,05 µg/L, els percentatges de recuperacions oscil·laren entre 78,9 i 109,8%, amb una precisió en les mesures millor que a 0,1 µg/L. El factor de preconcentració aconseguit amb el sistema de fases estacionàries en sèrie permet determinar directa atrazina per sota del valor màxim admissible (0,1 µg/L).

En comparar els resultats amb els obtinguts quan s'utilitza disc C18 com a sistema de preconcentració, no s'observen diferències significatives, encara que la precisió és major quan es treballa amb fases estacionàries en sèrie. Quant a la durada de l'assaig, aquesta és inferior quan es treballa amb les fases estacionàries en sèrie (30 min) que quan s'utilitza el sistema de preconcentració amb discs (45 min). A la vista del resultats obtinguts s'optà per utilitzar el sistema de fases estacionàries ADS en sèrie per a l'immunosensor, ja que tant el volum de mostra com el temps de preconcentració son inferiors.

Taula 37 - Recuperacions obtingudes en l'anàlisi d'aigua mineral fortificada utilitzant les fases estacionàries en sèrie

Mostres	[Atrazina] addicionada (µg/L)	[Atrazina] recuperada^a (µg/L)	RSD (%)	Recuperació (%)
M1	0	< LD	-	-
	0,1	0,08 ± 0,01	10,3	78,7
	0,05	0,04 ± 0,01	17,2	78,9
M2	0	< LD	-	-
	0,1	0,09 ± 0,03	27,0	93,3
	0,05	0,05 ± 0,01	25,2	94,6
M3	0	< LD	-	-
	0,1	0,11 ± 0,02	13,5	113,3
	0,05	0,06 ± 0,02	23,0	115,7
M4	0	< LD	-	-
	0,1	0,09 ± 0,01	11,1	90,0
	0,05	0,06 ± 0,04	25,3	115,7
M5	0	< LD	-	-
	0,1	0,09 ± 0,01	14,8	86,0
	0,05	0,06 ± 0,04	12,4	113,9
M6	0	< LD	-	-
	0,1	0,08 ± 0,01	5,0	82,7
	0,05	0,05 ± 0,01	1,4	96,0
M7	0	< LD	-	-
	0,1	0,13 ± 0,03	19,9	126,7
	0,05	0,06 ± 0,01	17,9	103,5
M8	0	< LD	-	-
	0,1	0,10 ± 0,02	20,7	98,0
	0,05	0,05 ± 0,02	18,5	84,9
M9	0	< LD	-	-
	0,1	0,09 ± 0,01	9,2	85,0
	0,05	0,06 ± 0,01	12,2	109,8
M10	0	< LD	-	-
	0,1	0,12 ± 0,02	19,1	118,3
	0,05	0,05 ± 0,01	4,1	91,8

^a Mitjana ± SD, n=6

4.4.2.1 Anàlisi de mostres d'aigües naturals

Finalment, i amb la finalitat de mostrar la vàlua de l'immunosensor H-H desenvolupat, aquest es va aplicar a la determinació d'atrazina en 13 mostres d'aigua procedents del riu Túria al llarg del seva llera, utilitzant el protocol descrit anteriorment (secció 4.4.2). En totes les mostres els nivells d'atrazina trobats foren inferiors al LMR (0,1 µg/L).

Per aquest motiu, i amb la finalitat de comprovar si existeix efecte matriu, tots els extractes procedents de la fase estacionària ADS C18 es fortificaren a un nivell d'atrazina de 7,5 µg/L, concentració al voltant del IC₅₀ (6,4 µg/L). La immunoreacció i posterior separació es realitzà amb la columna ADS C4.

En la Taula 38 es mostra el percentatge de recuperació obtinguda, observant que aquest oscil·la entre el 83,4% (mostra M13) i el 104% (mostres M1 i M10). La precisió de les mesures, expressada com desviació estàndard relativa (RSD %), fou inferior al 18%.

Taula 38 - Recuperacions obtingudes en l'anàlisi d'aigua natural fortificada utilitzant columnes en sèrie

Mostra	[Atrazina] addicionada ($\mu\text{g}/\text{L}$)	[Atrazina] recuperats ($\mu\text{g}/\text{L}$)	RSD (%)	Recuperació (%)
M1	0	<LD	-	-
	7,5	7,8 \pm 0,9	11,4	104,0
M2	0	<LD	-	-
	7,5	7,6 \pm 0,5	7,2	101,7
M3	0	<LD	-	-
	7,5	7,7 \pm 0,5	6,2	103,8
M4	0	<LD	-	-
	7,5	7,4 \pm 0,2	2,8	98,2
M5	0	<LD	-	-
	7,5	6,7 \pm 0,2	3,7	89,7
M6	0	<LD	-	-
	7,5	6,9 \pm 0,4	5,8	92,4
M7	0	<LD	-	-
	7,5	7,7 \pm 1,4	17,6	103,1
M8	0	<LD	-	-
	7,5	7,4 \pm 0,8	10,2	99,1
M9	0	<LD	-	-
	7,5	7,2 \pm 0,2	2,8	96,0
M10	0	<LD	-	-
	7,5	7,3 \pm 1,0	14,5	104,0
M11	0	<LD	-	-
	7,5	7,4 \pm 0,7	10,2	99,1
M12	0	<LD	-	-
	7,5	7,5 \pm 0,6	8,1	99,5
M13	0	<LD	-	-
	7,5	6,3 \pm 0,2	3,3	83,5

^a Mitjana \pm SD, n=4

Finalment, d'una mostra preparada per mescla de cadascuna de les tretze mostres de l'aigua del riu Túria en quantitats equivalents (7,7%), s'agafaren 10 submostres que foren fortificades a dos nivells d'atrazina (0,05 i 0,075 µg/L) i s'analitzaren utilitzant les dues columnes en sèrie, seguint el protocol descrit en l'apartat 4.2.6.2. Els resultats obtinguts es mostren en la Taula 39.

Taula 39 - Recuperacions obtingudes en l'anàlisi d'atrazina en una mescla d'aigua natural fortificada utilitzant fases estacionàries en sèrie

Submostres	[Atrazina] addicionada (µg/L)	[Atrazina] recuperada^a (µg/L)	RSD (%)	Recuperació (%)
	0	>LD	-	-
M1	0,05	0,053 ± 0,004	8,19	105,8
	0,075	0,061 ± 0,007	11,82	81,4
M2	0,05	0,048 ± 0,002	4,49	95,6
	0,075	0,072 ± 0,002	2,21	95,7
M3	0,05	0,045 ± 0,005	11,90	89,2
	0,075	0,072 ± 0,006	7,88	95,5
M4	0,05	0,047 ± 0,010	21,24	94,2
	0,075	0,064 ± 0,012	18,99	85,1
M5	0,05	0,049 ± 0,005	9,88	97,3
	0,075	0,073 ± 0,001	0,79	96,8
M6	0,05	0,046 ± 0,003	5,83	92,4
	0,075	0,071 ± 0,002	2,40	94,4
M7	0,05	0,048 ± 0,001	2,87	96,8
	0,075	0,066 ± 0,006	8,79	87,5
M8	0,05	0,047 ± 0,003	7,01	93,7
	0,075	0,073 ± 0,003	4,12	97,2
M9	0,05	0,048 ± 0,004	9,21	96,4
	0,075	0,074 ± 0,003	3,58	98,6
M10	0,05	0,045 ± 0,001	2,27	89,7
	0,075	0,073 ± 0,004	6,14	97,6

^a Mitjana ± SD, n=6

Les recuperacions assolides foren elevades en tots els casos, oscil·lant entre 81,4 i 89 % pels nivells d'atrazina de 0,075 µg/L i entre 81,4 a 97,6 % per a 0,05 µg/L. Així doncs, l'immunosensor H-H desenvolupat es pot aplicar a la determinació d'atrazina en aigües superficials amb bona precisió i exactitud en els resultats, a nivells inferiors al valor màxim admissible establert per la legislació.

En resum, i a la vista dels resultats obtinguts, l'immunosensor desenvolupat utilitzant les dues fases estacionàries en sèrie és adient per a la determinació automatitzada d'atrazina, i s'aconsegueix la sensibilitat adequada per a la seva aplicació a un ampli interval de concentracions en aigua. Així doncs les condicions òptimes per l'assaig són:

Fases estacionàries en sèrie	ADS C18- ADS C4	
Inmunoreactius	Traçador	2d-SYM18-3FI: Dilució de 1/8 (v/v)
	Anticòs	KHL 2d IV: Dilució de 1/400 (v/v)
Fase mòbil	PBS 2x, pH 7	
Volum mostra	100 mL	
Preconcentració:	Cabal d'injecció	2,0 mL/min
Columna C18	Cabal d'elució	0,5 mL/min
Immunosensor:	Cabal d'injecció	0,5 mL/min
Columna C4		
Dissolvent	Metanol fins a un 40% (v/v) (quan sigui necessari)	
Temps total d'assaig	32 min	

4.5 ESTUDI DE L'IMMUNOSENSOR H-H AMB UN NOU MARCADOR FLUORESCENT

Per tal de comprovar el caràcter general de la via de marcatge de fluoròfors a haptens, es va preparar un nou traçador mitjançant la conjugació de l'haptè 2d a un oligonucleòtid marcat amb un fluoròfor diferent a la fluoresceïna i se n'estudià la influència en la bondat de l'immunosensor H-H.

Com s'ha establert en l'apartat 4.1, l'immunosensor H-H per atrazina funciona perfectament quan s'utilitzen traçadors a base d'oligonucleòtids marcats amb fluoresceïna. Així, es va plantejar una experiència amb la finalitat de conèixer el funcionament de l'immunosensor quan s'utilitza un marcador fluorescent diferent.

En els últims anys, s'han sintetitzat nous derivats de la fluoresceïna, com es el cas de la 6-carboxifluoresceïna (6 FAM). La seva estructura es mostra la Figura 51. Aquest fluoròfor manté l'alt coeficient d'extinció molar de la fluoresceïna ($81.000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ en PBS), un rendiment quàntic de fluorescència de 0,64 i permet la detecció a un pH al voltant del fisiològic, amb alta sensibilitat [199].

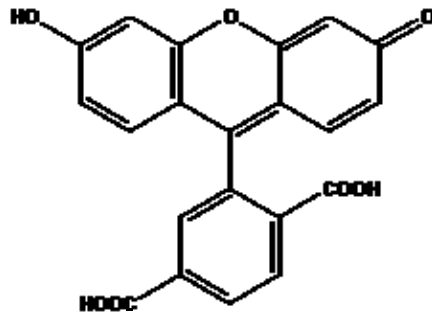


Figura 51 - Estructura de la 6-carboxifluoresceïna (6 FAM)

Atès que de tots els oligonucleòtids marcats amb una fluoresceïna, millors resultats en l'immunosensor H-H s'aconseguien amb SYM 18-1FI (3pb), es va proposar l'estudi del comportament d'un altre oligonucleòtid de 3 bases (SYM 29) marcat amb 6 FAM, al qual s'anomenà SYM29-6FAM. L'estructura del traçador 2d-SYM29-6FAM obtingut per conjugació de l'haptè 2d de l'atrazina amb el mencionat oligonucleòtid marcat es mostra en la Figura 52.

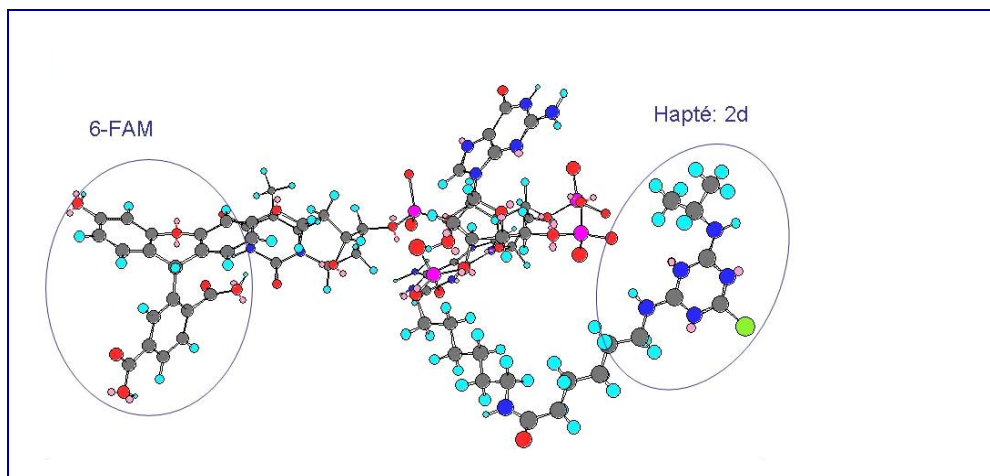


Figura 52 - Estructura tridimensional del traçador 2d-SYM 29-6FAM

4.5.1 Síntesi i purificació del traçador

Per a la conjugació i la posterior purificació del traçador 2d-SYM 29-6FAM, es va utilitzar el protocol descrit anteriorment pels traçadors a base de fluoresceïna. Les condicions cromatogràfiques utilitzades foren:

<i>Columna</i>	Zorbax Oligo Analytical 6.2x 801mm 5-micron
<i>Fase Mòbil</i>	A: 20% ACN, 80% PBS 0,02M, pH 7 B: 20% ACN, 80% PBS 0,02M, pH 7 amb 0,8 N NaCl.
<i>Gradient</i>	0-100% de B durant 40 min, i 10 min de re equilibri
<i>Temperatura</i>	25 °C
<i>Cabal</i>	1 mL/min
<i>Detecció</i>	Fluorescent ($\lambda_{\text{excitació}}$ 495 nm i $\lambda_{\text{emissió}}$ 525 nm)
<i>Injecció</i>	20 μ L

En la Figura 53 es presenta el cromatograma corresponent a l'oligonucleòtid SYM 29-6FAM dissolt en tampó carbonat, en el que s'observa un pic a 13,6 min.

En analitzar 20 μ L de la dissolució de conjugació, el cromatograma (Figura 54) mostra un pic a tr 34,3 min corresponent al traçador 2d-SYM 29-6FAM. Un cop recollida la fracció corresponent a tr entre 29,5 i 36 min, s'elimina l'acetonitril sota corrent de N₂ i es guarda fins al seu ús a 4 °C.

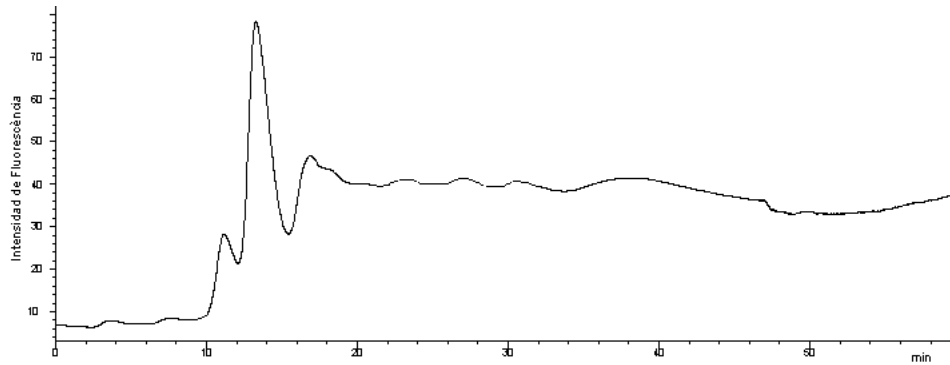


Figura 53 - Cromatograma corresponent a l'oligonucleòtid SYM 29-6FAM

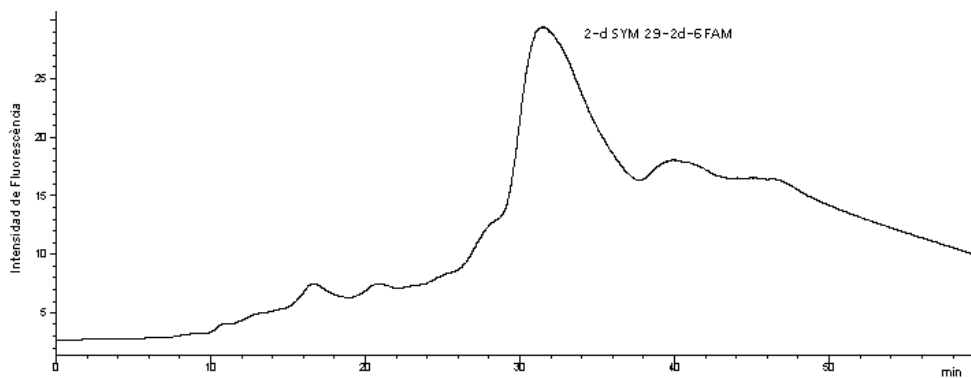


Figura 54 - Cromatograma dels productes de la reacció de conjugació de l'oligonucleòtid SYM 29-6FAM a l'haptè 2d

Un cop purificat el traçador, era necessari estudiar el seu comportament i el de l'oligonucleòtid en injectar-los en la fase estacionària ADS C18, fase RAM seleccionada com a òptima quan l'immunoassaig es realitzà amb el traçador 2d-SYM18-1FL. Així doncs, es va preparar una dilució 1:4 (v/v) de cadascun dels compostos, utilitzant PBS 1x a pH 7,5, fase mòbil

seleccionada com a òptima en l'estudi prèviament realitzat amb el traçador 2d-SYM18-1FI.

El comportament del sistema fou pràcticament el mateix que l'observat en utilitzar fluoresceïna (Taula 40). El traçador SYM29-6FAM quedà retingut pràcticament al 100% en la fase estacionària utilitzada (ADS C18).

Taula 40 - Percentatge d'oligonucleòtid i de traçador que es reté de la fase estacionària ADS C18

		<i>Estructura</i>	<i>R(%)</i>
<i>Oligonucleòtid</i>	SYM 18-1FI	5' FI-TAG-C7-NH ₂ 3'	99,5
	SYM 29-6FAM	5' FAM-TAG-C7-NH ₂ 3'	99,2
<i>Traçador</i>	2d-SYM 18-1FI	5' FI-TAG-C7-NH-2d 3'	98,9
	2d-SYM29-6FAM	5' FAM-TAG-C7-NH 2d 3'	98,8

R – retenció

Aquest resultat és altament interessant, ja que la utilització d'altres marcadors fluorescents en el traçador permetrà realitzar assaigs multianàlit utilitzant diferents immunoreactius i la seva posterior detecció a diferent longitud d'ona.

4.5.2 Optimització de l'immunoassaig

Per tal d'optimitzar les concentracions de traçador i d'anticòs es van realitzar diferents assaigs amb dissolucions de traçador entre 1/2 i 1/10 (v/v) i d'anticòs KLH 2d IV entre 1/5000 i 1/50 (v/v). Inicialment es va escollir aquest anticòs per ser l'òptim en l'immunoassaig desenvolupat anteriorment (que utilitza el traçador 2d-SYM18-1FI).

La dilució òptima de traçador va correspondre a 1/8 (v/v), mentre que la de l'anticòs fou 1/200 (v/v).

Per a l'optimització de la fase mòbil es van realitzar assaigs amb tampó fosfat salí (PBS) a diferents concentracions (1x-4x) i pH (entre 5 i 7,5) i s'obtingueren resultats similars als assolits amb el traçador SYM 18-1FI. Per tant, es va seleccionar PBS 2x a pH 7 per a la resta dels assaigs. En aquestes condicions, el 98% del traçador lliure quedà retingut en la fase estacionària i el percentatge d'immunocomplex eluït era del 95%.

Finalment es realitzaren assaigs amb la bateria d'anticòs disponibles per a l'atrazina (KLH-2d I, KLH-2d II, KLH-2d III, KLH-2d IV), per tal de seleccionar aquell que donarà lloc a les millors prestacions. Els resultats es mostren en la Figura 55 i la Taula 41. Si comparem la sensibilitat (atenent al paràmetre de IC_{50}) obtinguda en funció de l'anticòs, l'assaig més sensible es va obtenir amb l'anticòs KHL 2d I (IC_{50} 10,20 μ g/L), mentre que el menys sensible el proporciona l'anticòs KHL 2d III (IC_{50} 28,33 μ g/L).

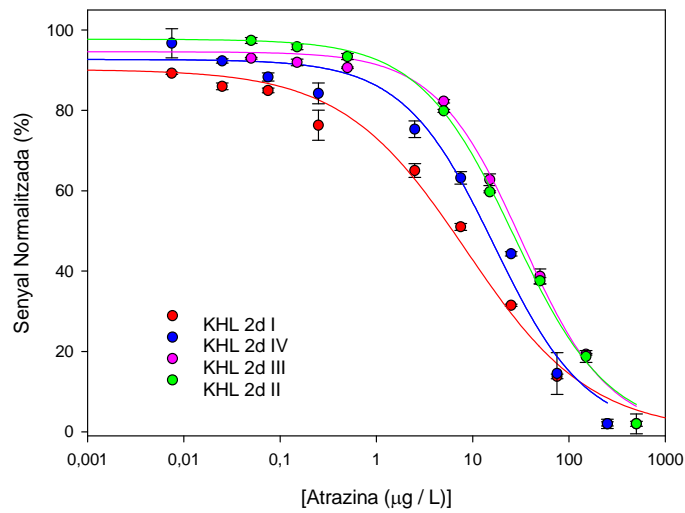


Figura 55 - Corbes de calibratge per l'atrazina amb l'immunosensor H-H utilitzant la bateria d' anticòs i la columna ADS C18 (n=4)

Taula 41 – Característiques analítiques pel sistema atrazina amb l'immunosensor en funció del anticòs

ADS C18	IC_{50} ($\mu\text{g/L}$)	LD ($\mu\text{g/L}$)	Interval de treball ($\mu\text{g/L}$)	RSD (%)
ANTICÒS				
KLH-2d I	10,2	1,02	2,64-110,2	0,8
KLH-2d II	24,3	1,60	4,7 – 119,0	2,9
KLH-2d III	28,3	1,44	5,49 – 125,2	3,2
KLH-2d IV	13,6	0,35	2,14 – 67,3	1,8

Es va elegir com a òptim l'anticòs el KLH-2dI en assolir-se un interval de treball superior i una menor RSD.

En comparar els resultats amb els aconseguits amb el traçador marcat amb fluoresceïna (SYM 18-1FI), poden observar-se algunes diferències. En

el cas del SYM 18-1FI el menor valor de IC_{50} i LD es va aconseguir amb l'anticòs KLH-2d IV, encara que els valors (IC_{50} 14,5 μ g/L i LD 1,2 μ g/L) foren similars als assolits amb el traçador marcat amb 6FAM (2d-SYM29-6FAM).

4.5.3 Selectivitat. Reactivitat entrecreuada

Per a estudiar la selectivitat del sistema es dugueren a terme assaigs de reactivitat entrecreuada amb un conjunt de compostos estructuralment similars a l'atrazina. En aquest cas, els resultats (Taula 42) indicaren que la propazina és el compost que presentà la major reactivitat entrecreuada (17,9%), seguida de l'ametrina (10,9%). Per la resta de compostos el sistema es mostrà altament selectiu.

Taula 42 - Reactivitat entrecreuada dels compostos relacionats amb l'atrazina

<i>Compost</i>	<i>IC₅₀</i> <i>(μg/L)</i>	<i>RC</i> <i>(%)</i>
Atrazina	7,7	100
Irgarol	> 1000	< 0,1
Desetilatrazina	150,26	5,12
Ametrina	70,4	10,93
Prometrina	> 1000	< 0,1
Deisopropilatrazina	> 1000	< 0,1
Terbutilazina	> 1000	< 0,1
Terbutrina	> 1000	< 0,1
Simazina	> 1000	< 0,1
Terbumetron	> 1000	< 0,1

Propazina	42,93	17,9
-----------	-------	------

Si comparem aquests resultats amb els aconseguits amb el traçador 2d-SYM18-1Fl s'observà que el compost amb major interferència era la propazina, amb valors de RC similars. En canvi, les interferències que presenten altres compostos com la terbutilazina i ametrina, depenien dels traçadors 2d-SYM18-Fl i, respectivament. Aquesta diferència es deu a que es treballa amb diferents parells anticòs/traçador. Cal destacar que en utilitzar el traçador 2d-SYM29-6FAM la terbutilazina no interfereix (RC<0,1%), com passa en la resta de sistemes immunoquímics per a l'atrazina.

4.5.4 Estudi de la influència dels dissolvents orgànics

La utilització de dissolvents orgànics en el tractament, concentració i neteja de mostres fa necessari l'estudi de la tolerància de l'immunoassaig front aquests dissolvents. Per aquest motiu es van realitzar diversos assaigs en metanol, acetonitril i 2-propanol, en un interval de concentració entre el 0 – 80%, utilitzant la fase estacionària ADS C18.

En primer lloc es va estudiar l'efecte de l'addició de dissolvent sobre la retenció del traçador en la fase estacionària. Es va observar que a mesura que el percentatge de dissolvent augmenta, també ho fa el percentatge de traçador eluït (menor retenció). En comparar els dissolvents, s'observà que era l'acetonitril el que provocava una major elució del traçador a

menor concentració de dissolvent. Tal com mostra la Figura 56a, l'elució d'aproximadament un 50% del traçador es produeix amb un percentatge del 10% d'acetonitril, mentre que amb metanol o 2-propanol aquesta elució es produeix a percentatges de dissolvent quatre vegades superior (40%).

Posteriorment, es va estudiar l'estabilitat de l'immunocomplex i s'observà que, a mesura que augmentava la concentració de dissolvent orgànic, el senyal de l'immunocomplex disminuïa (Figura 56b) i que, a més, era més acusat quan el dissolvent era l'acetonitril. Aquest fet també es va observar quan s'utilitzà el traçador 2d-SYM 18-1FI.

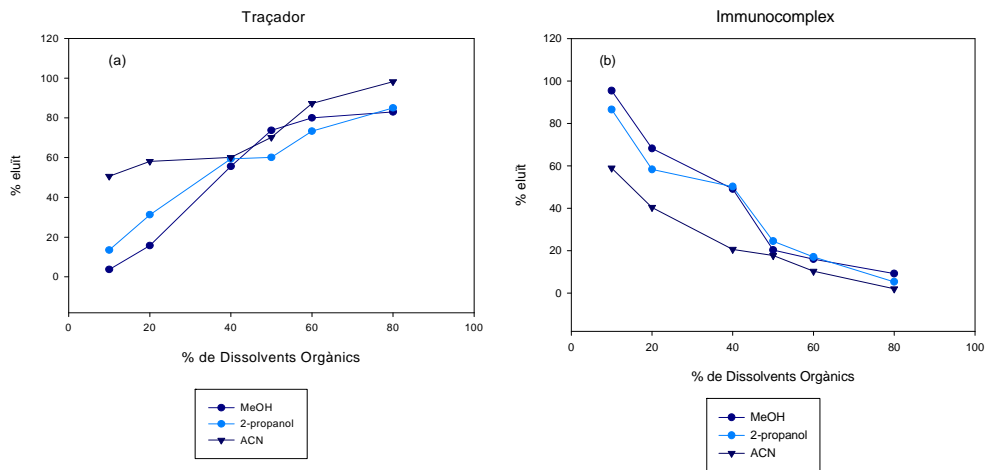


Figura 56 - Influència del dissolvents orgànics en l'immunoassaig amb la fase estacionària ADS C18 Percentatge d'elució del traçador(a) i Percentatge d'elució de l'immunocomplex (b)

Finalment, es va procedir a estudiar l'efecte dels dissolvents orgànics en l'immunoassaig i s'obtingueren les corresponents corbes de calibrat per

atrazina amb els tres dissolvents i dos concentracions, 15% i 40% (Figura 57).

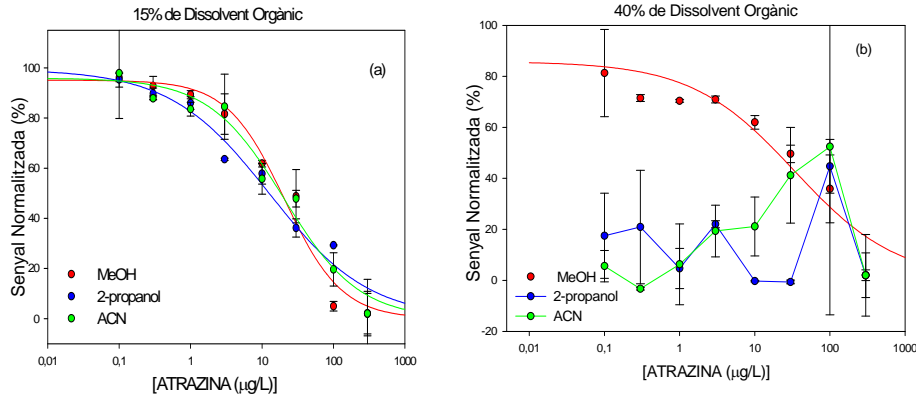


Figura 57 – Corbes de calibratge de l'atrazina amb l'immunosensor en presència de medi orgànic (a) 15% i (b) 40% (n=6)

En la Taula 43 es mostren les característiques analítiques obtingudes a partir de les corbes de calibratge. En tots els casos s'observa competició en usar un 15% de dissolvent orgànic en la fase mòbil i s'aconsegueix una millor sensibilitat si el dissolvent és metanol.

Per a percentatges de dissolvent orgànic del 40%, només s'observa competició amb metanol. Encara que en tots els casos la presència de dissolvent provoca una disminució de la sensibilitat, quan s'utilitza el traçador marcat amb 6-FAM aquesta disminució és menys acusada que amb el traçador marcat amb fluoresceïna (veure apartat 4.2.1.1).

Els valors de IC_{50} aconseguits amb el traçador marcat amb fluoresceïna

foren 31,8 i 62,6 µg/L per al 15% i 40 % en metanol, respectivament. En canvi, quan s'utilitzà com a marcador el 6-FAM els valors de IC₅₀ foren de 18,26 i 19,89 per al 15% i 40% en metanol, respectivament.

Taula 43 - Característiques analítiques pel sistema atrazina amb l'immunosensor en medi orgànic

<i>Fase estacionària</i> <i>ADS C18</i>	<i>IC₅₀</i> <i>(µg/L)</i>	<i>LD</i> <i>(µg/L)</i>	<i>Interval de treball</i> <i>(µg/L)</i>	<i>RSD</i> <i>(%)</i>
<i>Dissolvent</i>				
15% Acetonitril	17,46	0,74	2,65 – 100,9	12,8
15% 2-propanol	12,18	0,62	1,28 – 115,4	1,9
15% Metanol	18,26	0,87	4,33 – 67,3	2,4
40% Metanol	19,89	0,23	0,52 – 216,7	2,7

Després d'analitzar tots els paràmetres que afecten a la competició, les condicions òptimes d'assaig establertes foren:

Fase estacionària	ADS C18
Fase mòbil	PBS 2x, pH 7
Cabal	0,5 mL/min
Detecció	Fluorescent ($\lambda_{\text{excitació}}$ 495 nm i $\lambda_{\text{emissió}}$ 525 nm)
Volum d'injecció:	20 µL
Ús de dissolvents:	Metanol fins a un 40% (v/v) (quan sigui necessari)

Si analitzem les característiques analítiques de l'assaig quan s'utilitza el traçador marcat amb 6 FAM (SYM29-6FAM), aquestes són molt similars a les obtingudes amb el traçador marcat amb fluoresceïna (SYM 18). Així, per a la determinació d'atrazina en aigua es podran usar indistintament tots dos traçadors, tant per al cas d'aigües de rec com per al de EDAR,

encara que per a la determinació en aigües potables caldrà realitzar una etapa de preconcentració prèvia de les mostres.

Així doncs, a la vista dels resultats obtinguts s'ha pogut demostrar el caràcter general de la via de marcatge de fluoròfors a haptens, ja que el sistema permetria l'assaig multianàlit, utilitzant diferents immunoreactius i realitzant la detecció a diferents longitud d'ona.

4.5.5 Anàlisi de mostres d'aigües superficials

El sistema amb el traçador 2d-SYM29-6FAM es va aplicar també a la determinació d'atrazina en mostres d'aigua de riu de la llera del Túria utilitzant l'immunosensor desenvolupat. Com mostra la Taula 44, no s'observà la presència d'atrazina en cap de les mostres natives ($<LD$, $0,23 \mu\text{g/L}$) i fou necessari dur a terme una preconcentració de les mostres. Per això es va utilitzar el sistema de dues fases estacionàries ADS en sèrie, seguint el procediment descrit en l'apartat 4.7. Es van analitzar deu mostres d'aigua natives i fortificades a una concentració d'atrazina de $0,075 \mu\text{g/L}$.

Els resultats obtinguts (Taula 44) indiquen que les recuperacions foren bones; oscil·laren entre 85,6% (mostra M1) i 104,7% (mostra M3), amb valors acceptables de RSD(%).

Taula 44 - Anàlisi dels extractes de les mostres de riu mitjançant l'immunosensor

Mostres	[Atrazina] addicionada (µg/L)	[Atrazina] recuperada ^a (µg/L)	RSD (%)	Recuperació (%)
M1	0	<LD	-	-
	0,075	0,064 ± 0,004	6,4	85,2
M2	0	<LD	-	-
	0,075	0,073 ± 0,002	2,6	97,6
M3	0	<LD	-	-
	0,075	0,079 ± 0,006	7,3	104,7
M4	0	<LD	-	-
	0,075	0,07 ± 0,01	15,5	95,2
M5	0	<LD	-	-
	0,075	0,06 ± 0,01	16,5	85,4
M6	0	<LD	-	-
	0,075	0,076 ± 0,008	10,0	100,8
M7	0	<LD	-	-
	0,075	0,075 ± 0,002	3,2	99,7
M8	0	<LD	-	-
	0,075	0,068 ± 0,009	12,9	90,8
M9	0	<LD	-	-
	0,075	0,069 ± 0,006	8,7	92,5
M10	0	<LD	-	-
	0,075	0,072 ± 0,009	13,0	95,8

^a Mitjana ± SD n: 6

4.6 IMMUNOSENSOR H-H PEL SULFATIAZOLE

L'experiència adquirida en el desenvolupament de l'immunosensor H-H utilitzant l'atrazina com a anàlit model es va aplicar a un altre contaminant orgànic d'estructura diferent amb l'objectiu d'estudiar el seu comportament i establir què passa quan es canvia el sistema. Es tracta, en el fons, de conèixer si el sistema immunosensor manté les seves prestacions en canviar d'anàlit. Per aquesta finalitat es va seleccionar el sulfatiazole, un antibiòtic de la família de les sulfonamides, ja que es disposava d'un conjunt de vuit anticossos policlonals de conill i quatre haptens competidors per aquest compost. Inicialment l'optimització de l'immunosensor es va realitzar amb els immunorreactius que proporcionaren els millors resultats en ELISA [133], els haptens anomenats S3 i S4 i els anticossos S3-I i S4-I (obtinguts mitjançant els immunogens S3-BSA i S4-BSA, respectivament).

El primer pas fou la síntesi i purificació dels nous traçadors. Aquests es prepararen per conjugació dels haptens S-3 i S-4 amb l'oligonucleòtid SYM18 marcat amb una i tres fluoresceïnes (SYM 18-1FI i SYM 18-3FI).

Posteriorment es va optimitzar l'immunoassaig, i es va estudiar la seva especificitat i tolerància a dissolvents orgànics.

Finalment, es va aplicar a la determinació de residus de sulfatiazole en mostres d'aigua.

4.6.1 Síntesi i purificació dels traçadors

En la síntesi dels traçadors es va utilitzar el mètode de l'èster actiu descrit anteriorment (apartat 3.3). Quan s'utilitzà el mètode de l'anhidre mixt, i igual com succeí en el cas de l'atrazina, no s'aconseguí la conjugació del traçador.

Per a la purificació dels traçadors (S4-SYM 18 1FI, S4-SYM 18 3FI i S3-SYM 18 1FI, S3-SYM 18 3FL) es van realitzar assaigs similars als duts a terme amb el traçador de l'atrazina. Inicialment es va utilitzar tampó fosfat en mode gradient de força iònica en funció del temps, addicionant NaCl 0,8 N. Els resultats no foren els esperats, ja que no es produïa l'elució del traçador ni de l'oligonucleòtid. Per això es va modificar la fase mòbil addicionant acetonitril entre 0,5% a 20%. Així s'obtingué una bona separació, amb les següents condicions:

Fase mòbil A: 10% ACN 90% PBS 0,02M, pH 7

 B: 10% ACN 90% PBS 0,02M, pH 7 amb 0,8 N NaCl

En aquestes condicions, l'oligo SYM18-1FI eluí a un tr 12,8 min (Figura 58). El traçador S4-SYM18-1FI eluí a un tr 20,4 min i el S3-SYM18-1FI a tr 16,8 min, tal com mostren les Figures 59 i 60

Seguidament es van recollir les fraccions del conjugats de S4-SYM18-1FI i S3-SYM18-1FI entre 16 i 23 min, i es va eliminar l'acetonitril sota corrent de N₂.

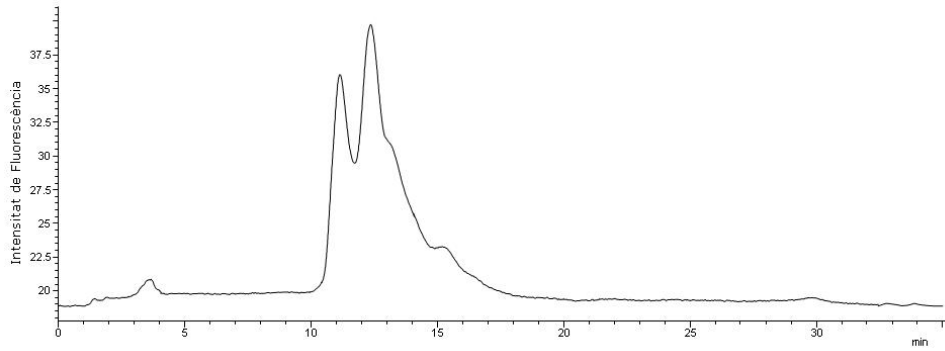


Figura 58 - Cromatograma de l'oligonucleòtid SYM18-1Fl

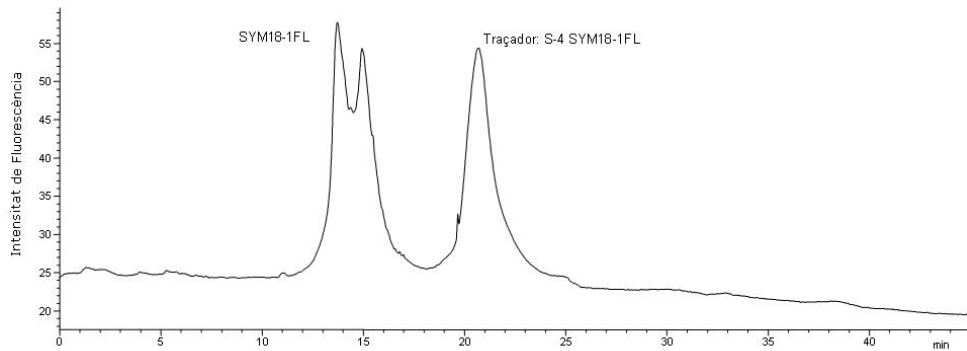


Figura 59 - Cromatograma dels productes de la reacció de conjugació de l'oligonucleòtid SYM18-1Fl a l'haptè S4

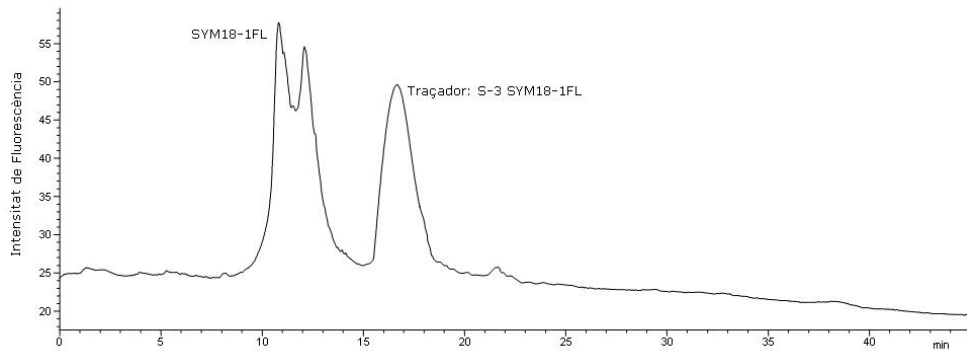


Figura 60 - Cromatograma dels productes de la reacció de conjugació de l'oligonucleòtid SYM 18-1Fl a l'haptè S3

Les purificacions dels traçadors S-4 i S-3 i de l'oligonucleòtid SYM18-3FI es van realitzar utilitzant les condicions establertes anteriorment per traçadors amb 1FI (S-4 SYM18-1FI i S-3 SYM18-1FI), però els resultats no foren satisfactoris. Així doncs, fou necessari realitzar un ajust del percentatge d'acetonitril de manera que la fase mòbil que proporcionà els millors resultats fou:

Fase mòbil A: 20% ACN 80% PBS 0,02M, pH 7

B: 20% ACN 80% PBS 0,02M, pH 7 amb 0,8 N NaCl

Les Figures 61, 62 i 63 mostren els cromatogrames corresponents a l'oligonucleòtid lliure marcat amb 3 fluoresceïnes i els conjugats als haptens S4 i S3, respectivament. En aquestes condicions, l'oligo SYM18-3FI eluí a un tr 46,2 min mentre els traçadors S4-SYM18-3FI ho foren a un tr 76,3 i el S3-SYM18-3FI a tr 74,7 min.

Finalment es va recollir la fracció del conjugat, en aquest cas entre 72 i 82 min, es va eliminar el acetonitril sota corrent de N₂ i es guardà en nevera en alíquotes de 500 µL .

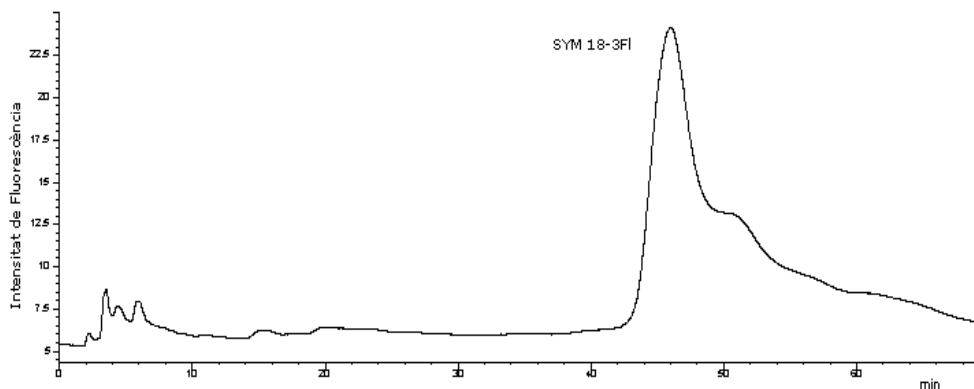


Figura 61 - Cromatograma de l'oligonucleòtid SYM18-3FI

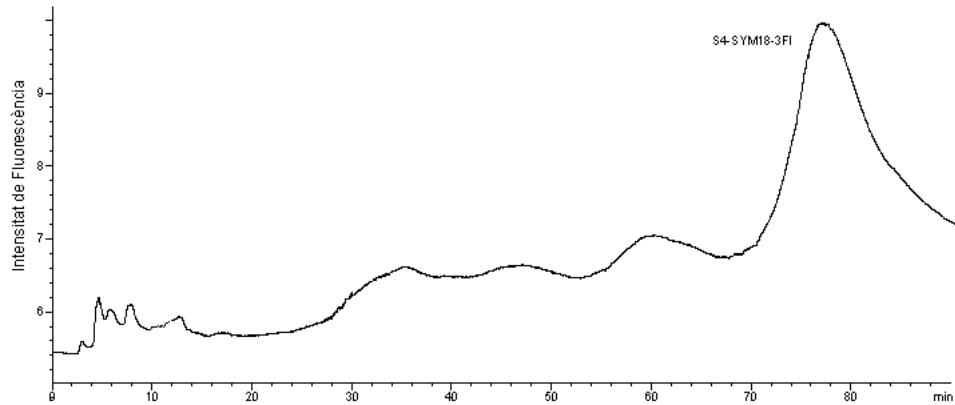


Figura 62 - Cromatograma dels productes de la reacció de l'oligonucleòtid SYM 18-3FI amb l'haptè S4

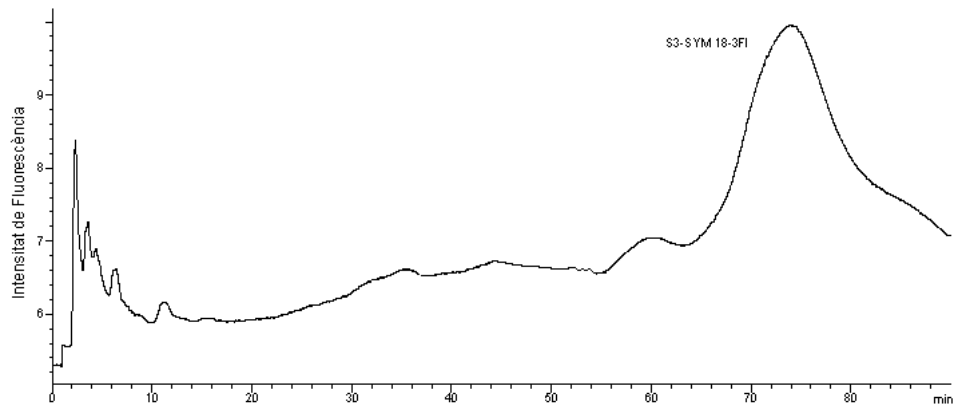


Figura 63 - Cromatograma dels productes de la reacció de conjugació de l'oligonucleòtid SYM 18-3FI amb l'haptè S3

4.6.2 Optimització de l'immunoassaig

Els traçadors purificats es van injectar en les dues fases estacionàries ADS (C18 i C4) per tal de comprovar el percentatge de cadascun que queda retingut. Els resultats (Taula 45) obtinguts foren similars als assolits amb el traçador 2d-SYM18-1FI i 2d-SYM18-3FI per a l'atrazina.

Taula 45 - Percentatge de traçador que es reté de les fases estacionàries ADS

Traçadors	ADS C18 (%)	ADS C4 (%)
S4-SYM 18-1FI	98	96
S4-SYM 18-3FI	95	94
S3-SYM 18-1FI	97	96
S3-SYM 18-3FI	94	94

Es van assajar diferents dissolucions (d'entre 1/2 i 1/10 (v/v)) de tots els traçadors purificats (amb una i tres fluoresceïnes) i dels dos anticossos S4-I i S3-I d'entre 1/5000 i 1/50 (v/v), respectivament, per tal d'ajustar i optimitzar la concentració de traçador i d'anticòs de manera que s'obtingueren senyals absoluts de magnitud acceptable.

En primer lloc, i amb la finalitat d'analitzar el comportament dels immunoreactius (anticòs i traçador) en els suports ADS, els assaigs es van dur a terme sense anàlit, és a dir sense que es produís la reacció de competició, mitjançant una vàlvula de 6 vies i seguint el procediment establert en l'apartat 4.2.1.1.

Pels traçadors S3-SYM18-1FI i S4-SYM 18-1FI la dilució òptima fou de 1/2 (v/v), i el doble (1/4 v/v) pels traçadors S3-SYM18-3FI i S4-SYM18-3FI. En la formació de l'immunocomplex la mínima concentració d'anticòs (S4-I i S3-I) que proporcionava un senyal pràcticament equivalent al generat "sense columna" fou de 1/100. Així doncs, s'establí aquesta com a òptima.

Es va procedir a optimitzar la composició de la fase mòbil utilitzant les concentracions d'immunoreactius seleccionades (traçador S-4 SYM18 1FI a una dilució 1/2 (v/v) i l'anticòs S4 I a una dilució 1/100 (v/v)).

A un cabal constant de 0,5 mL/min, es van realitzar corbes de competició emprant diferents concentracions de tampó PBS d'entre 0,5x i 3x, i pH entre 6,5 a 8 (Figura 64). Les condicions òptimes (IC_{50} inferior) es van aconseguir amb PBS 0,5x i pH 7,5.

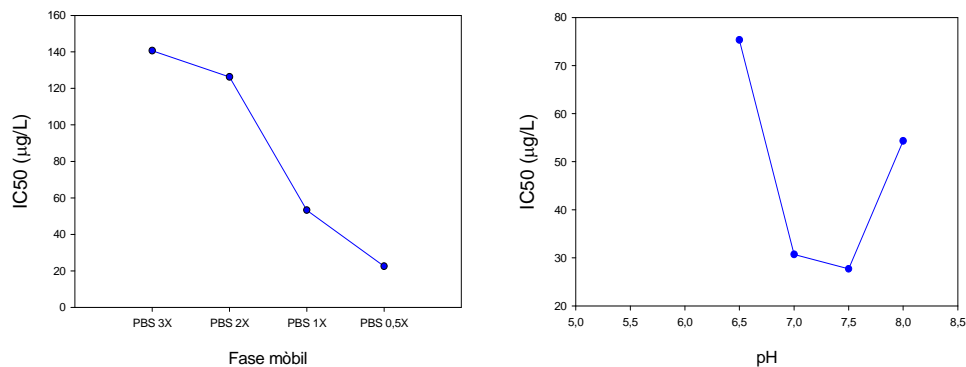


Figura 64 - Valors de IC_{50} (µg/L) a diferents combinacions de fase mòbil i pH

Així doncs, les condicions òptimes per a l'immunoassaig foren:

Dissolució de traçador	S-4 SYM18-1FI i S-3 SYM18-1FI ½ (v/v)
	S-4 SYM18-3FL i S-3 SYM18-3FI 1/4 (v/v)
Dissolució d'anticòs	1/100 (v/v)
Fase mòbil	PBS 0,5x, pH 7,5
Cabal	0,5 mL/min

En aquestes condicions es va dur a terme la reacció de competició, en primer lloc amb la fase estacionària ADS C18, utilitzant els dos anticossos S3-I i S4-I i els quatre traçadors.

En general i amb independència de l'anticòs (S4 I o S3 I) i de la reacció de marcatge de l'oligo (1FI i 3FI), els millors resultats en relació a la sensibilitat (valors inferiors de IC_{50}) es van obtenir amb els traçadors provinents de la conjugació amb l'haptè S4 (Figura 65). La millor sensibilitat (Figura 65a) es va aconseguir amb l'anticòs S4-I (IC_{50} de 28,6 i 3,99 $\mu\text{g/L}$ pels traçadors S4-SYM18-1FI i S4-SYM18-3FL, respectivament), mentre que amb l'anticòs S3-I (Figura 65b), la sensibilitat disminuï fins una IC_{50} de 43,6 i 16,8 $\mu\text{g/L}$ per S4-SYM18-1FI i S4-SYM18-3FL, respectivament. Per tant es va elegir la combinació dels traçadors formats per l'haptè S4 i l'anticòs S4-I.

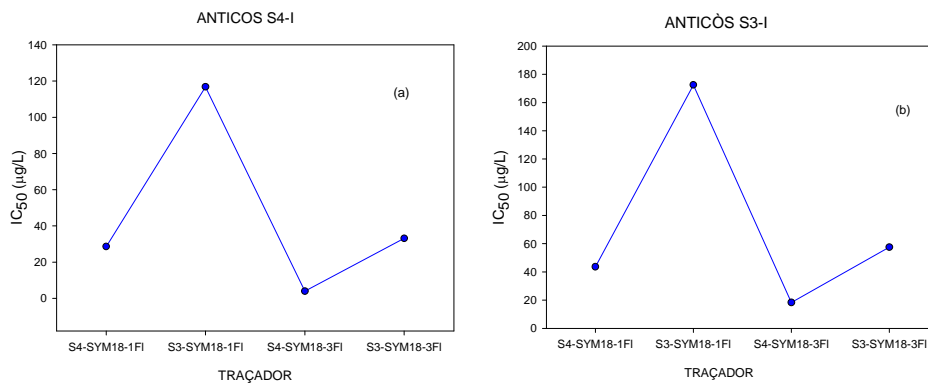


Figura 65 - Valors de IC_{50} ($\mu\text{g/L}$) a diferents combinacions de traçadors i anticossos (a) S4-I (b) S3-I

Un cop escollida la millor parella haptè-anticòs, es va dur a terme un estudi amb la finalitat d'establir la fase estacionària més idònia. Per a fer-

ho es va utilitzar en primer lloc l'haptè de menor relació de marcatge. En la Taula 46 es recullen les característiques analítiques de l'immunoassaig pel sulfatiazole; en funció de la fase estacionària utilitzada i atenent al valor IC_{50} la major sensibilitat s'aconsegueix amb la fase estacionària C18 (28,6 $\mu\text{g/L}$). Aquest valor fou gairebé el triple (92,2 $\mu\text{g/L}$) en la fase estacionària C4 (Figura 66).

Taula 46 - Característiques analítiques per al sistema sulfatiazole amb l'immunosensor utilitzant el traçador marcat amb una fluoresceïna

Fase estacionària	IC_{50} ($\mu\text{g/L}$)	LD ($\mu\text{g/L}$)	Interval de treball ($\mu\text{g/L}$)	RSD (%)
ADS C18	28,6	0,85	3,9 – 181,0	6,8
ADS C4	92,2	0,54	9,3 – 609,7	8,3

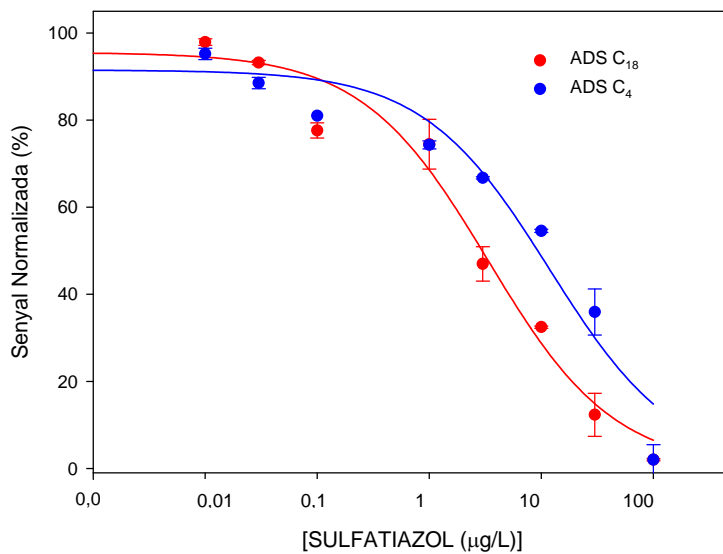


Figura 66 - Corbes de calibratge de sulfatiazole obtingudes amb l'immunosensors utilitzant l'anticòs S4-I i el traçador S4-SYM 18-1FI

L'estudi realitzat utilitzant el traçador amb més relació de marcatge (3FI) indicà que la sensibilitat era millor a l'obtinguda amb 1FI. Les corbes de calibratge per a sulfatiazole realitzades utilitzant els suports C18 i C4 es mostren en la Figura 67 i Taula 47. S'observa que el menor valor de IC_{50} (28,6 $\mu\text{g/L}$) s'aconsegueix en utilitzar la fase estacionària ADS C18.

En aquest cas, els valors de IC_{50} assolits foren similars als que s'havien obtingut amb l'immunosensor de captura. A més, presenta l'avantatge addicional que el temps d'assaigs per a l'immunosensor H-H fou de 2 min, mentre que pel sensor captura era de 18 min en format estàndard i 8,5 min en format accelerat.

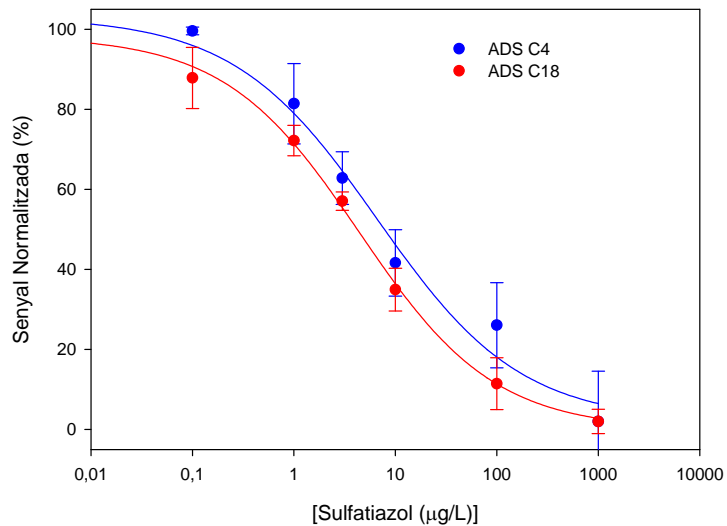


Figura 67 - Corbes de calibratge del sulfatiazole amb d'immunosensor utilitzant l'anticòs S4-I i el traçador S-4 SYM 18 3FI

Taula 47 - Característiques analítiques pel sistema Sulfatiazole amb l'immunosensor utilitzant el traçador marcat amb 3 fluoresceïnes

<i>Fase estacionària</i>	<i>IC₅₀ (µg/L)</i>	<i>LD (µg/L)</i>	<i>Interval de treball (µg/L)</i>	<i>RSD (%)</i>
ADS C18	3,99	0,11	0,46 – 34,5	7,9
ADS C4	7,77	0,29	0,89 – 77,0	15,8

A la vista dels resultats obtinguts es seleccionaren com a òptimes les següents condicions d'assaigs:

Fase estacionària	ADS ADS C18
Fase mòbil	PBS 0,5x, pH 7,5
Cabal	0,5 mL/min
Detecció:	Fluorescent ($\lambda_{\text{excitació}}$ 495 nm i $\lambda_{\text{emissió}}$ 519 nm)
Volum d'injecció:	20 µL
Traçador:	S4-SYM 18-3FI dilució 1:4 (v/v)
Anticòs:	S4-I dilució 1/100 (v/v)

4.6.3 Selectivitat. Reactivitat entrecruada.

La selectivitat de l'immunoassaig pel sulfatiazole es va avaluar determinant la reactivitat entrecruada (RC) que presenten un conjunt de compostos de la família de les sulfonamides.

Tal com mostra la Taula 48, la selectivitat és elevada per a la majoria de les sulfonamides assagades. Així doncs, solament dos compostos presenten valors de RC > 10%, la sulfadimetoxina (23,2%) i la sulfametazina fou (16,8%).

Taula 48 - Selectivitat dels compostos relacionats amb sulfatiazole

Compost	IC ₅₀ (µg/L)	RC (%)
Sulfatiazole	3,99	100
Sulfacetamida	> 1000	< 0,1
Sulfametazina	23,7	16,8
Sulfisoxazol	> 1000	< 0,1
Sulfametoxipiridazina	54,7	7,1
Sulfapiridina	> 1000	< 0,1
Sulfametizol	> 1000	< 0,1
Sulfametoxazol	> 1000	< 0,1
Sulfaguanidina	> 1000	< 0,1
Sulfamerazina	> 1000	< 0,1
Sulfadiazina	> 1000	< 0,1
Sulfasalazina	> 1000	< 0,1
N4- Ftalilsulfatiazol	65,2	6,1
Sulfanilamida	> 1000	< 0,1
Sulfadimetoxina	17,15	23,2

4.6.4 Estudi de la influència dels dissolvents orgànics en l'immunassaig

Es van dur a terme assaigs amb metanol, 2-propanol i acetonitril en un interval de concentració de 0% a 80%, utilitzant la fase estacionària (ADS C18) seleccionada com a òptima, amb la finalitat de determinar la tolerància de l'immunoassaig als dissolvents orgànics.

En primer lloc es va estudiar la influència dels dissolvents en la retenció del traçador (Figura 68a), i s'observà que a mesura que augmenta la

concentració de dissolvent en la fase mòbil disminueix el percentatge de traçador que queda retingut dins la fase estacionària, encara que no hi ha diferències significatives en funció del tipus de dissolvent.

Pel que fa a l'estabilitat de l'immunocomplex, fou el metanol el dissolvent millor tolerat, ja que fins a un 40% de metanol el senyal de l'immunocomplex va disminuir fins a un 80%. Per tant aquest es va fraccionar un 20%, mentre que en aquest mateix percentatge disminueix fins 17,8% i 9,5%, en 2-propanol i acetonitril, respectivament. Així doncs, l'immunocomplex es va fraccionar en aquest cas en un 81% en propanol i 95% en 2- i acetonitril (Figura 68 b).

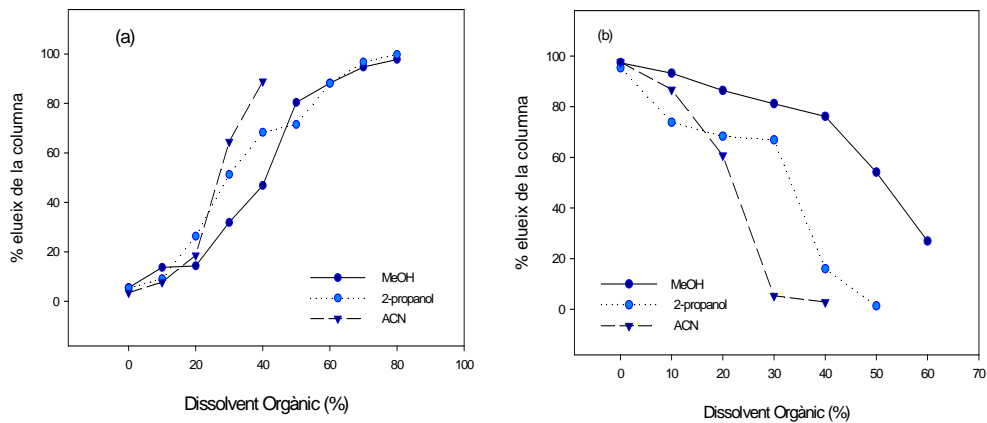


Figura 68 - Influència del dissolvent orgànic en l'immunoassaig. Percentatge de traçador(a) i percentatge de immunocomplex (b) que elueix de la fase estacionària

Posteriorment es van realitzar corbes de calibratge utilitzant concentracions de dissolvent orgànic en dissolució del 20% i 40%. En la

Figura 69 s'observa que amb acetonitril, no es produí competició en cap del dos percentatges.

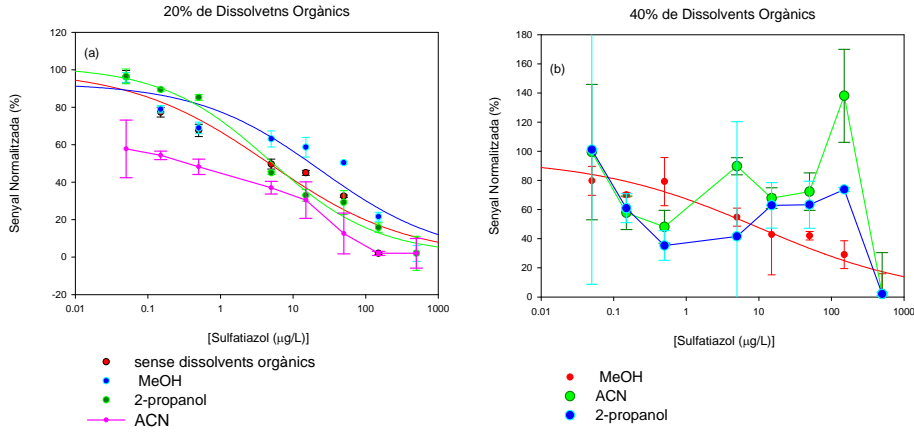


Figura 69 - Corbes de calibratge del Sulfatiazolede l'immunosensor en presència de dissolvent orgànic (20% i 40%)

No s'observen diferències significatives entre l'ús del metanol i 2-propanol a percentatges del 20%. Els valors de IC_{50} obtinguts foren similars als absoluts sense modificador orgànic, encara que els LD foren superiors quan s'usà dissolvent. Quan la competició es realitzà amb un 40% de dissolvent en dissolució, només es produí la competició en medi metanòlic, encara que amb una notable disminució de la sensibilitat (Taula 49), passant d'un IC_{50} de 7,5 µg/L (5% en metanol) a 27,4 µg/L (20% en metanol).

Taula 49 – Característiques analítiques pel sistema sulfatiazole amb immunosensor en medi orgànic

	IC_{50} ($\mu\text{g/L}$)	LD ($\mu\text{g/L}$)	Interval de treball ($\mu\text{g/L}$)	RSD (%)
20% Acetonitril	-	-	-	-
20% 2-propanol	5,18	0,15	0,52 - 58,8	1,5
20% Metanol	7,43	0,38	0,13 – 310,5	2,8
40% Metanol	27,4	0,51	0,65 – 273,4	12,7

Així doncs, els paràmetres òptims de treball par a la determinació de sulfatiazole utilitzant el sensor H-H són els següents:

Fase estacionària	ADS C18
Fase mòbil	PBS 0,5x, pH 7,5
Cabal	0,5 mL/min
Detecció	Fluorescent ($\lambda_{\text{excitació}}$ 495 nm i $\lambda_{\text{emissió}}$ 519 nm)
Volum d'injecció	20 μL
Traçador	S4-SYM 18-3Fl: Dilució 1/4 (v/v)
Anticòs	S4-I: Dilució 1/100 (v/v)
Ús de dissolvents	Metanol fins al 40% (quan sigui necessari)

4.6.5 Anàlisi de mostres fortificades i mostres d'aigües superficials

L'immunosensor desenvolupat es va aplicar a la determinació de sulfatiazole en 10 mostres d'aigua mineral de diferent procedència, les característiques de les quals figuren en la Taula 50.

Com en el cas de la determinació d'atrazina en mostres d'aigua mineral, fou necessari dur a terme la preconcentració de l'anàlit. Per aquesta finalitat s'emprà una columna C18 que es connectà en sèrie amb immunosensor format per una columna també C18, on es produeix la separació del productes de la immunoreacció.

A diferència de l'anàlisi d'atrazina, en aquest immunosensor s'emprà un suport C18, ja que amb aquesta fase s'aconseguien els resultats més sensibles.

Per a realitzar l'assaig, 100 mL de cada una de les mostres d'aigua, foren fortificades amb Sulfatiazole(0,2 µg/L).

Les mostres natives i fortificades es van injectar (2 mL/min) a través d'una fase estacionària ADS C18 i seguidament es van eluir amb 0,2 mL de metanol. Als extractes obtinguts se'ls ajustà la força iònica, pH i la concentració de metanol al 40%. Posteriorment s'addicionaren els immunoreactius i, finalment, la mescla s'injectà en la segona fase estacionària ADS C18, on es va produir la immunoseparació.

Com mostra la Taula 51, no s'observà la presència de Sulfatiazole en cap de les mostres natives (<LD, 0,05 µg/L). Els resultats de l'anàlisi de les 10 mostres fortificades mitjançant l'immunosensor H-H desenvolupat foren excel·lents, amb recuperacions entre 90,5 i 114,7%, i una precisió de les mesures (SRD < 115 %)

comparables a les obtingudes en la determinació de sulfatiazole en el sensor de captura, (SRD < 118 %).

Taula 50 – Característiques de les aigües anàlitzades en el sensor

<i>Mostra</i>	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
<i>Origen</i>	Badajoz	Jaen	Valencia	Pirineus	Pirineus	Astúries	Segòvia	Conca	Granada	Barcelona
<i>Composició (mg/L)</i>										
<i>Na⁺</i>	5	1,3	18,6	5	1,5	13	1	0,8	4,8	5,3
<i>Ca²⁺</i>	3	77,8	88,7	78	3	69	4	65,4	27,2	3
<i>Cl⁻</i>	-	2,7	35,8	4,5	0,6	8,7	< 1	2,1	2,8	4,6
<i>K⁺</i>	-	0,3		1	0,4	3,9	-	0,4	< 1	1,1
<i>Mg²⁺</i>	3	37,1	23,4	24	0,6	10,4	2	17,0	8,8	3,1
<i>HCO₃⁻</i>	18	465,4	297,2	357	5,2	208	18	268,8	105	18
<i>SO₄²⁻</i>	-	14,9	43,9	10	8,7	54,5	-	19,2	17,3	4
<i>NO₃⁻</i>	-	-	-	3,8	<1	-	2,8	-	5,8	1,2
<i>RS</i>	58	340,7	-	309	28	311	26	238	131	58

RS- Residu sec

Taula 51 – Recuperacions obtingudes en l'anàlisi d'aigües utilitzant l'immunosensor sulfatiazole

Mostres	[Sulfatiazole] addicionat ($\mu\text{g/L}$)	[Sulfatiazole] recuperat^a ($\mu\text{g/L}$)	RSD (%)	Recuperació (%)
M1	0	< LD		
	0,2	0,23 \pm 0,06	27,41	114,7
M2	0	< LD		
	0,2	0,18 \pm 0,03	16,93	90,5
M3	0	< LD		
	0,2	0,21 \pm 0,09	41,83	105,0
M4	0	< LD		
	0,2	0,20 \pm 0,05	26,37	100,3
M5	0	< LD		
	0,2	0,19 \pm 0,03	17,73	94,6
M6	0	< LD		
	0,2	0,22 \pm 0,03	12,06	110,4
M7	0	< LD		
	0,2	0,21 \pm 0,08	36,09	106,7
M8	0	< LD		
	0,2	0,20 \pm 0,04	17,59	101,9
M9	0	< LD		
	0,2	0,21 \pm 0,05	23,01	104,3
M10	0	< LD		
	0,2	0,20 \pm 0,02	10,52	100,8

^a Mitjana \pm SD n=6

Finalment, l'immunosensor desenvolupat es va aplicar a la determinació de sulfatiazole en 8 mostres d'aigua de EDAR. Les mostres es van filtrar per gravetat mitjançant un filtre Watman nº 2, abans d'injectar-les a la columna de preconcentració ADS C18 per evitar obturacions i

sobrepressions en el sistema. En aquest cas es va seguir el mateix procediment que amb les mostres d'aigua utilitzades anteriorment (apartat 4.4.2). La presència de sulfatiazole no es va detectar en cap de les mostres analitzades (<LD, 0,05 µg/L).

Així doncs les condicions òptimes per l'assaig amb l'immunosensor H-H són:

Fases estacionàries en sèrie	ADS C18 - ADS C18	
Immunoreactius	Traçador Anticòs	S4-SYM18-3Fl: Dilució de 1/4 (v/v) KHL 2d IV: Dilució de 1/100 (v/v)
Fase mòbil	PBS 0,5x, pH 7,5	
Volum mostra	100 mL	
Preconcentració: Columna C18	Cabal d'injecció Cabal d'elució	2 mL/min 0,5 mL/min
Immunosensor: Columna C4	Cabal d'injecció	0,5 mL/min
Ús de dissolvents	Metanol fins al 40% (quan sigui necessari)	

En resum, com mostren els resultats obtinguts, l'aplicació de l'immunosensor H-H utilitzant les dues fases estacionàries en sèrie permet la determinació de sulfatiazole en aigües tant minerals com procedents de EDAR a nivells < LD: 0,003 µg/L.

CONCLUSIONS

5. CONCLUSIONS

- La metodologia que s'ha desenvolupat ha permès la determinació ràpida de residus en aigua en temps real a nivells de $\mu\text{g/L}$.
- El format d'assaig ha utilitzat de forma satisfactòria suports d'accés restringit (RAM) per a aconseguir la separació dels productes de la immunoreacció. Les columnes ADS C18 i C4 han resultat ser les òptimes per a l'immunosensor.
- S'ha establert una via de marcatge de fluoròfors a haptens amb caràcter general basada en la utilització d'oligonucleòtids derivatitzats amb un fluorofor. Aquest fet ha resolt els problemes de marcatge utilitzant haptens.
- S'ha optimitzat un mètode analític mitjançant HPLC per a la purificació del traçador. Aquest mètode aconsegueix un traçador amb el grau de puresa suficient per a poder ser utilitzat en immunoassaig.
- L'immunosensor desenvolupat suporta una concentració màxima de metanol del 40%, sense afectar significativament l'assaig.
- La utilització de dues columnes en sèrie i del traçador amb més relació de marcatge millora la sensibilitat de l'assaig, de forma que s'aconsegueix determinar l'atrazina en aigües per sota els LMR.
- L'immunosensor H-H s'ha aplicat amb resultats satisfactoris a dues famílies de compostos (triazines i sulfonamides) demostrant l'aplicabilitat en aigua, sense necessitat d'efectuar tractament de la mostra.

- El sistema sensor desenvolupat recull els avantatges dels mètodes immunoquímics amb els materials d'accés restringit en un sistema automatitzat que permet elevada sensibilitat, gran capacitat de treball, simplicitat operativa i incorporació en línia.

BIBLIOGRAFIA

6 BIBLIOGRAFIA

- 1 Paustenbach D. J., *J. of Toxicol. Environ. Health* 3 (2000) 179
- 2 Petrisor I. G., *Environ. Forensics* 5 (2004) 185
- 3 Richardson S. D., *Anal. Chem.* 79 (2007) 4295
- 4 <http://www.epa.gov/international/toxics>
- 5 Petrovic M., Gonzalez S., Barceló D., *Trends Anal. Chem.* 22 (2003) 685
- 6 Gijs A., Hans K., Marvin J.P., *Food Chem. Toxicol.* 47 (2009) 1022
- 7 Calabuig J.A., *Medicina General y Toxicología*, 5ª Edición, Ed. Masson S.A., Barcelona, 2000
- 8 Amdur M.O., Doull J., Klaasen C.D., Casarett D., *Toxicology Basic Science of Poissons*, Ed. Pergamon Press, New York, 1991
- 9 Niesink R.J.M., De Vries J., Hollinger M.A., *Toxicology. Principles and Applications*, CRC Press Inc., Boca Raton, Florida, 1996
- 10 Quintana J. B., Rodil R., Muniategui-Lorenzo S., López-Mahía P., Prada-Rodríguez D., *J. Chromatogr. A* 1174 (2007) 27
- 11 la Torre A., Malmqvist A., Lacorte S., Welander T., Barceló D., *Environ. Pollution* 147 (2007) 648
- 12 Ahmed F. E., *Trends Anal. Chem.* 22 (2003) 170

- 13 Pichon V., *J. Chromatogr. A* 885 (2000) 195
- 14 Radjenović J., Petrović M., Barceló D., Petrović M., *Trends Anal. Chem.* 26 (2007) 1132
- 15 Wen Y., Feng Y. Q., *J. Chromatogr. A* 1160 (2007) 90
- 16 Shelver W. L., Parrotta C. D., Slaweki R., Li Q. X., Ikonomou M. G., Barcelo D., Lacorte S., Rubio F., *Chemosphere* 73 (2008) S18
- 17 Farré M., Kantiani L., Barceló D., *Trends Anal. Chem.* 26(11) (2007) 110
- 18 Rogers K.R., Koglin E.N. Biosensors for Direct Monitoring of Environmental Immunochemical Analysis. EPA 7540/R-94/509
- 19 Hasan J., Technologies and Techniques for Early Warning Systems to Monitor and Evaluate Drinking Water Quality: A State-of-the-Art Review EPA/600/R-05/156
- 20 Trapani J.A., Browne K.A., Dawson M., Smyth M., *J. Biochem. Biophys. Research Communications*, 195(2) (1993) 910
- 21 Hock B., Dankwardt A., Kramer K., Marx A., *Anal. Chim. Acta* 311 (1995) 393
- 22 Farré M., Barceló D., *Food Toxicol. Anal.* 8 (2007) 599
- 23 Masqué N., R. M. Marcé R. M., Borrull F., *Trends Anal. Chem.* 20 (2001) 477
- 24 Byfield M.P., Abuknesha R.A., *Biosens. Bioelectron.* 9 (4-5) (1994) 373
- 25 North J.R., *Trends Biotech.* 3(7) (1985) 180
- 26 Marco M.P., Gee S., Hammock B.D., *Trends Anal. Chem.* 14,

- (1995) 34
- 27 Velasco-García M., Mottram T., *Biosystems Engineering* 84 (2003) 1
- 28 Burdon R.H., Knippenberg P.H., *Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology* 15 (1985) 235
- 29 Gonzalez-Martinez M.A., Puchades R., Maquieira A., *Anal. Bioanal. Chem.* 387 (2007) 205
- 30 Wittman C., Schmid R.D., *J. Agric. Food Chem.* 42 (1994) 1041
- 31 Klein M., Kates R., Chucholowski N., Scmitt M., Lyden C. *Sens. Actuators B: Chem.* 27 (1995) 474
- 32 Mattiasson B., Hakanson H., *Adv. Biochem. Engin. Biotech.* 46 (1992) 81
- 33 Locascio-Brown L., Plant A.L., Chesler R., Kroll M., Ruddel M., Durst R.A., *Clin. Chem.* 64 (1993) 997
- 34 D'Souza S.F., *Biosen. Bioelectron.* 16 (2001) 337
- 35 Mello L.D., Kubota L.T., *Food Chem.* 77 (2002) 237
- 36 Gonzalez-Martinez M. A., Morais S., Maquieira A., Abad A., Montoya A., *Anal. Chem.* 69 (1997) 2812
- 37 Krämer P., Schmid R., *Biosens. Bioelectron.* 6 (1991) 239
- 38 González Martínez M. A., Desarrollo de inmunosensores en flujo aplicados a la determinación de residuos de plaguicidas Tesis doctoral, 1998, Universitat Politècnica de València.
- 39 Luppá P.B, Sokoll L.J., Chan D. W., *Clin. Chim. Acta* 314 (2001) 1

- 40 Taitt C.R., Anderson G.P., Ligler F.S., *Biosens. Bioelectron.* 12 (2005) 2470
- 41 Homola J., Yee S. S., Gauglitz G., *Sensors and Actuators B* 54 (1999) 3
- 42 Hock B., *Anal. Chim. Acta* 347 1-2 (1997) 177
- 43 IUPAC, *Pure Appl. Chem.* 71 (1999) 2189
- 44 Patel P.D., *Trends Anal. Chem.* 21(2)(2002) 96
- 45 Wang J., *Electroanalytical Techniques in Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, VCH Publisher, Inc. New Mexico, 1988, 49
- 46 Alcock S.J., Turner A.P.F., *In vivo Chemical Sensors: Recent developments*. Cranfield Press, Bedford, 1993
- 47 Jurkiewicz M., Alegret S., Almirall J., Garcia M., Fàbregas E., *Analyst* 123 (1998) 1321
- 48 Gonzalez-Martinez M.A., Puchades R., Maquieria A., Marco M.P., Barcelò D., *Environ. Sci. Technol.* 32 (1998) 3442
- 49 Gonzalez-Martinez M.A., Puchades R., Maquieria A., *Trens Anal. Chem.* 18 (1999) 204
- 50 Gonzalez-Martinez M.A., Puchades R., Maquieria A., *Food Technol. Biotechnol.* 35 (1997) 193
- 51 Torres P., Garcia-Mesa J.A., Luque de Castro M.D., Valcárcel M. Fresnius J., *Anal. Chem.* 346 (1995) 704
- 52 Brenes N., Quigley M.N., Reid W.S., *Anal. Chim. Acta* 310 (1995) 319

- 53 Boltovets P.M., Boyko V.R., Kostikov I.Y., Dyachenko N.S., Snopok, B.A., Shirshov Y.M., *J. Virol.* 105 (2002) 141
- 54 Wang J., Miniaturized DNA biosensor system for detecting *Cryptosporidium* in water samples. Technical completion report, (2000), New Mexico Water Research Institute, New Mexico State University
- 55 Guntupalli R., Lakshmanan R.S., Hu J., Huang T.S., Barbaree J.M., Vodyanoy B.A., Chin, *J. Microbiol.* 70(1) (2007) 112
- 56 Rasooly L., Rasooly, A., *J. Food Microbiol.* 49 (1999) 119
- 57 Zheng Y., Yang C., Pu W., Zhang J., *Food Chem.* 114(4) (2009) 1523
- 58 Ju H., Babu V., Kandimalla C., *Biosen. Biomed. App.* 31 (2008) 311
- 59 Torre-Nito A., Cruvinel P.E., Slaets J.F.W., Crestana S., *Appl. Eng. Agric.* 13(1) (1997) 115
- 60 Hong S., Kang T., Oh S., Moon J., Choi I., Choi K., Jongheop *Sens. Actuators B: Chem.* 134(1) (2008) 300
- 61 Saidman S.B., Lobo-Castañón M.J., Miranda-Ordieres A.J., Tuñón-Blanco, P., *Anal. Chim. Acta* 424 (2000) 45
- 62 Vrijheid M., *Environ. Health Perspec.* 108 (2000) 101
- 63 Barcelo D., *J. Chromatogr. A* 643 (1993) 117
- 64 Ellis J.B., *Environ. Pollution* 44 (1) (2006) 184
- 65 Gentili A., Perret D., Marchese S., *Trends Anal. Chem.* 24 (2005) 704

- 66 Armstrong J.L., Seidler R.J., *Appl. Environ. Microbiol.* 42 (1981) 277
- 67 Steinberg Ch., Lorenz R., Spieser O., *Water Research* 29(3) (1995) 981
- 68 Dewey S.L., *Ecology* 67 1 (1986) 148
- 69 Graymore M., Stagnitti F., Allinson G., *Environ. Internat.* 26 (2001) 483
- 70 Belluck D.A., Benjamin S.L., Dawson T., American Chemical Society, Washington (DC) (1991) 254
- 71 Brusick D.J., *Mutation Research Reviews in Genetic Toxicology*, 317 (1994) 133
- 72 Graymore M., Allison G., Allison M., Stagnitti F., Shibata Y., Morita M., *Toxicol. Environ. Chem.* 70 (1999) 427
- 73 Directiva 2000/60/EC. (2000) *J. Off. Eur. Commun.* L 327–22.12.2000:72
- 74 Reglament 149/2008/EC (2008) *J. Off. Eur. Commun.* L58-1
- 75 Directiva 839/2008/EC (2008) *J. Off. Eur. Commun.* L234
- 76 Barceló D., Petrovic M., *Emerging contaminants from industrial and municipal waste: occurrence, analysis and effects*, Springer Ed., Berlin 2008
- 77 Cserhádi T., Forgács E., Deyl Z., Miksik I., Eckhardt A., *Biomed. Chromatogr.* 18 (2004) 350
- 78 Pensabene J.W., Fiddler W., Donoghue D.J., *J. Agric. Food Chem.* 48 (2000) 1668

- 79 Chuang J.C., Hart K., Chang J.S., Boman L.E., Van Emon J.M., Reed A.W., *Anal. Chim. Acta* 444 (2001) 87
- 80 Balduini L., Matoga M., Cavalli E., Seilles E., Riethmuller D., Thomassin M., Guillaume YC., *J. Chromatogr. B* 794 (2003) 389
- 81 Vitali M. , Guidotto M., Giovinazzo R., Cedrone O., *Food Add. Contam.* 3 (1998) 280
- 82 Stajnbaher D., Zupancic-Krajc L., *J. Chromatogr. A* 1015 (2003) 185
- 83 Carabias-Martinez R., Rodriguez-Gonzalo R., Fernandez-Laespada E., Calvo-Seronero L., Sanchez San Roman F.J., *Water Research* 37 (2003) 928
- 84 Lin H-H, Sung Y-H., Huang S-D., *J. Chromatogr. A* 1012 (2003) 57
- 85 Ferrer I., Lanza F., Tolokan A., Horvath V., Sellergren B., Horvai G., Barcelo D., *Anal. Chem.* 72 (2000) 3934
- 86 Koeber R., Fleisher C., Lanza F., Boos K.S., Sellergren B., Barcelo D., *Anal. Chem.* 73 (2001) 2437
- 87 Carabias-Martinez R., Rodriguez-Gonzalo R., Paniagua-Marcos P.H., Herrero-Hernandez E., *J. Chromatogr. A* 869 (2000) 427
- 88 Carabias-Martinez R., Rodriguez-Gonzalo R., Fernandez-Laespada E., Sanchez San Roman F.J., *J. Chromatogr. A* 869 (2000) 471
- 89 Banerjee K., Oulkar D.P., Dasgupta S., Patil S.B., Patil S.H., Savant R., Adsule P.G., *J. Chromagr. A* 1173 (2007) 98
- 90 Hamada M., Winersteiger R., *J. Biochem. Biophys. Meth.* 53 (2002) 229

- 91 Silva C., Lima E.C., Tavareas M.F.M., *J. Chromatogr. A* 1014 (2003) 109
- 92 Frias S., Sanchez M.J., Rodriguez M.A., *Anal. Chim. Acta* 503 (2004) 271
- 93 Azevedo D.A., Lacorte S., Vinhas T., Viana P., Barcelo D., *J. Chromatogr. A* 879 (2000) 13
- 94 Fernández-Alba A. R., Juan F., García-Reyes G., *Trends Anal. Chem.* 27(11) (2008) 973
- 95 Panuwet P., Nguyen J.V., Kuklennyik P., Udunka S.O., Needham LL., Barr D.B., *Anal. Bioanal. Chem.* 391(5) (2008) 1931
- 96 Mallat E., Barceló D., Barzen C., Gauglitz G., Abuknesha R., *Trends Anal.Chem.* 20 (2001) 124
- 97 Baranowska I., Barchanska H., Abuknesha R.A, Price R.G., Stalmach A., *Ecotox. Environ. Safety* 70 (2008) 341
- 98 Scutaru B., Giersch T., Cozmei C., Hock B., *Toxicology* 127 (1998) 11
- 99 Frhekal M., KolG V., Eremin S.A., *Anal. Chim. Acta* 311 (1995) 349
- 100 Shimomura M., Nomura Y., Zhang W., Sakino M., Lee K-H., Ikebukuro K., Karube I., *Anal. Chim. Acta* 434 (2001) 223
- 101 Pividori M.I., Lermo A. , Zacco E., Hernández S., Fabiano S., Alegret S., *Thin Solid Films* 516 (2007) 284
- 102 Rodriguez-Mozaz S., Lopez de Alda M.J., Barceló D., *Talanta* 69 (2006) 377

- 103 Cummins C.M., Koivunen M.E., Stephanian A., Geeb S.J., Hammock B.D., Kennedy I.M., *Biosen. Bioelectron.* 21 (2006) 1077
- 104 Rani J. S., Borowsk E., Davidsson R., Tudorache M., Pontén E., Emnéus J., *Biosen. Bioelectron.* 19 (2004) 795
- 105 Tudorache M., Rak M., Wiczorek P., Emnéus J., *J. Immunol. Meth.* 284 (2004) 107
- 106 Bacigalupo M.A, Ibus A., Longhi R., Moroni G., *Talanta* 61 (2003) 539
- 107 Příbyl J., Hepel M., Halánek J., Skládal P., *Sensors and Actuators B* 91 (2003) 333
- 108 Fischer-Durand N., Vessiéres A., Heldt J-M., le Bideau F., Jaouen G., *J. Organometal. Chem.* 668 (2003) 59
- 109 Killard A.J., Micheli L., Grennan K., Franek M., Kolar V., Moscone D., Palchetti I., Malcolm R., Smyth M.R., *Anal. Chim. Acta* 427 (2001) 173
- 110 Schipper E.F., Bergevoet A.J.H., Kooyman R.P.H., Greve J., *Anal. Chim. Acta* 341 (1997) 171
- 111 Brecht A., Piehler J., Lang G, Gauglitz G., *Anal. Chim. Acta* 311 (1995) 289
- 112 Gentili A., Perret D., Marchese S., *Trends Anal. Chem.* 24 (2005) 704
- 113 Sarmah A.K., Meyer M.T., Boxall A.B.A., *Chemosphesre* 65 (2006) 725
- 114 Kolpin D.W., Furlong E.T., Meyer M.T., Thurman E.M., Zaugg

- S.D., Barber L.B., Buxton H.T., *Environ. Sci. Technol.* 36 (2002) 1202
- 115 Anadón A., Martínez-Larrañaga M.R., *Livest. Prod. Sci.* 59 (1999) 183
- 116 Blasco C., Picó Y., Torres C. M., *Trends Anal Chem* 2(9) (2007) 895
- 117 Schenck F.J., Callery P.S., *J. Chromatogr. A* 812 (1998) 99
- 118 Hoizey G., Lamiable D., Frances C., Trenque T., Kaltenbach M., Denis J., Millart H., *J. Pharm. Biomed. Anal.* 30 (2002) 661
- 119 Suhren G., Knappstein K., *Anal. Chim. Acta* 483 (2003) 363
- 120 Bompadre S., Ferrante L., Leone L., *J. Chromatogr. A* 812 (1998) 191
- 121 Sorensen L.K., Snor J., *J. Chromatogr. A* 882 (2000) 145
- 122 Abjean J.P., Lahogue V., *J. AOAC Int.* 80 (1997) 1171
- 123 Meetschen U., Petz M., *J. AOAC Int.* 73 (1990)
- 124 Kowalski P., Oledzka I., Lamparezyk H., *J. Pharm. Biomed. Anal.* 32 (2003) 937
- 125 Chung H-H., Lee J-B., Chung Y-H., Lee K-G., *Food Chemistry* 113 (2009) 297
- 126 Wang L., Peng J-D., Liu L-M., *Anal. Chim. Acta* 630 (2008) 101
- 127 Bailon-Perez I., Garcia-Campaña C., Cruces-Blanco M., Iruela M., *J. Chromatogr. A* 1185 (2008) 273
- 128 Pozo O.J., Guerrero C., Sancho J.V., Ibanez M., Pitarch E.,

- Hogendoorn E., Hernandez F., *J. Chromatogr. A* 1103 (2006) 93
- 129 Okerman L., De Wasch K., Van Hoof J., *Analyst* 123 (1998) 2361
- 130 Myllyniemi A.L., Nuotio L., Lindfors E., Rannikko R., Niemi A., Backman C., *Analyst* 126 (2001) 641.
- 131 Okerman L., Van Hende J., De Zutter L., *Anal. Chim. Acta* 586 (2007) 284
- 132 Lamar J., Petz M., *Anal. Chim. Acta* 586 (2007) 296
- 133 Pastor-Navarro N., Gallego-Iglesias E., Maquieira A., Puchades R., *Talanta* 71 (2007) 923
- 134 Hongyan Zhang H., Zhang Y., Wang S., *J. Immunol. Methods* 337 (2008) 1
- 135 Evtugyn G., Mingaleva A., Budnikov H., Stoikova E., Vinter V., Eremin S., *Anal. Chim. Acta* 479 (2003) 125
- 136 López Flores J., Fernández de Córdova M.L., Molina Díaz A., *Anal. Chim. Acta* 600 (2007) 164
- 137 Evtugyn G.A, Stoikov I.I. , Beljyakova S.V., Shamagsumova R.V., Stoikova E.E., Zhukov A.Yu., Antipin I.S., Budnikov H.C., *Talanta* 71 (2007) 1720
- 138 Haasnoot W., Bienenmann-Ploum M., Kohen F., *Anal. Chim. Acta* 483 (2003) 171
- 139 Pastor-Navarro N., Morais S., Maquieira Á., Puchades R., *Anal. Chim. Acta* 594 (2007) 211
- 140 Cooper J., Delahaut P., Fodey T.L., Elliott C. T., *Analyst* 129 (2004) 169

- 141 Gaudin V., Cadieu N., Maris P., *Food Agric. Immunol.* 15 (2003) 143
- 142 Jin Y., Jang J.W., Lee M.H., Han Ch.H., *Clin. Chim. Acta* 364 (2006) 260
- 143 Huet A.C., Charlier C., Singh G., Benrejeb Godefroy S., Leivo J., Vehniäinen M., Nielen M.W.F., Weigel S., Delahaut P., *Anal. Chim. Acta* 623(2) (2008) 195
- 144 Burke C.M., *Noisotopic Immunoassay*, Plenum ed., New York. 1988
- 145 Sapsford K.E., Taitt C.R., Fertig S., Moore M.H., Lassman M.E., Maragos C. M., Shriver-Lak L. C., *Biosen. Bioelectron.* 21(12) (2006) 2298
- 146 Attrée O., Guglielmo-Viret V., Gros V., Thullier D., *J. Immunol. Methods* 325(1-2) (2007) 78
- 147 Souverain S., Rudaz S., Veuthey J.L., *J. Chromatogr. B* 801(2) (2004)141
- 148 Sadílek P., Šatínský D., Solich P., *TrAC Trends in Anal. Chem.* 26(5) (2007) 375
- 149 Desilets C.P., Rounds M. A., Regnier F.E., *J. Chromatogr. A* 544 (1991) 25
- 150 Boos K.S., Grimm C.H., *Trends Anal. Chem.* 18 (1999) 175
- 151 Boos K.S., Rudolphi A., *LC-GC* 15 (1997) 602
- 152 Cassiano N.M., Lima V.V., Oliveira R. V., de Pietro A. C., Cass Q.B., *Anal. Bioanal. Chem.*, 384 (2006) 1462

- 153 Chico J., Meca S., Companyó R., Prat M.D., Granados M., *J. Chromatogr. A* 1181 (2008) 1
- 154 Papp R., Mullett W. M., Kwong E., *J. Pharm. Biomed. Anal.* 36(3) (2004) 457
- 155 Hagestam H., Pinkerton T.C., *Anal. Chem.* 57 (1985) 1757
- 156 Brunetto M.R., Obando M.A., Fernandez A., Gallignani M., Burguera J.L., Burguera M., *Talanta* 58 (2002) 535
- 157 Oosterkamp A.J., Villaverde Herrraiz M.T., Irth H., Tjaden V.R., van der Creef J., *Anal. Chem.* 68 (1996) 1201.
- 158 Hogendoorn E.A., Dijkman E., Bauman B., Hidalgo C., Sancho J.V., Hernandez F., *Anal. Chem.* 71 (1999) 1111.
- 159 Weimann A., Bojesen G.J., *Chromatogr. B: Biomed. Sci. Appli.* 721(1) (1999) 47
- 160 ChromSpher 5 BioMatrix. Direct HPLC Injection of Protein-Rich Samples, VARIAN, Harbor City, CA, USA.
- 161 Glunz L.J., Perry J.A., Invergo B., Wagner H., Szczerba T.J., Rateike J.D., Glunz P.W., *J. Liquid Chromatogr.* 15 (1992) 1361
- 162 Yu Z., Westerlund D., Boos K.S., *J. Chromatogr. B* 704 (1997) 53
- 163 Hermansson J., Grahn A., *J. Chromatogr. A* 660 (1994) 119
- 164 Kanda T., Kutsuna H., Ohtsu Y., Yamaguchi M., *J. Chromatogr. A* 672 (1994) 51
- 165 Gisch D.J., Hunter B.T., Feibush B., *J. Chromatogr. A* 433 (1988) 264

- 166 Haque A., Stewart J.T., *J. Pharm. Biomed. Anal.* 16 (1997) 287
- 167 Ohshima T., Johno I., Hasegawa T., Kitazawa S., *J. Liq. Chromatogr.* 11 (1988) 3457
- 168 Krishnan T.R., Ibrahim I., *J. Pharm. Biomed. Anal.* 12 (1994) 287
- 169 Yi L., Jian-Ping G., Xu X., Lixin D., *J. Chromatogr. B* 838 (2006) 50
- 170 Hogeendoorn E.A. , Van Zoonen P., *Anal. Chem.* 70 (1998) 1362
- 171 Friedrich G., Appel K., Rose T., Wangemann M., Althaus M., Rissler K., *J. Chromatogr. B* 808 (2004) 131
- 172 Shiota O., Suzuki A., Kanda T., Ohtsu Y., Yamaguchi M. J., *Microl.* 7 (1995) 29
- 173 Gurley B.J., Marx M., Olsen K., *J. Chromatogr. B* 670 (1995) 358
- 174 Needham S.R., Cole M.J., Fouda H.G., *J. Chromatogr. B* 718 (1998) 87
- 175 Chiap P., Rbeida O., Christiaens B., Hubert P., Lubda D., Boos K.S., Crommen J., *J. Chromatogr. A* 975 (2002) 145
- 176 Mislanova C., Sterfancova A., *J. Trace Microprobe Tech.* 19 (2001) 163
- 177 Rudolphi A., Vielhauer S., Boos K.S., Seidel D., Bathge I.M., Berger H., *J. Pharm. Biomed. Anal.* 13 (1995) 615
- 178 Martinez Fernandez J., Martinez Vidal J.L., Parrilla Vazquez P., Garrido A., *Chromatogr.* 53 (2001) 503
- 179 Boppana V.K., Mille-Stein C., Schaefer W.H., *J. Chromatogr. B* 678 (1996) 227

- 180 Baeyens W.R.G., Van der Weker, Haustraete J., Aboul-Enein H.Y., Corveleyn S., Remon J.P., Garcia-Campana A.M., Deprez P., *J. Chromatogr. A* 871 (2000) 153
- 181 Hermansson J., Grahn A., *J. Chromatogr. A* 660 (1994) 119
- 182 Lee H.M, Choi S.J., Jeong C.K., Kim Y.S., Lee K.C., Lee H.S., *J. Chromatogr. B* 727 (1999) 213
- 183 Uno K., Maeda I., *J. Chromatogr. B* 663 (1995) 177
- 184 González-Martínez M.A., Puchades R., Maquieria A., Ferrer I., Marco M.P., Barcelò D., *Anal. Chim. Acta* 386 (1999) 201
- 185 Önnarfjord P., Eremin S.A., Emnéus J., Marko-Varga G.J., *Molec. Recog.* 11 (1998) 182
- 186 Nistor C., Oubiña A., Marco M.P., Barceló D., Emnéus J., *Anal. Chim. Acta* 426 (2001) 185
- 187 Önnarfjord P., Eremin S.A., Emnéus J., Marko-Varga G., *J. Chromatogr. A* 800(27) (1998) 219
- 188 Hermanson. G.T., *Bioconjugate techniques*. Academic Press, San Diego, 1996
- 189 Gascón J., Oubiña A., Ballesteros B., Barceló D., Camps F., Marco M.P., González-Martínez M.A., Morais S., Puchades R., Maquieria A., *Anal. Chim. Acta* 347 (1997) 149
- 190 Errlanger B.F., *Methods Enzymol.* 70 (1980) 85
- 191 Langone J.J., Van Vunakis H., *Methods Enzymol.* 84 (1982) 628
- 192 <https://www.chem.agilent.com> *Application Note Oligonucleotide purification*

- 193 <http://www.merck-chemicals.es/lichropher-ads>
- 194 Gramatica P., Navas N., Todeschini R., *Trends Anal. Chem.* 18(7) (1999) 461
- 195 Kamlet M.J., Abboud J.L.M., Taft R.W., *Progress in Physical Organic Chemistry*. Vol. 13. R.W. Taft (Ed.). Interscience, New York 1981.
- 196 Anderson D. J., *Anal. Chem.* 71 (12) (1999) 314
- 197 Weetall H.H., *J. Immunol. Methods* 136 (1991) 139
- 198 Huclovám J., Šatínský D., Maia T., Karlíček R., Solich P., Nova Araújo A., *J. Chromatogh. A*, 1087 1-2 (2005) 245
- 199 Klibanov A.M., *Bioch. Bioph. Res. Comm.* 158 (1) (1989) 80
- 200 Sasaki S., Tokitsu Y., Ikebukuro K., Yokoyama K., Masuda Y., Karube I., *Anal. Lett.* 30 (3) (1997) 429
- 201 Penalva J., Puchades R., Maquieira A., *Anal. Chem.* 71 (1999) 3862
- 202 Garces-Garcia M., Morais S., González-Martinez M.A., Puchades R., Maquieira A., *Anal. Bional. Chem.* 378(2) (2004) 484
- 203 Hogendoorn E. A., Huls R., Dijkman E., Hoogerbrugge R., *J. Chromatogr. A* 938 (2001) 23
- 204 Rhines T. D., Arnold M.A., *Anal. Chim. Acta* 227 (1989) 387

PUBLICACIONES ASSOCIADAS

Jornet D., Gonzalez-Martinez M.A., Maquieira A., Puchades R
Advanced homogeneous-heterogeneous immunosensing format employing restricted access supports. Anal Chem. (2007) Vol: 79, 9331 – 9339

Gabaldón J. A. , Martínez A. , Núñez-Delicado E., González-Martínez M. A. , Jornet D., Puchades R., Maquieira A., *Development of Flow Immunosensors for Organic Pollutants* Sensors for Environment, Health and Security Advanced Materials and Technologies, Springer (2009) Netherlands

Jornet D., González-Martínez M. A., Puchades R., Maquieira A., *Antibiotic immunosensing: Determination of sulfathiazole in water and honey.* Talanta 81 Issues 4-5 (2010) 1585

RESUM

La determinació i control de contaminants orgànics ha despertat gran interès en els darrers anys. Aquests compostos s'acumulen en els ecosistemes terrestres i aquàtics, la qual cosa els fa especialment perjudicials per a la salut humana i pel medi ambient. Entre aquests contaminants orgànics hi trobem plaguicides, compostos organometàl·lics, perfluorats i bromats, hormones, fàrmacs i productes d'higiene personal (PPCP). Al camp medi ambiental, caracteritzat per tenir matrius complexes amb multitud de contaminants a nivell de traces, s'ha fet necessari millorar la majoria de procediments analítics per poder determinar-los de forma més eficaç. Els mètodes d'anàlisi que utilitzen immunosensors presenten una sèrie d'avantatges en comparació amb les tècniques clàssiques d'anàlisi per la naturalesa del seu senyal així com pel seu disseny i configuració. Els sensors permeten una integració total del procés analític fins al punt de poder obtenir la informació necessària *in situ* en temps real.

En aquesta tesi s'ha desenvolupat un nou format d'assaig anomenat homogeni-heterogeni (H-H) i s'ha aplicat en un sistema immunosensor que ha fet possible la determinació de residus de contaminants orgànics en aigua. En l'immunosensor H-H la reacció immunoquímica de competició entre l'anàlit i el traçador per unir-se a l'anticòs es dona en fase líquida (fase homogènia). Posteriorment, els productes d'aquesta se separen mitjançant una fase estacionària denominada d'accés restringit (RAM).

Entre els estudiats, els suports ADS C18 i C4 esdevenen els òptims per a la separació dels immunoreactius, tot aconseguint que el traçador lliure (Hp*) quedi atrapat en la fase reversa interna dels suport RAM i l'immunocomplex (Ab-Hp*) elueixi de forma que es pot detectar directament. En aquest immunosensor H-H s'han d'utilitzar marcadors de mida petita que puguin ser atrapats en l'interior dels porus dels materials d'accés restringit. Per aquesta raó, fou necessari l'ús de traçadors no enzimàtics, establint una via de marcatge de fluoròfors a haptens amb caràcter general basada en la utilització d'oligonucleòtids derivatitzats amb el fluorofor. Per tal de millorar la sensibilitat s'utilitzaren dues estratègies: columnes RAM en sèrie i traçadors amb més relació de marcatge. Els resultats foren satisfactoris aconseguint determinar atrazina en aigües per sota els LMR.

L'immunosensor H-H es va aplicar, amb resultats satisfactoris, a dues famílies de compostos (triazines i sulfonamides), demostrant la utilitat analítica en mostres representatives.

RESUMEN

La determinación y control de contaminantes orgánicos ha despertado gran interés en los últimos años. Estos compuestos se acumulan en los ecosistemas terrestres y acuáticos, cosa que los hace especialmente perjudiciales para la salud humana i para el medioambiente. Entre estos contaminantes orgánicos encontramos plaguicidas, compuestos organometalicos, perfluoratos y bromatos, hormonas, fármacos y productos de higiene personal (PPCP). En el campo medioambiental, caracterizado por tener matrices complejas con multitud de contaminantes a nivel de trazas, se ha hecho necesario mejorar la mayoría de procedimientos analíticos per poder determinar-los de forma más eficaz. Los métodos de análisis que utilizan inmunosensores presentan una serie de ventajas en comparación con las técnicas clásicas de análisis per la naturaleza de la señal así como por su diseño y configuración. Los sensores permiten una integración total del proceso analítico hasta el punto de poder obtener la información necesaria *in situ* en tiempo real.

En esta tesis se ha desarrollado un nuevo formato de ensayo llamado homogéneo-heterogéneo (H-H) se ha aplicado a un sistema inmunosensor que ha hecho posible la determinación de residuos de contaminantes orgánicos en agua. En el inmunosenor H-H la reacción inmunoquímica de competición entre el anàlito y el trazador para unirse al anticuerpo se da en fase líquida (fase homogénea). Posteriormente, los productos de esta se separan mediante una fase estacionaria denominada de acceso

restringido (RAM). Entre los estudiados, los soportes ADS C18 y C4 se revelan como los óptimos para la separación de los inmunoreactivos, consiguiendo que el trazador libre (Hp*) quede atrapado en la fase reversa interna de los soportes RAM y el inmunocomplejo (Ab-Hp*) eluya de forma que se pueda detectar directamente. En este inmunosensor H-H se han de utilizar marcadores de pequeño tamaño que puedan ser atrapados en el interior de los poros de los materiales de acceso restringido. Por esta razón, fue necesario el uso de trazadores no enzimáticos, estableciendo una vía de marcaje de fluoróforos a haptenos con carácter general basada en la utilización de oligonucleótidos derivatizados con los fluoróforo. Para mejorar la sensibilidad se utilizaron dos estrategias: columnas RAM en serie y trazadores con más relación de marcaje. Los resultados fueron satisfactorios consiguiendo determinar atrazina en aguas per debajo de los LMR.

El inmunosensor H-H es aplicó, con resultados satisfactorios, a dos familias de compuestos (triazinas y sulfonamidas), demostrando la utilidad analítica en muestras representativas.

SUMMARY

Those chemical pollutants that are regulated represent but a small fraction of the universe of chemicals that occur in the environment as a result of both human activity and natural processes. Due to the extensive and increasing number of known and unknown pollutants, there is a need for screening methods in environmental monitoring.

Immunochemistry has proven to be an interesting option for residue monitoring and control in clinical, food and environmental analysis. This methodology offers a range of possibilities for matching different analytical needs. The binding properties of an antibody (Ab) to an antigen (Ag) have been used for the development of a wide variety of analytical techniques applicable in rapid environmental control. A rapid immunosensing methodology that employs the so called homogeneous-heterogeneous assay mode is presented. The immunosensor is based on the homogeneous competition among the analyte, a fluorescent tracer, and the antibody, followed by separation of free and bound species by means of a restricted access alkyl-diol silica C18 reversed-phase chromatographic support. In order to develop a general labeling methodology, fluorescent tracers are synthesized from oligonucleotides covalently bound to the hapten in 3' position and the marker in 5'. The improvement of sensitivity was assayed by employing a multiple-label tracer and two columns RAM. The immunosensor principle is demonstrated by determining atrazine and sulfathiazole in natural waters.