

Tesis De Doctorado

**DESARROLLO DE INMUNOENSAYOS PARA EL
MONITOREO DE CLOMAZONE Y QUINCLORAC EN EL
CULTIVO DE ARROZ**

M.Sc. Mariana Carlomagno

Orientados: Dr. Gualberto González

RESUMEN

Uruguay se ubica entre los 10 mayores exportadores mundiales del arroz, siendo este cultivo una de las principales actividades agrícolas del país y abarcando una extensa superficie. A pesar de su magnitud, existen pocos estudios sobre el posible impacto ambiental de esta actividad. En este marco, cobra relevancia la necesidad de contar con técnicas analíticas rápidas, simples, y económicamente sustentables, que permitan monitorear los agroquímicos utilizados y mejorar si fuera necesario las prácticas del cultivo. En esta línea, este trabajo tuvo como objetivo el desarrollo de métodos inmunoquímicos para la detección de plaguicidas vinculados a este cultivo, en particular para la detección de clomazone, por ser el principal herbicida utilizado (80% del área sembrada) y porque distintos estudios revelan que en altas dosis, el clomazone puede causar disrupción endócrina en peces y ser una amenaza para la biota. Con este fin, se desarrolló inicialmente un ELISA competitivo, con anticuerpos policlonales, con un límite de detección de 2.0 ng/mL que se validó para detectar clomazone en agua y suelo del cultivo. En una segunda etapa, se generó un anticuerpo monoclonal, y con este ensayo no competitivo, seleccionando péptidos expresados en fagos que reconocen la formación del inmunocomplejo anticuerpo-clomazone (phage antiimmunocomplex assay, PHAIA). Este método permitió detectar 1.0 ng/mL de clomazone en agua del cultivo, y posibilitó la adaptación en un ensayo rápido y simple en tubos para la potencial detección in situ del herbicida. Finalmente este último ensayo se adaptó en un formato libre de reactivos biológicos, sustituyendo el fago por una quimera péptido-estreptavidina, con la que se optimizó un ensayo no competitivo con sensibilidad equivalente a la obtenida en el formato PHAIA. También se intentó el desarrollo de un inmunoensayo para quinclorac, pero no fue posible obtener anticuerpos adecuados. Empleando estas técnicas, en colaboración con el INIA se realizaron estudios de disipación del herbicida en cultivos de arroz experimentales a lo largo de las zafras 2008-2009 y 2009-2010 en Treinta y Tres, y en la cuenca del arroyo Tala en Salto en la zafra 2010-2011. Los principales resultados se resumen en tres artículos que forman parte de esta Tesis.

ABREVIATURAS

BSA: Seroalbúmina Bovina

Da: Daltons

DDA: días después de la aplicación de los herbicidas

DDI: días después de la aplicación de los herbicidas

ELISA: Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas)

GC-MS: Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas

HPLC: High Performance Liquid Chromatography (cromatografía líquida de alta performance)

HRP: Horse Radish Peroxidase

IC: Inmunocomplejo

IC₅₀: Concentración de analito a la cual la lectura de absorbancia del ELISA es la mitad de la absorbancia máxima (inhibición del 50% de señal)

IgG: Inmunoglobulina G

KLH: Keyhole Limpet Hemocyanin

LD: Límite de Detección del ELISA

MAb: Anticuerpo monoclonal

OVA: Ovoalbúmina

PBS: Buffer Fosfato Salino

Phe-Clo: 2-{2-cloro-4-[(4-hidroxifenil)diazenil]benzil}-4,4-dimetil-1,2-oxazolidin-3-ona, derivado del amino-clomazone conjugado al fenol.

PHAIA: Phage Anti-Immunocomplex Assay (ensayo antiinmunocomplejo empleando fagos)

SC₅₀: Concentración de analito a la cual la lectura de absorbancia del ELISA es la mitad de la absorbancia máxima (saturación del 50% de de la señal)

INTRODUCCION

1-El cultivo de arroz en Uruguay y el uso de agroquímicos

El impacto de la aplicación de agroquímicos en el cultivo de arroz en Uruguay es poco conocido

La producción agropecuaria es uno de los componentes claves de la economía interna y de exportaciones de los países en desarrollo. Este es el caso de Uruguay, el cual está entre los 10 mayores exportadores mundiales de arroz (*Oryza sativa*). En la zafra 2011/12 la siembra de arroz fue de 181400 hectáreas, con una producción de 1.4 millones de toneladas. Este alto rendimiento, de 7850 kilogramos por hectárea [1], se obtiene utilizando prácticas de cultivo que son peculiares en el contexto mundial.

Uruguay es de los pocos países en el mundo en donde el cultivo se realiza exclusivamente bajo riego por inundación continua, desde los 20-30 días posteriores a la emergencia hasta completar la madurez fisiológica. Asimismo, a diferencia de otras regiones, el cultivo se realiza en rotación con pasturas. Una rotación típica consiste en 1 o 2 años de arroz, seguido por 3 o 4 años de pasturas. Este uso alternado de la tierra minimiza la incidencia de plagas y enfermedades y puede considerarse que reduce el uso de agroquímicos [2], pero el impacto real de esta metodología de cultivo es poco conocido. Por otra parte, el aumento en rendimientos y área plantada de arroz asociado en general al uso intensivo de agroquímicos que permiten alcanzar el alto potencial de producción que tienen las variedades actuales. Esto ocurre fundamentalmente en lo que respecta al uso de herbicidas, los cuales se aplican en aproximadamente el 96% del área sembrada de arroz.

El uso de agroquímicos puede tener un impacto en el medio ambiente y afectar la calidad final del producto. En nuestro país su uso está poco controlado. El organismo encargado de controlar importación, fabricación y venta es el Ministerio de Ganadería Agricultura y Pesca, en tanto que el Ministerio de Vivienda, Ordenamiento Territorial y Medio Ambiente se encarga de controlar el impacto ambiental de su utilización (ley 17.282/2000). Existe desde el año 2009, una Guía de Buenas Prácticas Agrícolas de la Asociación de Cultivadores de Arroz, que establece recomendaciones en cuanto a la aplicación de pesticidas [3]

En relación al cultivo de arroz, recientemente, se han reportado una serie de estudios sobre la dispersión de pesticidas y residualidad en el producto final. Uno de estos, se realizó en una playa arenosa de la costa oceánica del Uruguay, afectada por la descarga de agua de varios cultivos de arroz (sistema de canales denominados Canal Andreoni). Se realizaron bioensayos de toxicidad y muestreos de campo de poblaciones del cangrejo *Emerita brasiliensis*, así como análisis de

niveles de herbicidas por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS) y cromatografía líquida de alta performance (HPLC). Clomazone, quinclorac y propanil fueron encontrados a concentraciones de 0.3-0.5 ng/mL, en la porción interior y en la boca del canal, y no se encontró una relación entre la exposición a herbicidas y efectos letales en el cangrejo [4]. Por otra parte, empleando espectrometría de masas con cuadrupolo lineal de trampa de iones se analizó la presencia de un gran número de pesticidas en muestras de agua de campos de arroz en Uruguay. El más frecuentemente encontrado fue el fungicida tebuconazol, menos frecuentemente el antifúngico carbendazim y el insecticida imidacloprid. El herbicida quinclorac se encontró en 4 de 26 muestras, y estuvo presente en las mayores concentraciones, en el rango de 0.4 a 6.5 ng/mL [5]. El mismo grupo estudió empleando LC-MS/MS y GC-MS la residualidad en granos crecidos bajo condiciones controladas, aplicando una serie de herbicidas, fungicidas e insecticidas a dosis dos veces más grandes que las recomendadas. El arroz con cáscara se cosechó y se procesó industrialmente a arroz integral, arroz blanco, y salvado de arroz. Las mayores concentraciones se encontraron en arroz con cáscara, en el rango de 32 a 807 ng/g, y las menores en el arroz blanco de 9 a 150 ng/g [6].

Clomazone y quinclorac son herbicidas ampliamente utilizados en el cultivo de arroz

Clomazone (Command, Cerano) y quinclorac (Paramount, Drive 75 DF) son dos de los herbicidas de mayor aplicación en el cultivo de arroz en nuestro país. En la zafra 2008/09, los herbicidas clomazone y quinclorac se aplicaron (sólo o en mezcla) en aproximadamente el 79% y 49% del área total sembrada con arroz, respectivamente [7]. Estos porcentajes se vienen repitiendo en las últimas cuatro zafras, con una tendencia a la disminución en el uso del quinclorac. Como en nuestro país el arroz se cultiva bajo inundación continua, luego de que estos herbicidas son aplicados, se pretende que pasado un período prudente de retención del agua en el predio, pueda procederse a la liberación de la misma con mínimo impacto en el medio.

El clomazone (**Figura 1.A**) es un pesticida organoclorado que pertenece a la familia de las Isoxazolidinonas. Es utilizado para el control de las gramíneas: *Echinochloa crusgalli*, *Echinochloa cruspavonis*, *Digitaria sanguinalis* e *Echinochloa colon*. Además de su uso en arroz, se aplica en otros cultivos como: algodón, tabaco, soja, caña de azúcar [8]. Su clasificación de toxicidad en la escala utilizada por la Environmental Protection Agency (EPA) de EEUU es clase II, que corresponde a la segunda clase más tóxica de las que estableció la agencia, y que refleja esencialmente la toxicidad aguda. En base a esto es rotulado como moderadamente peligroso [9].

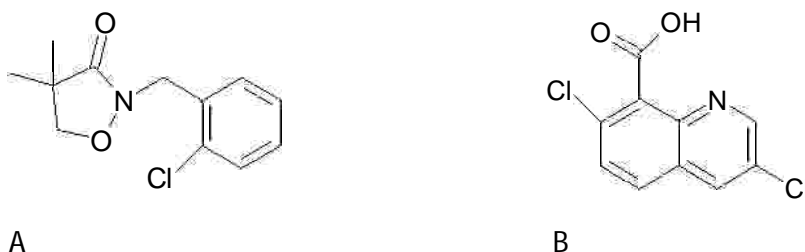


Figura 1. **A)** Clomazone ($C_{12}H_{14}ClNO_2$, [2-[(2-clorofenil)-metil]-4,4-dimetil-3-isoxazolidinona]; 2-(2-Clorobencil)-4,4-dimetil-1,2-oxazolidin-3-ona, y **B)** quinclorac ($C_{10}H_5Cl_2NO_2$ ácido 3,7-dicloroquinolina-8-carboxílico; ácido 3,7-dicloro-8-quinolina carboxílico).

El quinclorac es un ácido quinolincarboxílico (**Figura 1.B**), perteneciente a una clase de herbicidas auxínicos altamente selectivos. Es empleado en arroz para controlar malezas monocotiledóneas y dicotiledóneas, particularmente *Echinochloa crus-galli*. Su clase toxicológica es III, que significa que su riesgo toxicológico es bajo. Sin embargo, es un herbicida muy persistente en el cultivo, por lo que es un agroquímico cuya presencia debe controlarse.

En Uruguay, el Reglamento Bromatológico Nacional (Decreto 315/94) modificado por Decreto 375/11 (según Norma UNIT 833:2008 reimpresión corregida Julio 2010), establece límites en agua para consumo humano para algunos pesticidas. Sin embargo no existe normativa específica para el caso de quinclorac y clomazone. Tampoco existe una normativa para el caso de límites de los pesticidas en aguas superficiales. La Comunidad Económica Europea (CEE) fijó una concentración máxima permitida de pesticidas en agua para consumo humano de 0.1 ng/mL (EEC Drinking Water Directive, 80/778/EEC, EEC N_ L229/11-29, Brussels, 1980), y el límite ambiental exigido por la CEE para agua superficial es de menos de 3 ng/mL [10]. El quinclorac no está aprobado para la agricultura europea, estando fuera del Anexo I de la Legislación Europea desde el 2008 (Council Directive 91/414/EEC; Regulation (EC) No. 396/2005).

El clomazone es degradado por microorganismos y se volatiliza, mientras que el quinclorac es altamente persistente

La persistencia de los residuos de pesticidas en el suelo y su movimiento en el sistema agua-suelo son aspectos claves en su comportamiento ambiental. Para el clomazone, las rutas principales de disipación en el ambiente parecen ser la degradación por microorganismos y el transporte en la fase vapor. El clomazone es estable a la hidrólisis en soluciones ácidas, neutras y alcalinas, y no se degrada significativamente por fotólisis en agua ni en suelo [11,12,13].

El clomazone sufre degradación microbiana la cual es promovida por condiciones de alta humedad en suelos, altas temperaturas y pH mayores que 6.5. En el suelo es metabolizado bajo condiciones aeróbicas con vidas medias que van de 28 a 173 días, dependiendo del tipo de suelo. El dióxido de carbono es el producto de degradación principal. Bajo condiciones anaeróbicas, el clomazone se degrada rápidamente ($t_{1/2}$: 13 días) a N-[(2-clorofenol) metil]-3-hidroxi-2,2-dimetil propanamida, el que persiste en anaerobiosis [14]. En estudios realizados en Estados Unidos en campo, el Command 3 ME aplicado al suelo desnudo a una tasa de 1.4 kg ingrediente activo/ há disipa con una vida media de 139 días en un suelo marga de limo y arcilla en Iowa, y 17 días en un suelo marga de limo en Louisiana. En los dos estudios, el clomazone original no fue detectado por debajo de 0.15 metros. Los analitos de degradación no se detectaron (límite de detección: 0.01 mg/kg). Es posible que estas diferencias en las velocidades de disipación se debieran a que las condiciones en Louisiana favorecieran la volatilización y a que hubieran diferentes velocidades de metabolismo de los microorganismos del suelo [14]. También se estudió la degradación en condiciones controladas, utilizando clomazone con marcado radiactivo que se aplicó a una muestra de suelo *in vitro*. Luego de 84 días, 59% del clomazone fue extraído sin cambios, 12% de la radioactividad no pudo ser extraída y menos del 5% del clomazone aplicado fue extraído como un metabolito solo bajo condiciones de baja temperatura o baja humedad en la tierra. En la **figura 2** se presentan las modificaciones por microorganismos que presenta el clomazone. El herbicida es susceptible a monohidroxilaciones en las posiciones 5, 7 o 3', 4' 5', dihidroxilaciones en las posiciones 5, 4' y 4'5' y trihidroxilaciones en las posiciones 5, 4' y 5' [15].

Basándose en datos de laboratorio y de campo, el clomazone probablemente no contamine el agua subterránea, sin embargo es posible la contaminación de agua superficial a través del escurrimiento (lixiviado) y volatilización. La cantidad de pesticida perdida de campos y transportada a aguas superficiales depende de varios factores, incluyendo características del suelo, topografía, clima, prácticas agropecuarias, y propiedades químicas y ambientales del herbicida [16]. Un pesticida puede alcanzar el agua superficial si su solubilidad en agua es mayor que 30 mg/L, su Koc (coeficiente de partición en carbono orgánico) por debajo de 300–500 mL/g, su Kd (constante de distribución) es menor de 5 mL/g, su vida media en el suelo es mayor que 2–3 semanas, su vida media de hidrólisis es más larga que meses, y su vida media por fotólisis es mayor a 3 días. El clomazone es moderadamente móvil, con una solubilidad en agua de 1100 mg/L, con Kds que van de 1.5 a 7.4 mL/g (más bajo en suelos arenosos) y Kocs de 139 a 608 mL/g [17,18]. En agua superficial, el clomazone existe disuelto y unido a partículas en suspensión y sedimentos, y puede persistir con vidas medias que van de 1.0 a 2.5 meses. El metabolito de degradación N-[(2-clorofenol) metil]-3-hidroxi-2,2-dimetil propanamida puede encontrarse en agua superficial y va a persistir, especialmente bajo condiciones anaeróbicas [14]. Por otra parte,

el clomazone tiene una presión de vapor moderadamente alta de 1.44×10^{-4} mm de Hg y una solubilidad en agua también alta. Considerando su constante de la Ley de Henry de 4.14×10^{-8} atm.m³/mol, se esperaría que permanezca en la columna de agua en vez de volatilizarse. Sin embargo, como se ha mencionado, en el ambiente terrestre se ha observado que el clomazone puede volatilizarse del suelo [14]. La volatilización es un factor de riesgo ambiental importante para plantas terrestres, siendo la causa de daño en cultivos a una distancia de hasta 3 km [19].

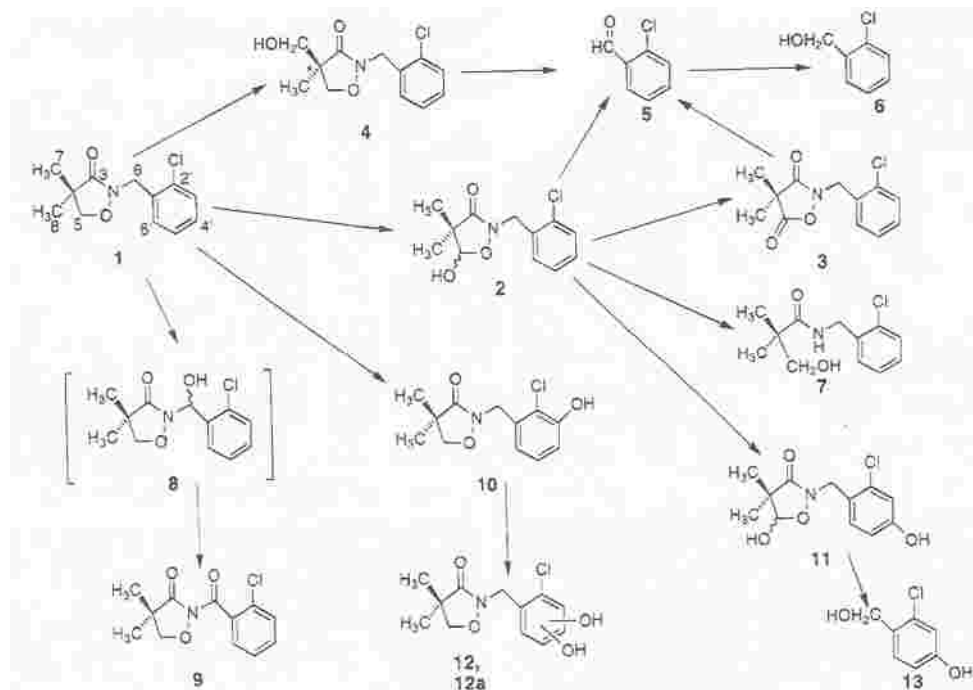


Figura 2. Transformaciones por microorganismos que sufre el clomazone [15].

El quinclorac tiene una movilidad variable dependiendo del tipo de suelo y del tipo de materia orgánica, y puede persistir en el suelo por un año, afectando cultivos susceptibles en programas de rotación [20]. El quinclorac se une al suelo (K_{oc} : $50 \text{ mL} \cdot \text{g}^{-1}$) y su vida media aeróbica en suelo es de 300 días, o sea es muy persistente. Está clasificado como un potencial contaminante de agua superficial, debido a su solubilidad en agua ($0.065 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ a pH 7) [21]. Por otra parte, según estudios del potencial de transporte en fase acuosa presenta probabilidad intermedia de encontrarse en aguas superficiales [22]. Su tiempo de vida media en agua de cultivo en un experimento de campo en Brasil fue 10 días, con una persistencia media de 48.7 días [21].

Debido a su alta persistencia, se investigan tratamientos de remediación de aguas contaminadas con quinclorac. Entre estas posibles metodologías se ha estudiado la bioremediación con *Burkholderia cepacia* WZ1 [23], una combinación de *Pistia stratiotes* y *Enterobacter cloacae* [24], y la degradación fotolítica y fotocatalítica usando TiO_2/UV [25,26]. En un estudio se

investigó la fotólisis directa y fotocatalisis con TiO_2 del quinclorac en agua ultrapura y agua del cultivo. Luego de 10 horas de fotólisis en agua ultrapura la concentración de quinclorac disminuyó 26% y 54% a 250 W.m^2 y 700 W.m^2 , respectivamente. Sin embargo, la cantidad de quinclorac en agua del campo de arroz permaneció casi constante en esas condiciones. El quinclorac se disipó completamente luego de 40 min de fotocatalisis con TiO_2 en agua ultrapura, mientras que 130 min se necesitaron para degradar el 98% de la concentración inicial en agua del cultivo [25].

El mecanismo de acción del clomazone es a través de la inhibición de la producción de carotenoides, y para el quinclorac una “sobredosis auxínica”

El clomazone se absorbe en las plantas a través de las raíces desde el suelo, y luego es traslocado y se difunde por las hojas [27]. Las plantas sensibles a él muestran un blanqueamiento, que las hace más susceptibles al estrés oxidativo que causa la absorción de luz ultravioleta [28,29]. Esto ocurre debido a que en especies susceptibles este herbicida interfiere con el desarrollo de los cloroplastos y reduce o impide la acumulación de pigmentos plástidos. Inhibe la formación de isoprenoides unidos a los cloroplastos, incluyendo los pigmentos fotosintéticos (cadena lateral de fitol de la clorofila), carotenoides [30,31], transportadores de electrones [32], y hormonas (giberelinas) [33], en plantas superiores y en el alga *Scenedesmus acutus* [34].

El precursor común de todos los isoprenoides isopentenil pirofosfato (IPP). Como se muestra en la **figura 3**, una de las vías de síntesis del IPP es la vía que ocurre en el plástido, la vía del metileritritol 4-phosphate (MEP), que ocurre a partir del gliceraldehído-3-fosfato (G3P) y el piruvato. Los primeros dos intermediarios de esta vía son deoxixilulosa 5 – fosfato (DXP) y MEP, que son formados por la DXP sintasa (DXS) y DXP reductoisomerasa (DXR), respectivamente [35]. Esta vía produce isoprenoides usados en la síntesis de carotenoides, fitol, plastoquinona-9, isopreno, mono- y diterpeno, y hormonas (ej. ácido abscísico), en el plástido [36,37].

Tras su absorción, se produce una bioactivación del clomazone en la planta. El herbicida se metaboliza formándose 5-OH clomazone ((2-[(2-chlorofenil)metil]-5-hidroxi-4,4-dimetil-3-isoxazolidinona), que se oxida dando 5-cetoclomazone (2-[(2-clorofenil)metil]-4,4-dimetil-3,5-isoxazolidinediona) [38]. El 5-cetoclomazone es el metabolismo activo del clomazone, quien inhibe la DXP sintasa [29,39,40,41], como lo muestra la **figura 3**. Varios artículos hacen referencia a como diversas variedades de plantas metabolizan el clomazone [29,42,43]. La tolerancia observada en soja al clomazone, sería debida a la detoxificación metabólica del clomazone más que a una falta de bioactivación [41].

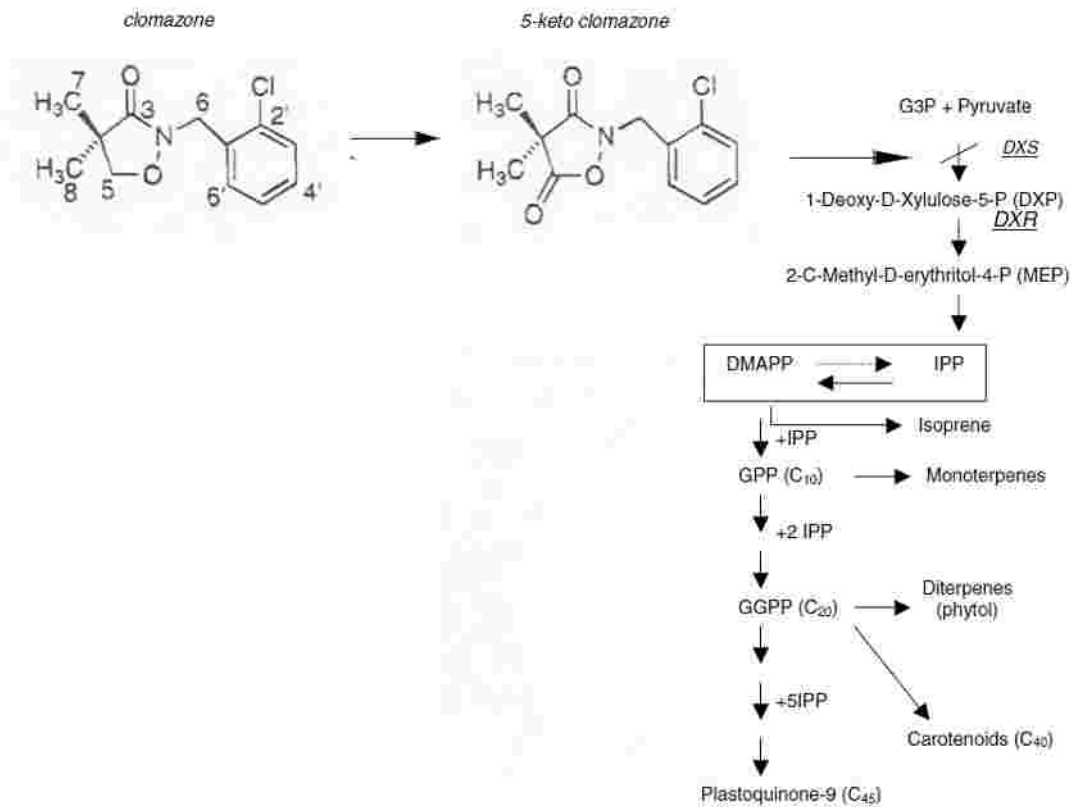


Figura 3- Mecanismo de acción del clomazone en la vía plastídica de síntesis de isoprenoides: el 5-cetoclomazone bloquea a DXS. G3P: gliceraldehido-3-fosfato, DXS: 1-desoxi-xilulosa-5-fosfato sintasa [29].

Por otra parte, el quinclorac es fácilmente absorbido por semillas en germinación, raíces y hojas y es traslocado hacia arriba y abajo en la planta. El quinclorac mimetiza una sobredosis de auxina, estimulando la inducción de actividad sintasa de ácido carboxílico 1-aminociclopropano (ACC), la cual promueve la biosíntesis de etileno y además se acumula cianuro en los tejidos. En dicotiledóneas sensibles, el etileno dispara la acumulación de ácido abscísico. Estos efectos no se observaron en arroz y en un biotipo resistente de *Echinochloa crus-galli* [44].

El clomazone se asocia con la disrupción endócrina en peces y el quinclorac con efectos tóxicos sobre el fitoplancton

El clomazone muestra un bajo potencial de bioconcentración en organismos acuáticos, y es ligeramente tóxico para peces [9]. Varios estudios revelan que en altas dosis, el clomazone puede

causar disrupción endócrina en peces y puede representar una amenaza para la biota [45]. Además, la contaminación de drenajes y ríos tiene el potencial de producir niveles inaceptables de clomazone en agua para beber.

En estudios realizados sobre el efecto del clomazone en el Bagre sudamericano (*Rhamdia quelen*), se evidenció que luego de 96 horas la LC₅₀ (concentración de una sustancia que provoca la muerte al 50% de los animales expuestos) fue de 7.32 mg/L. El comportamiento de distintos peces frente al herbicida es diferente, la LC₅₀ a 96 horas para la trucha arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*), mojarra de agallas azules (*Lepomis macrochirus*) y tetra amanecer (*Hyphessobrycon scholzei*), fueron de 19, 34 y 27.3 mg/L respectivamente. A su vez se observó que la actividad acetilcolinesterasa en peces de la especie Bagre sudamericano expuestos al clomazone a partir de 5 mg/L se vio reducida en un 80% en el cerebro y tejido muscular. La actividad acetilcolinesterasa se utiliza como un biomarcador de toxicidad de pesticidas. Dicha actividad es importante para muchas funciones fisiológicas, como localización de la presa, evasión del predador y orientación [46]. Cuando la actividad acetilcolinesterasa disminuye, la acetilcolina no es hidrolizada y consecuentemente el neurotransmisor se acumula entre las sinapsis [47,48]. Este exceso de acetilcolina provoca una estimulación incesante de los receptores, lo cual puede causar la muerte como consecuencia de una parálisis tetánica [45,48,49]. Por otro lado, otros autores observaron daño hepático en peces producido por el clomazone, notando vacuolación de los hepatocitos ante la presencia de 1mg/L de clomazone en el agua [45]. También se asoció el clomazone con un aumento en la peroxidación lipídica, que es un proceso inducido por el estrés oxidativo mediado por este herbicida [50].

En cuanto al quinclorac, experimentos de campo empleando microcosmos asociados al cultivo de arroz irrigado, mostraron que las concentraciones recomendadas de aplicación del producto afectan directamente al fitoplancton, y tienen un efecto indirecto, a corto plazo en la comunidad de zooplancton [51]. También se ha reportado que el quinclorac tiene efectos adversos en hidrófitas, animales acuáticos y es considerado un tóxico renal y hepático [23].

2-Los inmunoensayos

Los inmunoensayos son una alternativa analítica para pesticidas

Las tecnologías analíticas instrumentales basadas en CG y HPLC, si bien constituyen técnicas de referencia, requieren equipos costosos, personal calificado, e implican en general pretratamientos laboriosos. Estas limitaciones de costos y capacidad de procesamiento de muestras, probablemente contribuyan a que la información existente sobre impacto de la aplicación de agroquímicos en Uruguay sea escasa. Considerando este marco, interesa contar con técnicas

analíticas rápidas, simples y económicamente sustentables que permitan aumentar la capacidad analítica disponible. En el caso del cultivo de arroz, estos métodos permitirían un monitoreo en gran escala de la disipación de agroquímicos, para poder corregir si es necesario las prácticas de cultivo, y alcanzar los estándares ambientales que minimicen su riesgo y mejoren las condiciones de exportación a países demandantes. En las últimas décadas los inmunoensayos, basados en la alta especificidad y afinidad con que los anticuerpos reconocen al analito en cuestión, se han consolidado como una tecnología madura y varios inmunoensayos se incorporaron como métodos oficiales por la Agencia EPA de EEUU, en particular muchos de estos para la detección de pesticidas.

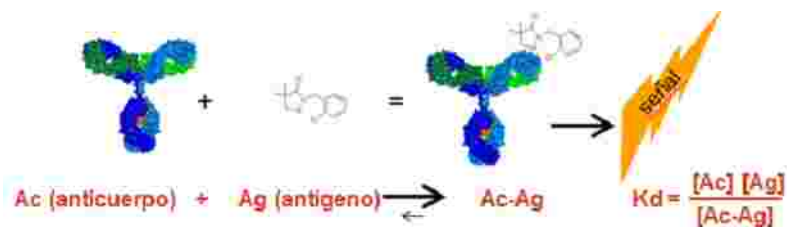


Figura 4. Esquema de la reacción antígeno-anticuerpo que constituye la base de funcionamiento de los inmunoensayos.

El elemento central de un inmunoensayo es la reacción anticuerpo-antígeno (Ac-Ag), donde en nuestro caso el antígeno es el analito (**figura 4**). Al montar el ensayo la formación del complejo Ac-Ag (inmunocomplejo = IC) se convierte en una señal, generalmente, debido a que alguno de los reactantes está conjugado con una enzima que cataliza la conversión de su sustrato en un producto medible, comúnmente coloreado. La sensibilidad de un inmunoensayo se refiere a la mínima cantidad de analito que puede ser distinguida de forma precisa (se diferencia del ruido de "sensibilidad analítica", que se define como la capacidad de una metodología de discernir pequeñas variaciones en la concentración de un analito). La sensibilidad, que se expresa frecuentemente como el límite de detección (LD) de un inmunoensayo mejora con la afinidad del anticuerpo, debido a que el equilibrio está desplazado hacia la formación del IC. En general, debido a que se usan anticuerpos de alta afinidad, la sensibilidad de los inmunoensayos es muy buena. Además permite muchas veces el análisis en paralelo de un alto número de muestras sin procesar, a muy bajo costo operativo, con mínimos requerimientos instrumentales, son una muy simple operación, ambientalmente amigables y pueden adaptarse en formatos para uso *in situ*. La mayor desventaja de los inmunoensayos, es su largo tiempo de desarrollo y que detectan un único compuesto. También, en ocasiones existe la posibilidad de reactividad cruzada con análogos estructurales del analito blanco, que pueden representar un problema de especificidad, aunque si es muy marcada pueda en realidad convertirlo en un ensayo para la detección de una familia de compuestos.

Una de las etapas claves en el desarrollo del inmunoensayo es la producción de anticuerpos, ya sean policlonales o monoclonales. Para obtener anticuerpos policlonales se inmunizan por ejemplo conejos, con el antígeno de interés vehiculizado en un adyuvante adecuado que mejora la respuesta. Los antígenos (o inmunógenos) son sustancias que pueden generar una respuesta inmune humoral en el huésped. En respuesta al antígeno, múltiples clones de células se diferencian en células plasmáticas productoras de anticuerpo, luego de una serie de inmunizaciones el suero del animal se recoge y los anticuerpos se purifican para su uso. De esta forma el suero consiste en una mezcla heterogénea de anticuerpos denominado anticuerpos policlonales. Estos anticuerpos se une a distintos sitios en el antígeno (epítopes), tienen afinidades de unión diferentes, y representan diferentes clases o subclases de inmunoglobulina. La reactividad con múltiples epítopes resulta en una unión de alta afinidad; sin embargo, el suero polivalente puede también contener anticuerpos irrelevantes (que unan a los epítopes de interés) y que generen ruido en el ensayo. Asimismo, pueden existir inconsistencias entre sangrados, un antisuero policlonal puede variar de un animal a otro y las cantidades de anticuerpos obtenidas van a ser limitadas [52].

Para obtener anticuerpos monoclonales se inmunizan por ejemplo ratones y se emplea la tecnología de hibridomas. Las células productoras de anticuerpos del animal se immortalizan fusionándolas a una línea tumoral, y luego se aíslan los clones que secretan los anticuerpos de interés. El clon seleccionado tiene el potencial de ser cultivado indefinidamente secretando los mismos anticuerpos monoclonales en forma constante en el sobrenadante, desde donde se purifican. Así, los anticuerpos monoclonales derivan de un clon de células B único, reconociendo un epítope único del antígeno. Constituyen una preparación estandarizada, son altamente específicos y homogéneos en sus características de unión al antígeno, y generalmente tienen afinidades de unión del orden nanomolar. A pesar de que se pueden generar cantidades ilimitadas, el desarrollo de estos anticuerpos es lento y costoso [52].

Los inmunoensayos pueden ser competitivos o no competitivos

Hay dos grandes grupos de inmunoensayos dependiendo de la forma en que se detecta el analito, ya sea en forma no competitiva o en forma competitiva.

Los formatos de ensayos no competitivos se los conoce como ensayo “sándwich” debido que el analito es capturado por un primer anticuerpo y luego es detectado con la ayuda de un segundo anticuerpo. Este tipo de ensayo generalmente proporciona el nivel más alto de sensibilidad y especificidad, y además la señal del ensayo es directamente proporcional a la concentración de analito presente en la muestra [53]. El formato no-competitivo, es el formato de elección en el desarrollo de inmunoensayos para macromoléculas. Desafortunadamente, los analitos de bajo

peso molecular (inmunológicamente denominados haptenos) quedan excluidos de ser detectados a través de un formato sándwich clásico, por no poder ser reconocidos simultáneamente por dos anticuerpos. Por esta razón, los analitos pequeños se detectan en ensayos de competición.

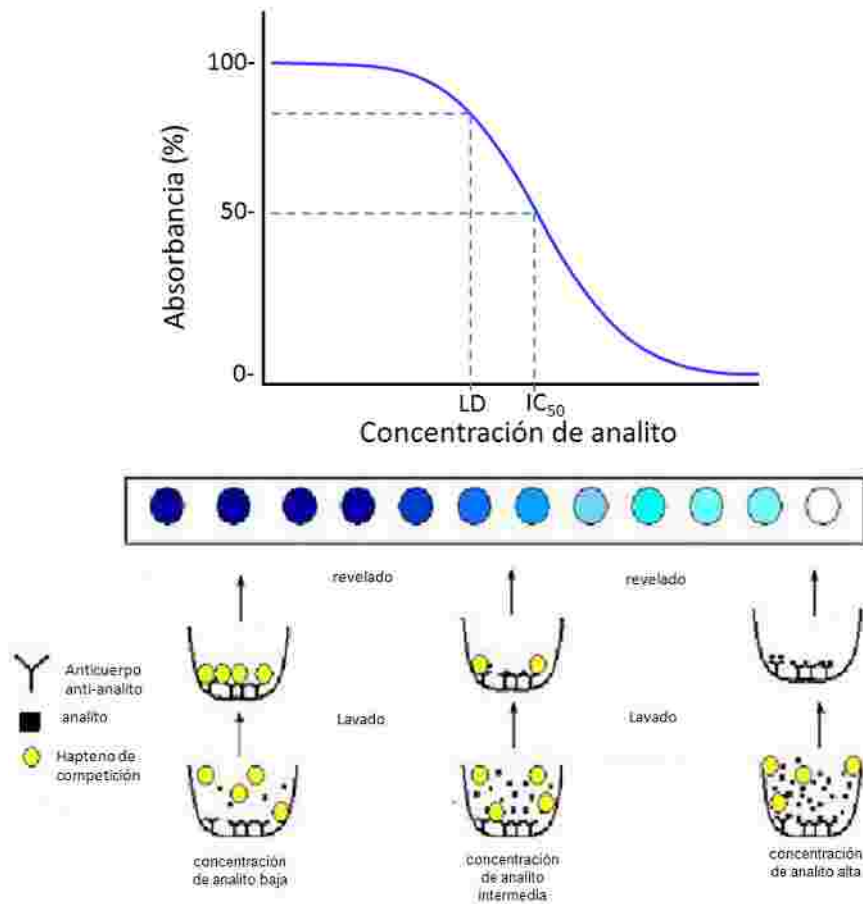


Figura 5. Esquema de un ELISA de competición directa. En la parte inferior de la figura se representan pocillos de ELISA sensibilizados con el anticuerpo anti-analito, en los que diluciones seriadas del analito (cuadrado pequeño) compiten con una cantidad fija de un conjugado reportero (círculo amarillo). El conjugado reportero consiste en una variante química del analito acoplado a una enzima, la que luego de incubar, lavar y agregar el sustrato, da un producto coloreado como se esquematiza en la tira del medio. Arriba, se muestra el perfil de una curva típica de absorbancia en función de la concentración de analito. Se muestran los parámetros **IC₅₀** (concentración de analito a la cual la lectura de absorbancia es la mitad de la absorbancia máxima) y **LD** (límite de detección, definido como la concentración de analito a la cual la señal máxima disminuye, generalmente, un 20%).

En los ensayos de competición el analito en la muestra se mide por su capacidad para competir con un análogo químico del analito por la unión al anticuerpo. Hay dos formatos posibles, a) el directo, en el cual el analito de la muestra y una cantidad limitante de analito conjugado a la

molécula generadora de señal compiten por la unión a una cantidad limitante de anticuerpo inmovilizado en la fase sólida, y b) el indirecto, en el cual el analito de la muestra compite por la unión a una cantidad limitante de anticuerpo con un análogo químico del analito que se encuentra inmovilizado a la fase sólida del ensayo. En este último caso la señal se genera midiendo la cantidad de anticuerpo que permanece unido a la fase sólida. Como los ensayos de competición miden la inhibición de la generación de la señal, por lo tanto la señal es inversamente proporcional a la concentración de analito. Típicamente, estos ensayos se montan en formatos de ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay). En la **figura 5** se presenta un esquema de un ELISA competitivo.

Para desarrollar anticuerpos contra moléculas pequeñas es necesario conjuarlas a proteínas

En el desarrollo de anticuerpos contra antígenos de bajo peso molecular como pesticidas, en general es necesario acoplar o conjuar el hapteno a macromoléculas como proteínas (sistema carrier) e inmunizar con este conjuado. Esto es debido a que el hapteno libre, si bien puede ser reconocido por los receptores de las células B, una vez internalizado carece de epítopes T q n necesarios para la interacción con linfocitos T colaboradores que activan a los linfocitos B. Por el contrario, cuando el hapteno se encuentra conjuado a proteína inmunogénica, al ser reconocido el hapteno por el receptor específico de la célula B, esta endocita el complejo hapteno-carrier y la degradación de este complejo genera péptidos relacionados con el carrier que son presentados en su superficie, los que si pueden ser reconocidos por los linfocitos T colaboradores. Esta interacción conduce a la activación de la célula B dando lugar a los procesos de maduración de la afinidad, cambio de clase y generación de memoria, que es necesario para una eficiente producción de anticuerpos contra el hapteno [54].

La molécula carrier, es generalmente una proteína de baja homología con las proteínas del animal a inmunizar, tiene grupos funcionales adecuados para la conjugación con haptenos, y una solubilidad razonable. La afinidad final del suero o anticuerpo monoclonal preparado es determinante para la sensibilidad final del ensayo [55], y esta característica está fuertemente determinada por las propiedades de la química de preparación del hapteno y su forma de conjugación [56].

Para sintetizar un complejo hapteno-carrier estable, se requiere muchas veces modificar a haptenos para incorporar grupos reactivos que permitan acoplarlos con las macromoléculas. La síntesis de haptenos para su unión a proteínas carrier es el aspecto más importante para la generación de anticuerpos contra moléculas pequeñas. El grupo funcional del hapteno gobierna la

selección del método de conjugación a emplear. Idealmente la química de conjugación debe conservar la identidad química del hapteno, y lograr una alta relación de moléculas de hapteno/molécula del carrier. Los procedimientos comunes usan grupos ácidos carboxílicos, aminas, hidroxilos, o sulfidrilos del hapteno y la proteína. Las proteínas carrier más empleadas son seroalbúmina bovina (BSA), ovalbúmina (OVA), conalbúmina (CONA), tiroglobulina (TG), inmunoglobulina (Ig), fibrinógeno, y “keyhole limpet hemocyanin” (KLH) [57]. La KLH, es particularmente atractiva por contener un gran número de lisinas (aminas primarias) disponibles para la conjugación, pero su uso como carrier es muchas veces difícil debido a su baja solubilidad en varios buffers y a su tendencia a precipitar durante la conjugación [58].

Inmunoensayos no competitivos para moléculas pequeñas

Debido a su mejor desempeño en términos de sensibilidad, especificidad, rango lineal y señal proporcional, ha habido un gran interés en el desarrollo de métodos no competitivos para pequeñas moléculas. La mayoría de reportes de ensayos para pequeñas moléculas se han basado en el desarrollo de anticuerpos anti inmuno-complejos (IC) [59,60]. Sin embargo estos son muy difíciles de preparar debido a que los cambios producidos por la unión del hapteno en el primer anticuerpo son menores, y es difícil dirigir el reconocimiento del segundo anticuerpo a estos cambios. Esto se ejemplifica en un trabajo en el que se prepararon anticuerpos contra el complejo anticuerpo-microcistina. En este estudio, cuatro experimentos de generación de hibridomas produjeron 58 clones que secretaban anticuerpos anti-IC, pero solo tres (presumiblemente el mismo clon) tenían una baja afinidad por el anticuerpo libre [61]. Como una alternativa a esta estrategia, el grupo de Inmunoquímica de la Cátedra de Inmunología, desarrolló un método para sustituir el segundo anticuerpo de los ensayos sandwich para pequeños analitos por un péptido de entre 8 y 11 amino ácidos que es capaz de enfocar el reconocimiento del IC a la zona modificada por la unión del analito [62,63]. Estos péptidos se seleccionan a través de la técnica de phage display.

Inmunoensayos no competitivos empleando fagos anti inmunocomplejo (PHAIA)

La tecnología de phage display, introducida por Smith en 1985 [64] permite generar bibliotecas de alta diversidad, compuestas por fagos filamentosos de la familia M13, cada uno de los cuales expresa en su superficie una secuencia peptídica (o proteína) diferente. La selección del ligando de interés a partir de estas bibliotecas está facilitada por la conexión física que existe entre el ligando (péptido o proteína) y el DNA que lo codifica. En el caso de bibliotecas de péptidos, la secuencia que los codifica se inserta en el extremo 5' del gen de las proteínas pIII o pVIII de la cápside viral. Las partículas de fagos que presentan los péptidos en sus superficies pueden ser seleccionadas con una molécula selectora (que va a unirse al péptido de interés) inmovilizada en

una fase sólida, como la superficie de una placa de ELISA, un inmunotubo o acoplada a partículas magnéticas. Luego de incubar la biblioteca con la molécula selectora, los fagos que no se unen son eliminados mediante sucesivos lavados, y los fagos capturados son posteriormente eluidos y usados para infectar *E. coli*. El proceso de infección es altamente eficiente, y aun el número de partículas virales eluidas sea muy bajo (como ocurre al principio del proceso de selección) es posible amplificarlas creciendo las bacterias infectadas. Los fagos así preparados son sometidos a nuevos procesos de selección y amplificación (comúnmente 3-5) hasta que finalmente se aíslan clones independientes resultantes del proceso (panning) y se analizan individualmente por su reactividad contra la molécula selectora.

Utilizando IC hapteno-anticuerpo como moléculas selectoras, el grupo de Inmunoquímica demostró en 2007 que es posible seleccionar péptidos que reaccionen específicamente con estos complejos, y por lo tanto permitían montar ensayos no competitivos para pequeñas moléculas [62,63]. En este método, denominado PHAIA (phage anti-immunocomplex assay), la propia partícula viral se usa como sustituta de lo que sería el segundo anticuerpo en un ensayo sándwich, y la señal se genera con un anticuerpo anti-fago o por detección del DNA viral mediante PCR (reacción en cadena de la polimerasa) en tiempo real (Real time PCR) [65], como se muestra en la **figura 6**. En distintas aplicaciones en las que, usando el mismo anticuerpo, se adapta el formato convencional de competición en la versión PHAI hay un aumento de sensibilidad típicamente de 10-20 veces. Este tipo de ensayo se ha aplicado a varios blancos, incluyendo los herbicidas molinato y atrazina, el metabolito piretroide ácido fenoxibenzoico, las drogas ciclosporina y digoxina, y el retardante de llama difenil éter bromado 47 [62,63,65,66]. Luego de la descripción inicial de PHAIA, otros autores aplicaron el método a la detección de la fitohormona giberelina 4 [67] y de un hapteno derivado de una 1,3-dicetona [68], confirmando la aplicación general del método.

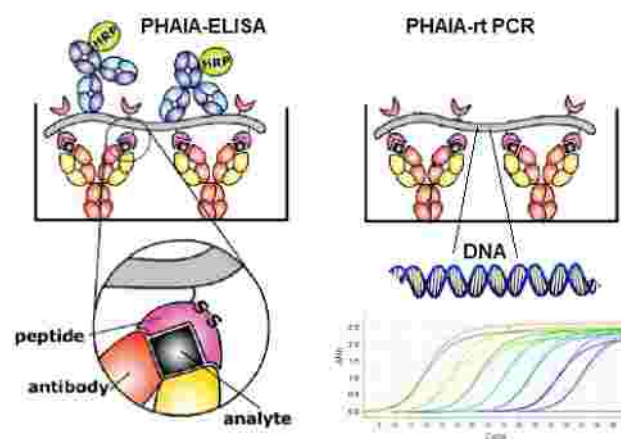


Figura 6. Esquema de PHAIA. A la izquierda se muestra el formato de ELISA colorimétrico, en el cual la partícula viral se detecta utilizando un anticuerpo marcado con peroxidasa, y a la

derecha se esquematiza la detección de la partícula viral directamente cuantificando el DNA del fago por PCR en tiempo real (rtPCR).

3. Propósito de este trabajo

Dado el potencial del método y los avances existentes el grupo, en este trabajo de tesis se exploró el desarrollo de inmunoensayos específicos para dos de los herbicidas de mayor uso en el cultivo de arroz, clomazone y quinclorac, como una potencial herramienta para generar información sobre el impacto del cultivo y una ayuda para posibles sistemas de monitoreo. Esto implicó la síntesis de haptenos, y la generación de anticuerpos policlonales y monoclonales como un primer camino hacia la obtención de inmunoensayos competitivos convencionales, y el posterior desarrollo de ensayos no competitivos utilizando la metodología PHAIA. Hacia el final de este trabajo se exploró además la posibilidad de sustituir las partículas virales por una construcción recombinante que reprodujera las propiedades de avidéz de la partícula viral. Los métodos desarrollados se emplearon para monitorear clomazone en cultivos experimentales y comerciales.

MATERIALES Y MÉTODOS

Incluye métodos adicionales a los descritos en los **Artículos** adjuntos **I, II y III**.

Materiales

El quinclorac de grado técnico se obtuvo de Cyperex (Uruguay) y el clomazone de grado HPLC de Riedel-de-Haën (Seelze, Alemania). La proteína keyhole limpet hemocyanin (KLH) fue de Pierce (Rockford, IL), la seroalbúmina bovina (BSA) y ovoalbúmina (OVA) de Sigma (St. Louis, MO). Los reactivos de conjugación carbodiimida (EDC), sulfo-N-hidroxisuccinimida (sulfo-NHS), N-hidroxisuccinimida (NHS) y dicitclohexilcarbodiimida (DCC) y el kit de determinación de proteínas BCA para la cuantificación de conjugados se compraron en Pierce. Los conjugados a horse radish peroxidase de anticuerpos anti-IgG de ratón, anticuerpos anti-IgG de conejo, y de estreptavidina se obtuvieron de Pierce, las células de mieloma SP2/0, de ATCC, las placas empleadas para los inmunoensayos fueron placas de microtitulación de poliestireno "high-binding" de Greiner bio one (Germany), el anticuerpo monoclonal de ratón anti-M13 conjugado a HRP (anti-M13-HRP) de GE Health Care (Piscataway, NJ). Todos los solventes fueron de Merck o Fluka. El carbonildiimidazol (CDI), los adyuvantes completo e incompleto de Freund's, y el resto de los reactivos usados en este trabajo se adquirieron de Sigma-Aldrich, a menos que se especifique lo contrario.

I. ANTICUERPOS CONTRA QUINCLORAC Y CLOMAZONE

Para el clomazone, la síntesis de haptenos, conjugaciones, y detalles de las producciones de anticuerpos se presentan en los **Artículos I y II** adjuntos.

Síntesis de haptenos del quinclorac

Síntesis del ácido 4-((3,7-dicloroquinolina-8-il)carbonil)amino)metil)benzoico (hapteno 1).

Primero se activó el quinclorac, produciendo el quinclorac clorado (3,7-dicloroquinolina-8-cloruro de carbonilo) (**Figura 7.a**). Para esto se hicieron reaccionar 0.25 g de quinclorac (1 mmol) en 10 mL de SOCl₂, y se mantuvo en reflujo por 4 h a 85°C. Terminada la reacción se evaporó el SOCl₂ y se agregó tolueno para evaporar los restos de SOCl₂.

Posteriormente se sintetizó el hapteno 1 (**Figura 7.b**), haciendo reaccionar el quinclorac clorado con metil 4-(aminometil)benzoato. Se disolvió el quinclorac clorado en 7 mL de 1,4-dioxano. Se agregaron el metil 4-(aminometil)benzoato y la trietilamina disueltos en 2 mL de 1,4-dioxano. Se incubó a temperatura ambiente. El work up de la reacción se evaporando el solvente y agregando tolueno para terminar de evaporar. Se agregaron 5 mL de agua y se filtró al vacío toda la noche. Luego se recristalizó en acetato de etilo.

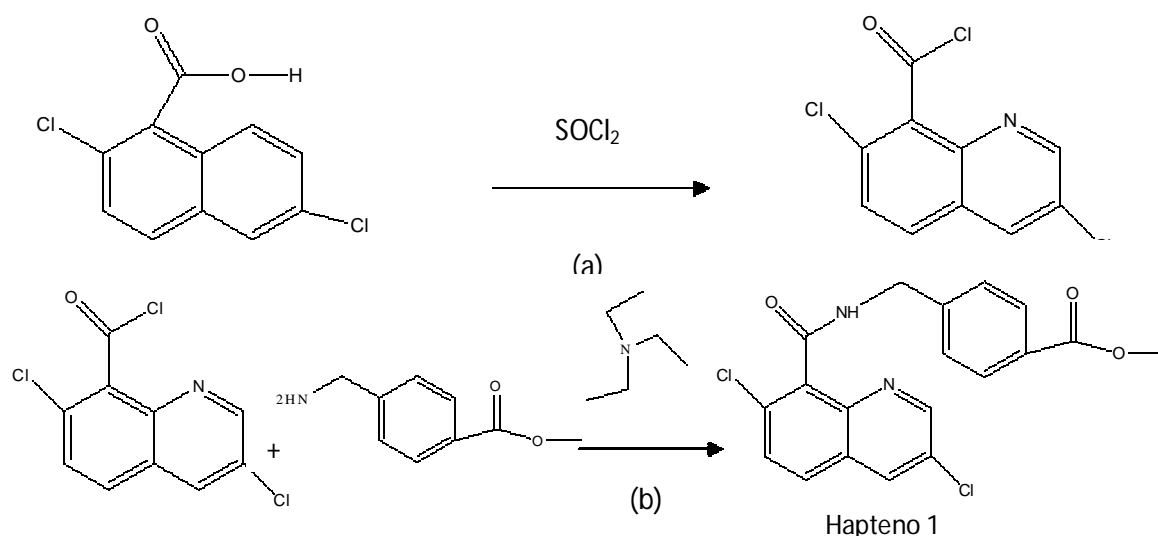


Figura 7. Síntesis del hapteno 1 del quinclorac

Para hidrolizar el éster obtenido en el producto anterior, 200 mg (0.47 mmoles) de éste se disolvieron en 120 mL de etanol, y se agregaron 18 mL de agua. Se adicionaron 0.029 g de KOH (0.51 mmol) y se dejó reaccionar a temperatura ambiente por 12 hs. La estructura del producto se confirmó por resonancia magnética nuclear (RMN) en un Espectrofotómetro Merc 300 (Mercury 300), y GC-MS en un equipo 5973 Mass Selective Detector, Hewlett Packard, GC System Hewlett Packard 6890 Series.

Síntesis del ácido 4-(2-[[3,7-dicloroquinolina-8-il]carbonil]amino)etil)benzoico (hapteno 2).

Para esta síntesis se hizo reaccionar el quinclorac clorado (**Figura 7.a**) con el ácido 4-(2-aminoetil)benzoico-HCl. Primero se debió esterificar el ácido 4-(2-aminoetil)benzoico-HCl (**Figura 8**). A 0.54 mmol del aminoácido se agregaron 60 mL de etanol 100%. Se burbujeó HCl (g) seco a través de la mezcla en hielo, para obtener una solución de HCl saturada. Se dejó la solución a temperatura ambiente por 40 h [69]. El work up se realizó agregando agua y bicarbonato de sodio hasta pH 9-10, y se extrajo con acetato de etilo dos veces.

Luego el éster del aminoácido se hizo reaccionar con el quinclorac clorado. Se disolvieron 0.54 mmol de quinclorac clorado en 4 mL de 1,4 dioxano. Se reaccionó con 0.65 mmol de éster del aminoácido con 1.2 mmol de trietilamina en 4 mL de 1,4 dioxano, y se agregaron a la solución anterior. Se dejó reaccionar a temperatura ambiente. El work up se realizó evaporando el solvente, se agregaron 4 mL de agua y se filtró. Se recristalizó con acetato de etilo. La estructura del producto se confirmó por RMN y GC-MS.

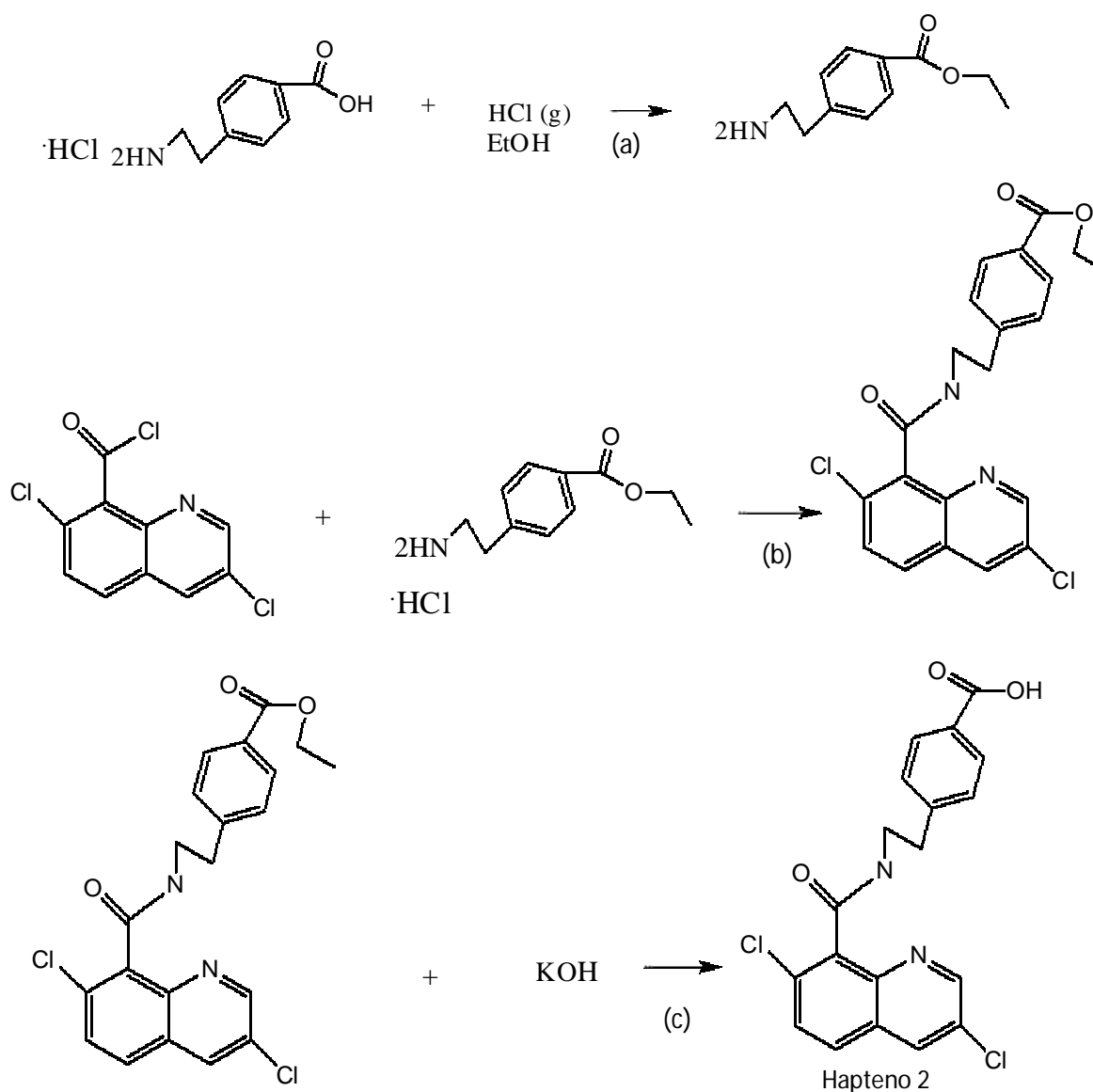


Figura 8. Síntesis del hapteno 2 del quinclorac

Para hidrolizar el éster obtenido, a 0.24 mmol del éster se le agregaron 2 mL de tetrahidrofurano (THF) y 1.5 mL de agua. Se agregaron 0.26 mmol de KOH y se dejó reaccionar a temperatura ambiente hasta terminar la reacción. Para el work up se removió la fase orgánica con rotaevaporador. Se enfrió a 0°C la fase acuosa, se ajustó el pH a 2-3 con HCl diluido y se filtró [70]. La estructura del producto se confirmó por RMN y GC-MS.

Síntesis del ácido 6-[(3,7-dicloroquinolina-8-il)carbonil]amino}hexanoico (hapteno 3).

Se disolvió el quinclorac clorado (**Figura 7.a**) en 7 mL de 1,4-dioxano. Se agregaron el ácido aminocaproico y la trietilamina disueltos en 2 mL de 1,4-dioxano (**Figura 9**). Se incubó a 80 °C.

El producto de la reacción se disolvió en metanol y se agregó agua. Se filtró, el papel de filtro se lavó con metanol, y el metanol y el agua se evaporaron. La estructura del producto se confirmó por RMN y GC/MS.

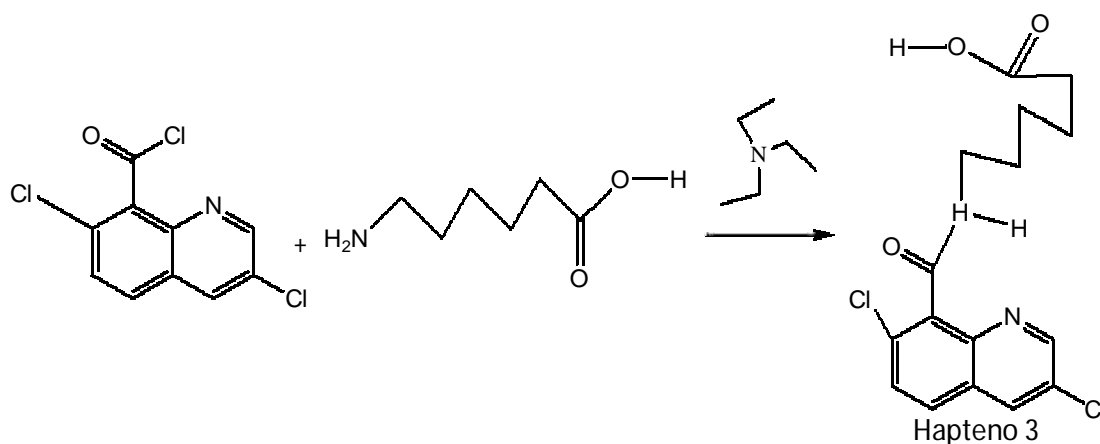


Figura 9. Síntesis del hapteno 3 del quinclorac

Síntesis del ácido 7-cloro-3-[(2-hidroxietil)amino]quinolina-8-carboxílico (hapteno 4). En vez de hacer reaccionar el quinclorac por el grupo carboxilo, se lo intentó hacer reaccionar por sustitución de un cloro por un grupo amino de la etanolamina, para obtener el hapteno 4 (figura 10).

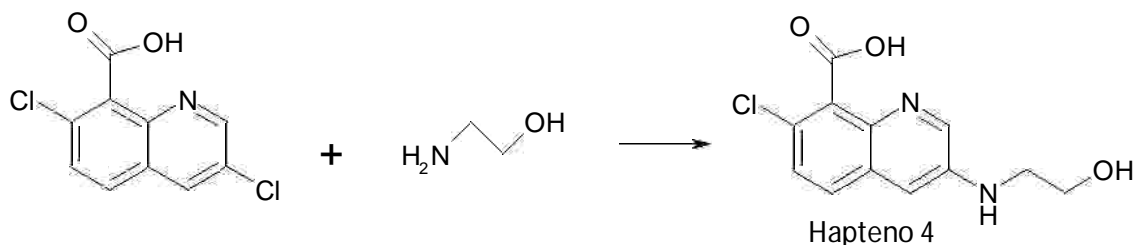


Figura 10. Síntesis del hapteno 4 del quinclorac.

Para esto, se agregaron 300 mg de quinclorac en 15 mL de N,N-dimetilformamida (DMF) seca. Se adicionaron 18 mg de ZnO y 0.1 g de Pd(PPh₃)₄ (Tetrakis(triphenylphosphine)palladium (0)). Luego se agregaron 0.9 mL de etanolamina. Se mantuvo en reflujo por 4 h. El work up se realizó enfriando a temperatura ambiente y extrayendo con acetato de etilo. Se secó con sulfato de magnesio anhidro, se concentró en rotaevaporador y se purificó en columna de sílica gel. Los restos de DMF se extrajeron con tolueno. La estructura obtenida se analizó por RMN.

Conjugación de los haptenos del quinclorac

Conjugación del quinclorac con carbodiimida (EDC) o EDC en combinación con sulfo-N-hidroxisuccinimida (sulfo-NHS). El quinclorac sin modificar se intentó conjugar a las proteínas carrier BSA, KLH, y OVA utilizando EDC o EDC en combinación con sulfo-NHS [57]. En estas condiciones, el grupo carboxilo de quinclorac podría reaccionar con un grupo amino de la proteína, formando una amida.

Para la reacción empleando EDC, se partió de una solución de 10 mg/ml de proteína en 0.1 M fosfato y 0.9M NaCl, a pH 7.2 (solución A), y de una solución de quinclorac de 10 mg/mL preparada en 255 μ L buffer 0.1 M fosfato, 0.9 M NaCl a pH 7.2 y 745 μ L dimetilsulfóxido (DMSO) (solución B). Se mezclaron 200 μ L de la solución A y 200 μ L de la solución B. Luego se adicionaron 8 mg de EDC, y se incubó por 2 horas a temperatura ambiente y con agitación suave. También se realizó la misma reacción recién descrita, pero en vez de emplear el buffer de reacción de pH 7.2, se usó el buffer 0.1 M MES, 0.15M NaCl y pH 4,7. Como control positivo del procedimiento de conjugación se empleó ácido benzoico en vez de quinclorac. Antes del agregado del EDC a la reacción, se tomó una muestra de la mezcla que se empleó como control de la reacción.

Para la reacción con EDC/sulfo NHS primero se activó el quinclorac. Para esto se mezclaron 200 μ L de la solución B y 400 μ L de buffer 0.05 M MES y 0.9M NaCl, pH 6. Se agregan 8 mg de EDC y 25 mg de NHS, y se incubó por 15 min. Luego se adicionaron 0.94 μ L de mercaptoetanol y se incubó por 10 min. Se tomaron 500 μ L del quinclorac así activado (1.7 mg) y se agregaron 500 μ L de solución A (1.7 mg de proteína). Se incubó por 2 horas.

La reacción empleando EDC se siguió por HPLC por gel filtración. Se empleó un equipo Waters HPLC (Milford,MA) modelo 1525, con un loop de muestra de 20 μ L, asociado con un detector Waters 2487 Dual ? Absorbance Detector, y una columna BioSep-SEC-S 3000 (300 x 7.8 mm) Phenomenex (Torrance, CA).

Conjugación de los haptenos 1, 2 y 3 con N-hidroxisuccinimida (NHS) y diciclohexilcarbodiimida (DCC). Los haptenos sintetizados que presentaban un grupo carboxilo (haptenos 1,2 y 3) y el quinclorac sin modificar, se conjugaron a proteínas carrier. Los haptenos se acoplaron covalentemente a los grupos lisina de la KLH, BSA y OVA, de acuerdo al método del éster activado [71]. Se empleó una relación de equivalentes reactivos de hapteno y p 2 a 1 (2 moles de grupos carboxilo a 1 mol de grupos NH₂).

Para esto, primero 0.02 mmol de cada hapteno se disolvieron en 0.2 mL de DMF seco con 0.05 mmol de NHS y 0.06 mmol de DCC. Luego de agitar a temperatura ambiente por 24 h, en cámara

con desecante, la dicitclohexilurea precipitada (DCU) se removió por filtración con algodón, y 0.2 mL del éster activado se agregaron lentamente a la solución proteica (25 mg de proteína en 5 mL de buffer borato pH 8.5, 0.1 M) con agitación vigorosa. Previamente se agregaron 250 µL de DMF seco a la solución proteica para mejorar la solubilidad del hapteno. La mezcla de reacción se agitó suavemente a 4°C por 24 horas para completar la conjugación y luego se dializó exhaustivamente contra buffer fosfato salino de fuerza normal (PBS, pH 7.5). El PBS se cambió 2 veces al día por 5 días. Finalmente los conjugados se dispensaron en viales criogénicos de 2 mL y se conservaron a -80°C. Se realizó un control de esta conjugación realizando espectros en UV

Conjugación del hapteno 4 empleando carbonildiimidazol (CDI). Con el hapteno 4 se realizaron conjugados con OVA utilizando el grupo OH activado con CDI [72]. Para esto, 2 mg de hapteno se disolvieron en 1 mL de DMF, se agitó por 2 h a temperatura ambiente y media hora a 37°C. A 3 mg de CDI se agregaron 200 µL de la solución del hapteno, se agitó vigorosamente por 3 h y se dejó reaccionar en oscuridad 18 h a temperatura ambiente. Se agregaron 3 µL de agua y se incubó por 5 min. Se agregaron inmediatamente 0.5 mg de proteína disuelta en 0.2 mL de buffer carbonato de sodio 100 mM, pH 8.5, lentamente a la mezcla de reacción con agitación continua. Se dejó reaccionar 24 h a temperatura ambiente y se dializó con PBS. Se determinó la concentración de proteínas y se controló espectroscópicamente (UV) la incorporación del hapteno.

Producción de anticuerpos policlonales y monoclonales para quinclorac y clomazone

Inmunizaciones. Para producir anticuerpos las mezclas de reacción se dializaron previamente en PBS 18 h. Para la producción de anticuerpos policlonales, 100 µg del conjugado correspondiente se disolvieron en 250 µL de PBS y se mezcló vigorosamente con 250 µL de adyuvante completo de Freund's para formar una emulsión espesa. Esta emulsión (primer) fue inyectada subcutáneamente en varios puntos en la parte posterior de conejos blancos New Zealand. Luego de 4 y 8 semanas, los animales fueron inmunizados (boosters) intramuscularmente con dosis adicionales de 100 µg de conjugados emulsionados en adyuvante incompleto de Freund's. Se extrajeron muestras de sangre entre inmunizaciones y luego que la sangre se coaguló y centrifugó, el suero se conservó a -20°C hasta su análisis. Los sueros se analizaron mediante ELISA competitivo como se explica bajo el siguiente subtítulo.

Para producir anticuerpos monoclonales, ratones BALB/C de seis semanas de edad se inmunizaron inicialmente intraperitonealmente, con 50 µg – 100 µg del conjugado en adyuvante completo de Freund's a una relación 1:1 de solución proteica a adyuvante. Se realizó un booster a las 3 semanas usando adyuvante incompleto de Freund's, Para controlar la producción de

anticuerpos se extrajo sangre de los ratones mediante sangrado de la cola, analizando los sueros por ELISA competitivo como se describe abajo. En algunos casos, si el título de anticuerpos era bajo, se realizaron inmunizaciones adicionales. Los ratones con la mejor respuesta de anticuerpos se seleccionaron, y tres días después de la última inmunización se sacrificaron y se prepararon los hibridomas como se explica más adelante.

En particular, con los conjugados del quinclorac usando EDC y EDC/sulfoNHS, se inmunizaron dos ratones. Se inoculó una suspensión de 50 µg de KLH conjugada con EDC y 50 µg de KLH conjugada por EDC/sulfoNHS, a cada uno. Se dio un booster, al ratón 1 con la misma mezcla que el primer, y al ratón 2 con 50µg de OVA conjugada por EDC y 50 µg OVA por EDC/sulfoNHS. Con los conjugados de los haptenos 1, 2 y 3 y quinclorac, con NHS y DCC, se inmunizaron conejos y ratones, siguiendo varios protocolos de inmunizaciones simples (con el mismo hapteno se dió el primer y los boosters) y cruzadas (se usaron distintos haptenos) con los distintos haptenos. Con el conjugado del hapteno 4 a OVA con CDI se inmunizaron tres ratones, con 100 µg de conjugado por ratón. Se usaron dos ratones nuevos y uno que había sido previamente inmunizado dos veces con 30 µg de OVAQ1 (OVA conjugada al hapteno 1). Se dió un primer booster, y a los 10 días se dió un segundo booster con el mismo conjugado. El ratón que presentó mejor respuesta se inmunizó 4 veces para producir anticuerpos monoclonales.

Tamizaje de sueros anti-hapteno por ELISA competitivo. Las concentraciones de los antígenos para cubrir las placas y dilución de los sueros a utilizar se determinaron por titulación en formato de tablero de ajedrez (“checkerboard titration”), empleando cantidades decrecientes de antígeno de sensibilización en filas, y diluciones crecientes de los sueros en columnas. Se seleccionaron condiciones para obtener lecturas de absorbancia de aproximadamente 1.0 unidad de absorbancia (UA) en ausencia del analito de competición. A menos que se aclare lo contrario, el antígeno utilizado para cubrir las placas, fue siempre el hapteno usado en la inmunización conjugado a un carrier diferente. El ensayo de competición se llevó a cabo en placas de microtitulación de 96 pocillos sensibilizadas con 100 ng/pocillo de conjugado y bloqueadas con 5% de leche desnatada en PBS. Las placas se lavaron tres veces con PBS conteniendo de Tween 20 (PBST), y se agregaron 50 µL/pocillo de diluciones seriadas del hapteno sin modificar (quinclorac o clomazone) en PBST (partiendo de 300 ng/mL) más 50 µL de la dilución seleccionada del suero de ratón o conejo. Luego de 1 h de incubación a temperatura ambiente, se agregó a los pocillos una dilución adecuada de un anticuerpo anti-IgG de ratón conjugado a HRP (horse radish peroxidase) para sueros de ratón, o el equivalente conjugado anti-conejo para los sueros de este animal, y se incubó por 1 h. Luego, las placas se lavaron, y se agregaron 100 µL/pocillo del sustrato de la peroxidasa (0.4 mL de una solución de 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (6 mg/mL en DMSO), 0.1 mL de H₂O₂ 1%, en un volumen total de 25 mL de buffer acetato 0.1 M pH 5.5). La

reacción enzimática se paró luego de 20 min por adición de 50 μL de 2N H_2SO_4 , y la absorbancia se leyó a 450/650 nm en un lector de placas de microtitulación (Multiskan MS, Thermo Labsystems, Waltham, MA).

Para probar los sueros de los ratones generados a partir de conjugados del quinclorac con EDC y EDC-sulfo NHS, se sensibilizó una placa con 1000 ng/pozo de BSA conjugada con EDC. Para el caso de los sueros producidos con los haptenos 1, 2 y 3, y el quinclorac libre conjugados por NHS y DCC, se probaron varios formatos de ELISA, homólogos (sensibilización con el mismo hapteno con el que se inmunizó) y heterólogos (sensibilizando con un hapteno diferente), involucrando a los distintos haptenos. Además se probaron distintos buffers de sensibilización a pH 4, 5 y 6. Para probar los sueros de ratones preparado con el hapteno 4, se analizaron formatos de ELISA heterólogos, sensibilizando placas con conjugados con BSA de los haptenos 1, 2, 3 y del quinclorac.

Producción de hibridomas. Para obtener anticuerpos monoclonales, los linfocitos de los ratones con mejor título de anticuerpos se fusionaron con células de mieloma SP2/0 [73]. Para esto se extrajo el bazo y los ganglios del ratón seleccionado, y los timos de otros dos ratones jóvenes. El bazo y los ganlios se maceraron sobre un colador de acero inoxidable con la ayuda del émbolo de una jeringa, y la suspensión se homogeneizó aspirando el macerado con una jeringa y expulsándolo con la punta de la jeringa apoyada contra la superficie de una placa de Petri estéril. Se realizó el mismo procedimiento con los timos. Paralelamente, se resuspendieron la células SP2/0 que se habían cultivado en RPMI, 5% de suero fetal bovino (SFB) manteniéndolas en la fase de crecimiento exponencial, y cada una de las sus nes celulares (bazo, timo y SP2/0) se lavaron por centrifugación a 900 rpm 5 min con 10 mL de PBS estéril, 3 veces. Se contaron las células, y las células de bazo se combinaron con las de mieloma en una relación de 5:1. Las células se centrifugaron y el pellet resultante se fusionó para formar los hibridomas mediante el lento agregado de 1 mL PEG 50% en 1 min, mezclando y con el tubo sumergido en vaso con agua a 37°C, seguido de 1 min de reposo. El pellet se resuspendió con el agregado de 10 mL RPMI a 37°C en 1 min. Luego de centrifugar, el pellet se resuspendió en 40 mL de RPMI 5% SFB y suplementado con la preparación de timocitos ($10^6/\text{mL}$) que actúan como promotores de la reproducción celular. Se sembraron 100 μL /pocillo en 4 placas de 96 pocillos de fondo plano (Greiner) y se incubó a 37°C. A las 24 h se agregaron 100 μL /pocillo de RPMI con SFB y HAT (medio hipoxantina-aminopterin-timidina). Luego de 24 h se sacaron 100 μL de cada pocillo y se agregaron 100 μL /pocillo de RPMI con SFB y HAT. A los 4 días se repitió el paso anterior. Cuando los hibridomas crecieron suficientemente, se realizó un tamizaje, ensayando los sobrenadantes que contenían los anticuerpos monoclonales (MAbs) secretados a través de ELISA

como se detalla más abajo. Los pocillos que fueron dando positivos se transfirieron o expandieron a placa de pocillos más grandes utilizando medio suplementado con HT (medio hipoxantina-timidina), y se volvió a testar su producción de anticuerpos.

Los grupos celulares ("clones") positivos que resultaron de interés se subclonaron por dilución límite. Para esto, se contaron las células en cámara de Newbauer, y se diluyeron de manera de tener suspensiones con 5, 2, 1 y 0.5 cél./200 μ L en 11 mL de RPMI con 10% SFB, HT, suplementado con timocitos (10^6 /mL). Luego se dispensó cada suspensión en placas de 96 pocillos, solución 200 μ L /pocillo, y se incubaron a 37°C observando regularmente la aparición de clones individuales hasta los 7 días. Se seleccionaron 5 pocillos que contenían 1 sola célula para cada grupo celular. A estos clones se les verificó la reactividad, se los expandió y una fracción se congeló como respaldo.

Tamizaje para la selección de anticuerpos monoclonales anti-haptenos. Tamizaje directo: Inicialmente los "clones" se analizaron por su reactividad contra el hapteno inm Para esto se cubrieron placas de ELISA con 100 ng/pocillo del correspondiente conjugado a quinclorac o clomazone con BSA, que era una proteína carrier distinta a la empleada para las inmunizaciones de los ratones. Se bloqueó con PBST 0.1%, y se agregaron 20 μ L de sobrenadante y 80 μ L de PBS BSA 0.1%. Luego de lavar, se agregó una dilución apropiada del conjugado anti-IgG de ratón conjugado a HRP, 1 h a 37°C, se volvió a lavar y se agregó sustrato como se describió antes.

Tamizaje competitivo: Este proceso de selección tiene como objetivo identificar los hibridomas que producen anticuerpos con alta afinidad por el hapteno libre. Para evidenciar esto se diseñó un ensayo de inhibición, dado que los anticuerpos con alta afinidad por el hapteno libre mostrarán mayor inhibición en presencia de cantidades límites del hapteno libre. A su vez como el grado de inhibición en un ensayo depende de la concentración de anticuerpo, del hapteno de competición (el hapteno conjugado) y el hapteno libre, si se fijan las dos últimas cantidades, pero se desconoce la concentración del anticuerpo (como ocurre en los sobrenadantes de distintos hibridomas donde un MAb puede producirse en mayores concentraciones que otros) el resultado final no representa fehacientemente la afinidad relativa de los anticuerpos a ensayar. Para estandarizar la cantidad de anticuerpo por pocillo de placa de ELISA, en un formato que permitiera el análisis de un alto número de "clones", se cubrieron los pozos con igual cantidad de un anticuerpo anti-IgG de ratón. Esa cantidad es varias veces menor que la cantidad de anticuerpo presente en un sobrenadante de hibridoma (aún para anticuerpos que se secretan en baja cantidad) y por tanto, cualquier "clon" de hibridomas la saturará asegurando que todos los pozos la misma cantidad de MAb anti-hapteno. La **figura 11** muestra un esquema de dicho ensayo.

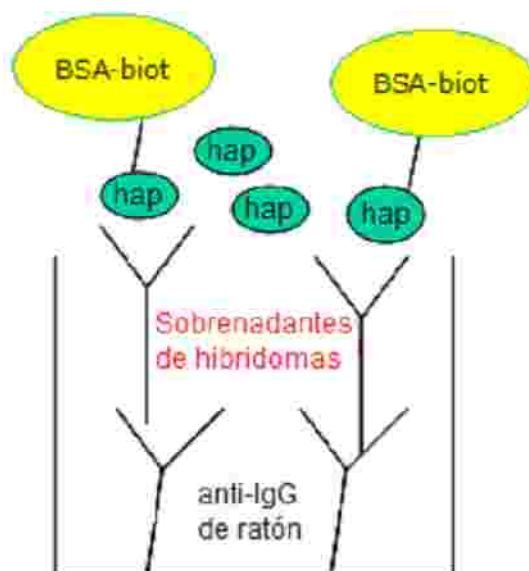


Figura 11. Esquema del ELISA para el tamizaje competitivo de hibridomas. La captura de cantidades idénticas (saturantes) de MAb presentes en el sobrenadante de los hibridomas permite comparar la inhibición alcanzada entre distintos clones. El conjugado hapteno (hap)-BSA, se encuentra biotinilado, y es detectado con la ayuda de un conjugado estreptavidina-HRP.

Las placas se cubrieron con 100 μ L de 5 μ g/mL de anticuerpos policlonales de cabra anti IgG de ratón y se bloquearon con PBST 0.1%. Inicialmente, se ajustó la concentración de conjugado hapteno-carrier-biotina, utilizando cinco “clones” representativos que hubieran pasado el primer screening. Se agregaron 20 μ L/pozo de cada sobrenadante de hibridoma y 80 μ L PBS BSA 0.1% (se realizó una fila para cada grupo celular), y se dispensaron diluciones al tercio del conjugado biotinilado a partir de 2 μ g/mL, incubando 1 h a 37°C. Luego de lavar, se agregó estreptavidina-HRP (SPO) 1/2500 en BSA 0.5%, y la actividad enzimática se midió como se describió antes. Se realizó un blanco con BSA al 0.1% en vez de los sobrenadantes. Se seleccionó la concentración de hapteno-carrier-biotina que dió absorbancias entre 1 - 2 UA a los 15 min. Con esa concentración de conjugado se pasó a ensayar los sobrenadantes de todos los hibridomas usando para cada uno de ellos concentraciones de 0.2 y 20.0 ng/mL del hapteno libre, eligiendo aquellos que dieron lugar al mayor porcentaje de inhibición, o sea mayor afinidad por el hapteno libre.

II. ELISA COMPETITIVO PARA CLOMAZONE

Los anticuerpos policlonales anti clomazone empleados se produjeron como se detalló en el numeral I. El procedimiento para la instrumentación del ensayo competitivo empleando estos anticuerpos se detalla en el **Artículo I** que se adjunta al final de esta tesis.

III. INMUNOENSAYO NO COMPETITIVO PARA CLOMAZONE EMPLEANDO FAGOS ANTI-INMUNOCOMPLEJO (PHAIA)

Los anticuerpos monoclonales anti-clomazone empleados en este ensayo se prepararon como se detalló en el numeral I.

Bibliotecas de fagos, panning, e instrumentación de PHAIA

Se utilizaron bibliotecas de péptidos expresadas en fagos filamentosos disponibles en el laboratorio, con una diversidad de 3×10^9 clones, cada uno de los cuales expresa un péptido de 7-11 aminoácidos con secuencia aleatoria fusionado a la proteína pVIII del fago. Esta secuencia está a su vez flanqueada por dos cisteínas que forman un puente disulfuro disminuyendo la libertad conformacional del péptido, facilitando interacciones de mayor afinidad. En estas bibliotecas se aislaron péptidos anti-IC, realizando panning contra el inmunocomplejo MAb 5.6 - clomazone. Los detalles de este proceso, así como de la posterior instrumentación de un ensayo tipo PHAIA, se describieron en el **Artículo II**.

Conjugación de las partículas virales ICX11 con la HRP

Además de las actividades reportadas en dicho artículo, se exploró la posibilidad de conjugar directamente los fagos para eliminar etapas en los ensayos a realizar. Los fagos se produjeron y purificaron como se explicó en el **artículo II**. Luego se cuantificaron como se detalla más abajo, obteniendo el Número de Unidades transductoras (UT)/mL. Conociendo el peso molecular de un fago (16.3 MDa) se calcularon los gramos de fago/mL. Para la conjugación, se preparó una solución de 1 mg/mL del fago en PBS 0.1M. Se agregó 1 μ L de la solución a 1 mg de la HRP activada (EZ-Link Plus Activated Peroxidase and Kit, Pierce, Thermo Scientific). La HRP estaba activada con aldehído y reaccionaba con aminas primarias de los fagos para formar enlaces amida. Inmediatamente se agregaron 3,3 μ L de cianoborohidruro de sodio (4,5 mg/mL) e incubó a temperatura ambiente por 3 h. Se agregaron 6.7 μ L de buffer de bloqueo (etanolamina 3M, pH 9), y se incubó a temperatura ambiente por 15 min. Se dializó con PBS 18 h a 4°C. Se conservó el conjugado a 4°C con trealosa, y se almacenó a -20°C agregando 10 mg/mL de BSA. El proceso se repitió con 5, 10 y 20 veces más de HRP activada. Se empleó un control de la conjugación al que no se le agregó HRP.

La cantidad de moléculas de HRP por fago se estimó cuantificando la actividad peroxidasa de los conjugados y titulando los fagos conjugados. Para la determinación de la actividad enzimática se utilizó como sustrato la misma solución de TMB que se empleó para el revelado de los ELISAs, y

se realizó una cinética de las reacciones midiendo la turbancia cada 10 segundos por 10 min. Se definió la actividad peroxidasa como la cantidad de enzima necesaria para producir 1 mmol de producto por min a 25°C (UE/mL), la correlación con el número de moléculas presente se determinó usando un estándar de HRP. También se estudió la reactividad de los fagos con el MAb5.6 y por el IC, analizando el revelado de los sistemas solo con la HRP de los conjugados o mediante el agregado de antiM13-HRP.

Titulación de fagos. Para titular los fagos se inocularon 5 mL de LB con cloranfenicol con una colonia de *E. coli* ARI 292. Se creció a 37°C con agitación ON. Se agregaron 1 mL de cultivo a un matraz de 100 mL con 20 mL de LB y se creció con agitación hasta una $DO_{600}=0.3$. Se agregó 1 mL del cultivo en eppendorf estéril y centrifugaron las células (5000 g , 5 min). Se sacaron 850 μ L y a los 150 μ L que quedaron se agregaron 10 μ L de dilución del fago. Para esto se prepararon diluciones seriadas al décimo (-6, -7, -8) del fago con PBS estéril. Se incubó a 37°C en baño de agua por 20 min sin agitación. Se plaquearon las células en placas de LB con ampicilina e incubó a 37°C ON. Se contó el número de colonias y calculó el n° fagos/mL en la solución stock, que se expresó como unidades transductoras (UT) por mL.

IV. ENSAYO ANTIINMUNOCOMPLEJO PARA CLOMAZONE CON NANOPEPTÁMEROS RECOMBINANTES

La metodología seguida para el desarrollo de un ensayo no competitivo para clomazone empleando una quimera de estreptavidina y un péptido anti-IC, se detalla en el **Artículo III**, que se adjunta al final de esta tesis.

V. MONITOREO DE CLOMAZONE Y QUINCLORAC

Ensayos de la disipación de clomazone y quinclorac en cultivos piloto

En las zafas agrícolas 2008/2009 y 2009/2010, se realizaron cultivos piloto de arroz en el INIA (Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria) Treinta y Tres, Uruguay, con el objetivo de determinar la disipación de clomazone y quinclorac en agua y suelo, y su relación con el manejo del agua del cultivo de arroz. Estos ensayos se instalaron en la Unidad Experimental Paso de la Laguna (UEPL-INIA), localizada en el este de Uruguay (33°:16'22"S, 54°:10'22"W). El ensayo se ubicó sobre un Brunosol Subéutrico Lúvico. En la zafra 2008/2009 el suelo a 10 cm de profundidad presentó las siguientes características: pH (H₂O) = 6.2, MO = 2.24%, P (Bray) = 3.9 μ g/g, P (Cítrico) = 5 μ g/g, K = 0.28 meq/100g, Textura = arenarcilloso (23% arena, 48% limo y 30% arcilla). Se sembraron 160 kg/ha de semilla cv. INIA Olimar. En la zafra 2009/2010, el pH fue 5.9 y presentó Textura arenarcilloso (27% arena, 47% limo y 26% arcilla).

Para estudiar la disipación de los herbicidas se utilizaron dos sistemas de riego: 1) Tratamiento de referencia (TR): que consistió en inundar el cultivo 30 días después de la emergencia, que es el procedimiento comúnmente usado en la producción local, y 2) Tratamiento temprano (TT): inundación del cultivo 15 días después de la emergencia. En ambos tratamientos, 13 días post emergencia, se aplicaron 384 g y 350 g de ingrediente activo por hectárea (g i.a.ha^{-1}) de clomazone y quinclorac, respectivamente, como formulaciones comerciales emulsificables en 120 L.ha^{-1} de caldo. De esta forma, permanecieron los herbicidas en el suelo sin capa de agua por 16 días en el caso de TR, y 2 días para TT. Los ensayos piloto consistieron en dos parcelas adyacentes de 112 m^2 , que en el período de inundación se mantuvieron con una capa de 10 cm de agua. Las parcelas se regaron individualmente y contaban con un regador con medidor del uso de agua. Además se extrajeron muestras de la unidad de producción de arroz ganadería del INIA (UPAG4). Las variables climáticas se monitorearon en la Estación Meteorológica de la unidad experimental.

Para los ensayos piloto TR, TT y la UPAG4 se recolectaron muestras de la lámina de agua de las parcelas en el momento de inundación (día 0), cada 2 o 4 días por 48 días después de la inundación (DDI), y previo al drenaje. También se muestreó el Río Olimar (fuente de agua del sistema) y el canal de conducción del agua de riego. Se extrajo agua de 1- 2 cm de profundidad de la capa de agua de las parcelas, y de 50 cm de profundidad en el río, en botellas de 1 L o frascos de 40 mL de vidrio color ámbar, extrayendo dos muestras de cada punto a muestrear con separación de 1 m entre sí. Las muestras se mantuvieron a 4°C y analizaron en la siguiente semana, se centrifugaron y opcionalmente se filtraron con filtro $0,4 \mu\text{m}$. Las muestras se analizaron directamente utilizando el ELISA policlonal desarrollado para clomazone, y se determinó quinclorac mediante HPLC, siguiendo el mismo protocolo reseñado para el clomazone en las muestras de agua en el **Artículo I** de la tesis. Las determinaciones por ELISA se realizaron por triplicados en ensayos independientes.

En la zafra 2008/2009, en los ensayos piloto y en la UPAG4, además se extrajeron muestras de suelos. Se recolectaron muestras compuestas de 10 cm de profundidad (10 puntos), doce días antes de la aplicación del herbicida, un día después de la aplicación y previo a la cosecha. Además para el tratamiento de referencia se recolectaron muestras a los 7 y 14 días después de la aplicación. Se extrajeron dos muestras compuestas de cada punto a muestrear con separación de 1 m entre sí, en frascos de vidrio color ámbar de 40 mL. Las muestras se liofilizaron y se mantuvieron a 4°C hasta su análisis. Para este análisis se contó con la colaboración de la Cátedra de Farmacognosia, de la Facultad de Química. A 5 g de suelo se extrajeron en un tubo de centrífuga de 15 mL, con 5 mL de una mezcla de 90% acetonitrilo: 10% agua. El tubo se agitó en shaker orbital a 200 rpm por 4hs. Se centrifugó a 3000 rpm por 35 min [74]. El extracto se filtró a

través de un filtro de teflón de 0.2 μm y se conservó a -20°C . Los extractos se analizaron por HPLC-UV como se describió en el **Artículo I** presentado en esta tesis.

Análisis de cursos de agua cercanos a un cultivo de arroz comercial

Asimismo se realizó un monitoreo de clomazone en muestras de agua de la Cuenca del Arroyo Tala en Salto, empleando el inmunoensayo con nanopeptámeros recombinantes, como se explicó en el **Artículo III**.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

I. ANTICUERPOS CONTRA QUINCLORAC

Síntesis de haptenos y conjugación del quinclorac

Teniendo en cuenta que la calidad de los anticuerpos está fuertemente determinada por la química de preparación del hapteno y su conjugación, se estudiaron distintas estrategias para modificar químicamente los herbicidas, introduciendo distintos grupos reactivos y/o grupos espaciadores, (“spacers”) de forma de preparar conjugados de distinta naturaleza. En general, el uso de grupos espaciadores aleja al hapteno de la superficie de la proteína carrier, haciendo que quede más expuesto, y facilitando su reconocimiento por los receptores del sistema inmune del animal a la hora de producir anticuerpos. En el caso del quinclorac (**figura 13**), teniendo en cuenta que la molécula tiene un grupo carboxilo que podría utilizarse para su conjugación, se intentó inicialmente la conjugación directa del herbicida a la BSA y KLH utilizando EDC y EDC/NHS. Para la reacción con EDC se probaron dos pH de reacción, pH 7.2 y pH 4.7. El pH 7.2 se empleó ya que el quinclorac tiene una piridina, y era posible que a este pH reaccionara mejor el ácido carboxílico.

Como control positivo del procedimiento de conjugación con EDC se empleó ácido benzoico y la reacción se siguió por gel filtración en HPLC. A pH 7.2, el ácido benzoico se conjugó a la BSA, lo que se evidenció como se muestra en la **figura 12**, por una disminución del pico correspondiente al ácido benzoico (tiempo de retención (rt): 13.0 min) de 1.7 veces. También se observó el corrimiento de los picos (dímero y monómero) de la BSA (rt: 7.5 y 8.5) hacia tiempos menores (rt: 5.1 min) probablemente por agregación, así como un aumento de su área, que estaría asociado a un incremento de su absorbancia debido a la presencia del ácido benzoico. Cuando se controló de la misma forma las reacciones del quinclorac no se evidenció la disminución del pico del quinclorac, ni un aumento del área del pico de BSA, aunque sí se encontró el mismo corrimiento de este pico como resultado de la polimerización. Por tanto, no se pudo evidenciar la conjugación del quinclorac por el método de EDC. En la reacción a pH 4.7 se obtuvo bastante precipitado al agregar el EDC, que no permitió evaluar la conjugación por gel filtración ni del ácido benzoico ni del quinclorac, pero no se evidenció un aumento en la absorbancia del conjugado respecto a igual concentración de BSA. En el caso del método EDC/sulfoNHS se obtuvieron resultados similares. De todos modos, como se pudo haber dado cierto grado de conjugación que no fuera detectada, se inmunizaron ratones con estos conjugados para evaluar su valor en la preparación de anticuerpos, pero los sueros de los ratones no dieron títulos aceptables.

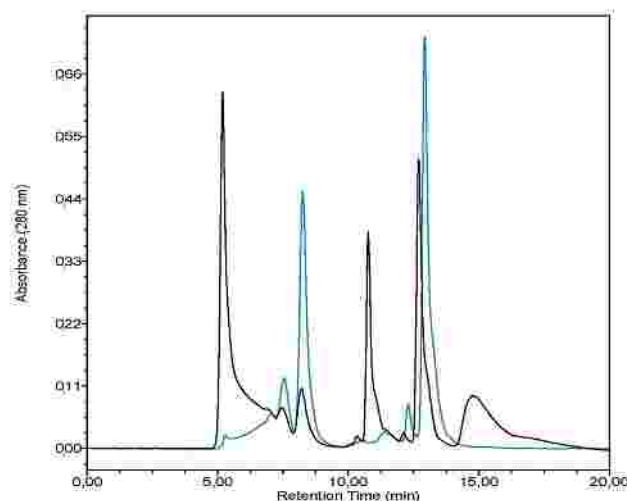


Figura 12. Seguimiento por gel filtración (HPLC) de la reacción de la BSA y el ácido benzoico por el método del EDC. Una alícuota de la mezcla de reacción sin agregado de EDC se empleó como control y se muestra con trazo celeste, y reacción con EDC se grafica con trazo negro. Ácido benzoico (rt 13.0 min), BSA (7.5 min y 8.5 min), en la inyección de. El pico eluido a los 11 min no pudo ser identificado.

La ausencia de conjugación del quinclorac en los experimentos anteriores podría deberse a una escasa reactividad de su grupo carboxilo, que estaría desactivado por la presencia de un nitrógeno básico cercano. Para sortear este problema y obtener haptenos con espaciadores se sintetizaron 4 haptenos derivados del quinclorac como se muestra en la **figura 13**. Los haptenos 1, 2 y 3 se sintetizaron por modificación del grupo carboxilo en condiciones más enérgicas, que permitieron su cloración y posterior reacción con ésteres de aminoácidos, mientras que el hapteno 4 se generó por sustitución de uno de los átomos de cloro por un amino alcohol.

Los haptenos que presentaban un grupo carboxilo (haptenos 1, 2 y 3) se conjugaron a proteínas carrier BSA, OVA y KLH con NHS y DCC, empleando un tiempo de reacción significativamente mayor que el empleado en la conjugación anterior con EDC. La conjugación se chequeó mediante espectros en UV. En la **figura 14** se muestran el espectro característico de un hapteno libre, de la proteína carrier sin conjugar y del conjugado dializado exhaustivamente. Todos los conjugados obtenidos mostraron espectros de este tipo, confirmando la conjugación por el aumento de la absorbancia del carrier. Para el hapteno 4, la conjugación se realizó utilizando CDI. El CDI, es un agente de carbonilación que contiene dos grupos acil-imidazol salientes, y puede reaccionar con grupos $-OH$ formando un intermediario imidazol carbamato, que puede reaccionar con grupos $-NH_2$ liberando el grupo imidazol y formando un carbamato. El conjugado obtenido no presentó un cambio tan marcado en el espectro UV como los obtenidos con la química de carbodiimidas, indicando que el grado de derivatización alcanzado no fue muy alto (no se muestra).

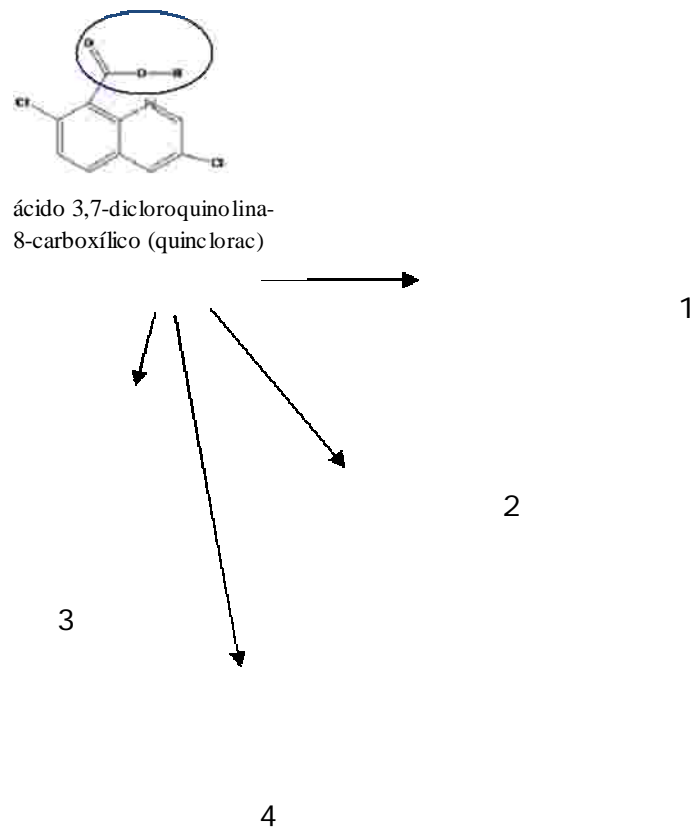


Figura 13. Quinclorac y los haptenos sintetizados mostrando (dentro de círculos) los grupos funcionales usados en la conjugación a proteínas carrier.

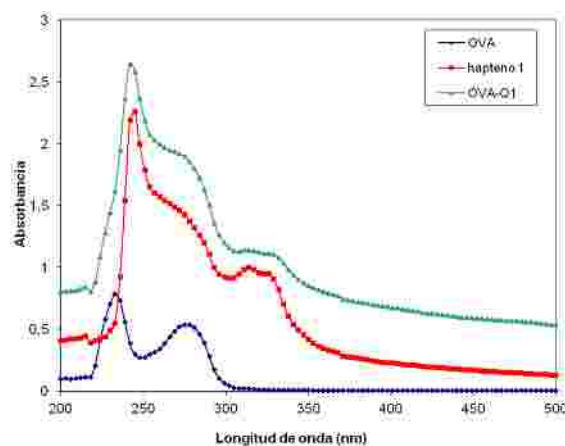


Figura 14. Espectros en UV-visible del hapteno 1, de la OVA y del conjugado de OVA con el hapteno 1 (OVA-Q1). La concentración del hapteno es la mitad de la concentración del hapteno que se usó en la reacción de conjugación.

Producción de anticuerpos para quinclorac

Con los conjugados de los haptenos 1, 2 y 3 preparados mediante EDC, se inmunizaron conejos y ratones. Se realizaron varios protocolos con inmunizaciones simples y cruzadas con los distintos

haptenos (en las distintas dosis se usaron conjugados con distintos haptenos). Los sueros dieron títulos altos de anticuerpos contra los haptenos de inmunizados, pero en ensayos de competición no tenían reactividad cruzada con el analito libre (quinclorac) y por tanto no se inhibían. La reactividad de los sueros de los ratones se ensayó en homólogos (el hapteno usado en la inmunización y en el ELISA son los mismos) y heterólogo (hapteno usado en la inmunización y en el ELISA son distintos), y a pH 4, 5 y 6, pero no fue posible inhibirlos.

A pesar de que los sueros no eran prometedores, de todos modos se realizó la producción de anticuerpos monoclonales con la esperanza de seleccionar clones poco frecuentes que mostraran inhibición. Para esto se usaron dos ratones que habían sido inmunizados de forma cruzada con conjugados de KLH unidos a los haptenos 2 y 3. A pesar de obtener un altísimo número de clones positivos, los sobrenadantes de los hibridomas reaccionaban con el hapteno inmovilizado, pero no tenían reactividad cruzada con el quinclorac libre. Esto podía deberse a que la carga negativa en el carboxilato del quinclorac libre se había perdido en el proceso de conjugación y por tanto no estaba presente en los haptenos contra los cuales se generaron los anticuerpos. Para demostrar esto, se utilizaron los haptenos 1, 2 y 3 como inhibidores competitivos en solución. En la **figura 15** se muestra el resultado de un ELISA para 3 clones, donde se observa como los sobrenadantes eran inhibidos por la presencia de los haptenos libres, pero no por iguales cantidades del quinclorac libre.

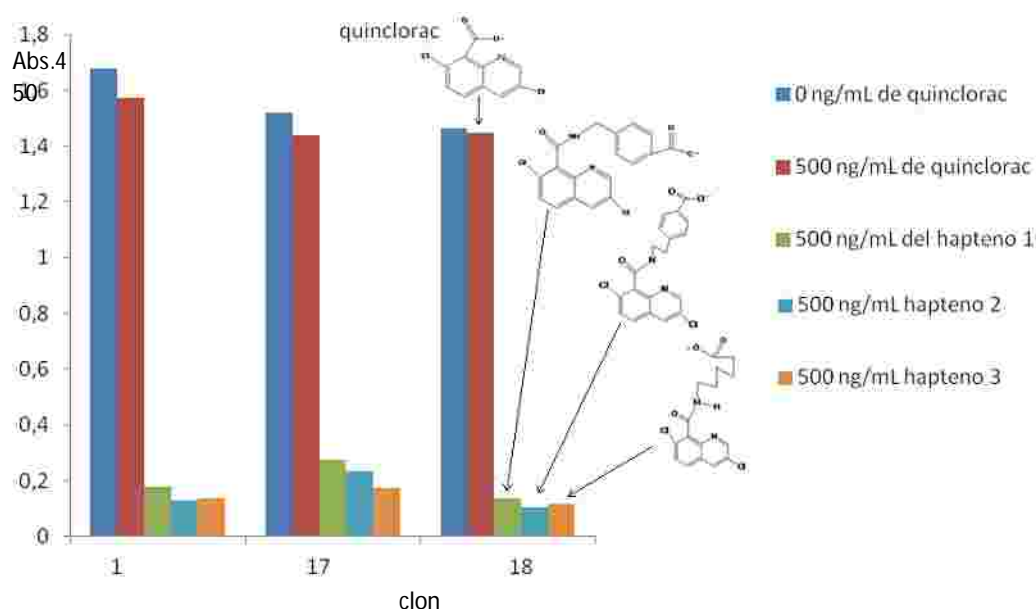


Figura 15. ELISA de competición realizado con los sobrenadantes de los hibridomas, sensibilizando con BSA conjugado al hapteno 3 (0.06 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Se pusieron a competir 500 ng/mL de cada uno de los haptenos libres: quinclorac, haptenos 1, 2 y 3, y del éster del hapteno 1. Se empleó un control sin competidor.

Como se mencionó antes, se probó haciendo el ELISA de competición con los hibridomas a pH ácidos 4, 5 y 6, buscando protonar al quinclorac libre y que pudiera competir mejor, pero esto no mejoró la competencia. Por otra parte, el pH que neutraliza al quinclorac es pH 2-3, pero a este pH tan bajo se desnaturalizan los anticuerpos. Una posibilidad, para aprovechar los anticuerpos obtenidos, sería derivatizar el quinclorac de la muestra formando una amida. Esta estrategia ha sido utilizada para otros plaguicidas con buenos resultados, pero significaría la pérdida del componente de simplicidad de la técnica y no se exploró.

En función de estos resultados, se pasó a sintetizar el hapteno 4 del quinclorac, de modo de preservar el grupo carboxilo libre y no cambiar la carga (-) del quinclorac. El grupo -OH introducido en este hapteno se conjugó a proteínas carrier, empleando CDI, y con estos conjugados se inmunizaron ratones y se prepararon anticuerpos monoclonales. Se inmunizaron conejos pero los sueros no fueron suficientemente inhibibles.

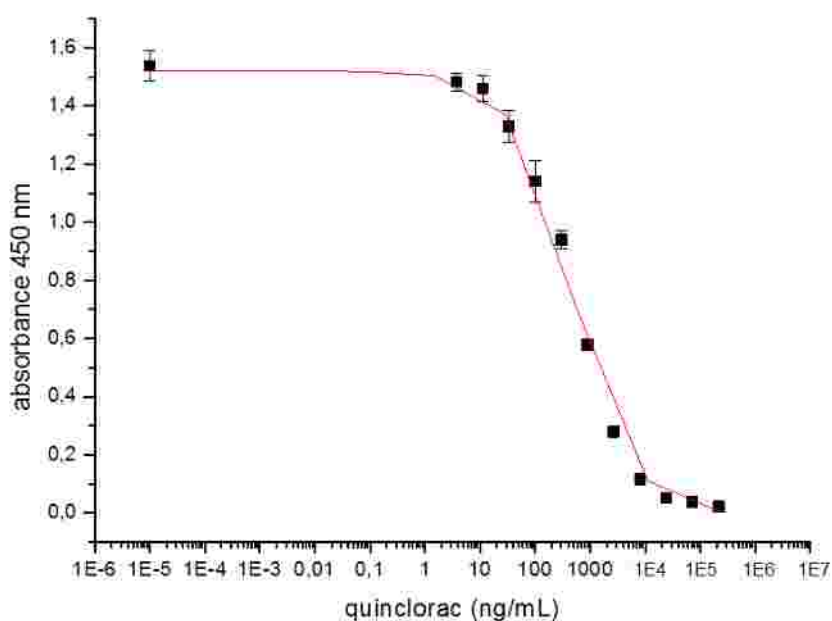


Figura 16. Inhibición con quinclorac del suero de ratón inmunizado con el hapteno 4 y seleccionado para la fusión. La curva mostró un IC_{50} de 330 ng/mL.

A diferencia de los sueros obtenidos con los haptenos anteriores, estos sueros de ratones si mostraron inhibición por el quinclorac libre. Se seleccionó el ratón cuyo suero presentó mejor reactividad cruzada con el quinclorac libre, el cual dio lugar a la curva de competencia que se muestra en la **figura 16**, con un IC_{50} de 330 ng/mL. La experiencia con otros herbicidas (como se relatará para el caso del clomazone en el capítulo III) mostró que aún con valores de afinidad media como estos, que están lejos de la sensibilidad final a alcanzar (~ 1ng/mL), es posible aislar clones productores de anticuerpos con buena reactividad cruzada con el herbicida. Sin embargo,

una vez realizada la fusión se obtuvieron nuevamente numerosos clones positivos pero ninguno presentó valores de inhibición útiles para el desarrollo de un inmunoensayo para quinclorac. Si bien este último intento presentó una mejora respecto a la conjugación por el carboxilo, podría ser que la sustitución del átomo de cloro también operara como un impedimento para el reconocimiento cruzado del quinclorac libre. A esto se suma el hecho de que el conjugado utilizado en la inmunización tendría una baja tasa de derivatización, lo cual se sabe, no representa un elemento favorable para la generación de anticuerpos anti-haptenos.

Debido a las dificultades encontradas, el desarrollo de un ensayo para quinclorac se abandonó, dado que su continuación requeriría explorar nuevas estrategias de síntesis, que no pudieron ser abarcadas en el curso de esta tesis.

II. ELISA COMPETITIVO PARA CLOMAZONE

El objetivo de esta etapa del trabajo fue generar un ensayo convencional de ELISA competitivo para la detección de clomazone en agua y suelo del cultivo de arroz. Los resultados principales de este desarrollo se resumen en la publicación “A Clomazone Immunoassay To Study the Environmental Fate of the Herbicide in Rice (*Oryza sativa*) Agriculture”, *J. Agric. Food Chem.* 2010, 58, 4367–437, **Artículo I**, que se incluye al final de esta tesis.

El clomazone no posee grupos químicos reactivos para la conjugación, por lo tanto previo a su conjugación debió modificarse químicamente. Se realizaron las estrategias que se muestran en la **figura 17**. Inicialmente se realizó la nitración del clomazone, introduciendo un grupo nitro en el anillo bencénico. En un segundo paso se hidrogenó el nitroclomazone, transformando el grupo nitro en amino. En la ruta A, este compuesto se conjugó directamente a las proteínas carrier (BSA y KLH) a través de una reacción de diazotación [75]. En la **figura 18** se observa el aumento de absorbividad en el visible de la BSA conjugada. En la ruta B, y con el fin de introducir un grupo separador, el aminoclomazone se hizo reaccionar con fenol a través de la formación de una sal de diazonio para dar el 2-{2-Cloro-4-[(4-hidroxifenil)diazenil]bencil}-4,4-dimetil-1,2-oxazolidin-3-ona (Phe-Clo). El grupo hidroxilo del espaciador con fenol se empleó para conjugar este hapteno a BSA y OVA empleando CDI. La conjugación se chequeó por espectroscopía UV-visible obteniéndose un espectro similar al obtenido mediante la conjugación directa.

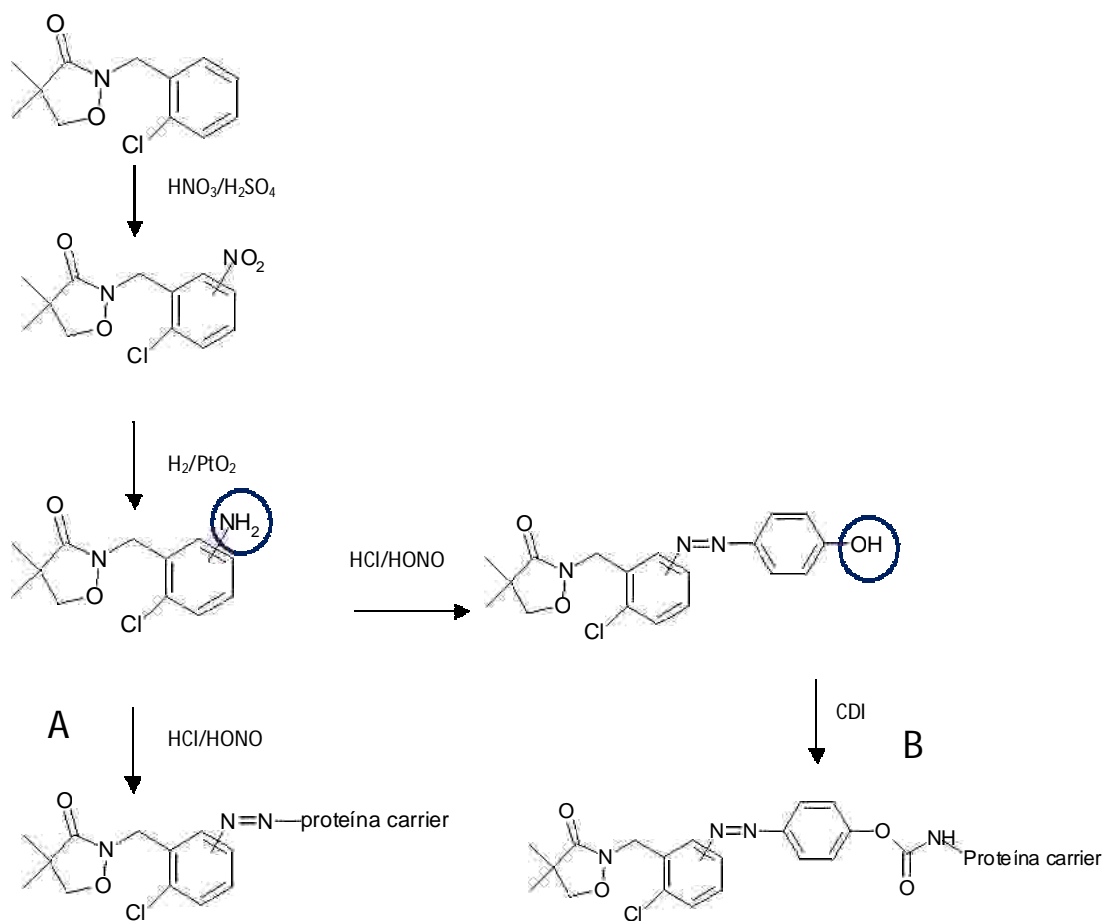


Figura 17. Esquema de las síntesis de los haptenos y conjugados del clomazone.

A: aminoclomazone, B: Phe-Clo

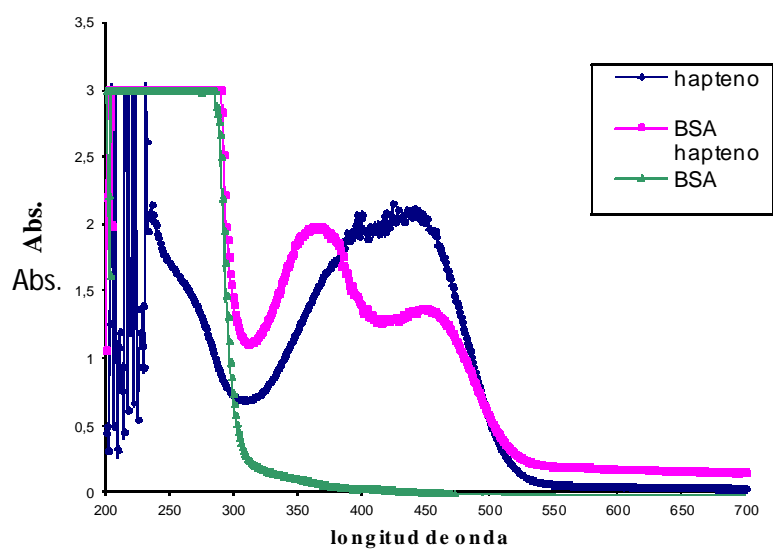


Figura 18. Espectros en UV-visible del hapteno del clomazone, de BSA sin conjugar y del conjugado.

Con los conjugados aminoclomazone-KLH y Phe-Clo-OVA se inmunizaron conejos para preparar anticuerpos policlonales. Experimentos preliminares mostraron que solo los anticuerpos preparados con el primero tenían potencial utilidad. Con estos se desarrolló un ELISA competitivo, utilizando formatos homólogos y heterólogos. En el formato homólogo, el conjugado de sensibilización de la placa era el conjugado de BSA con aminoclomazone, el mismo hapteno que se empleó para hacer los anticuerpos. En el heterólogo, el conjugado para la sensibilización fue el sintetizado con el Phe-Clo (conjugado a OVA). El uso de un hapteno distinto al de inmunización (formato heterólogo) ha mostrado ser una estrategia poderosa para aumentar la sensibilidad de los ensayos de competición cuando se usan anticuerpos policlonales. Esto es debido a que al emplear un hapteno distinto la reactividad cruzada con el hapteno hace que se reclute idealmente la subpoblación de anticuerpos de mayor afinidad por el hapteno libre [66]. Sin embargo en este trabajo, tras la optimización del ensayo, no se observó una mejora en la sensibilidad con el uso del formato heterólogo, de hecho ambos ensayos presentaron un IC_{50} similar (3.5 ng/mL el homólogo y 4.2 ng/mL el heterólogo **figura 1 del Artículo I**), optándose finalmente por el ensayo homólogo por ser más robusto y reproducible.

Una vez que se optimizó el ensayo homólogo se sometió a un proceso de validación. Para esto se estudió la reactividad cruzada con otros agroquímicos, se determinaron los valores de recuperación del analito cuando fue agregado (fortificación) a muestras de agua del cultivo de arroz, y se demostró la correlación del método con el ensayo de referencia instrumental. El ELISA desarrollado no presentó reactividad cruzada con los agroquímicos comúnmente aplicados en el cultivo en nuestro país (**Tabla 1 del Artículo I**) y probó ser una herramienta confiable para medir el herbicida en el rango de 2.0-20.0 ng/mL, directamente utilizando muestras de agua de campo (**Figura 3 del Artículo I**). Este valor de 2.0 ng/mL se encuentra por debajo del límite exigido del herbicida para aguas superficiales por la CEE, que es de 3 ng/mL [10]. El ELISA se comparó con la técnica de referencia HPLC y mostró una muy buena correlación (**Figura 4 del Artículo I**). Con el ensayo se analizaron muestras de agua del cultivo de arroz, cuyos resultados se discuten en el capítulo V de esta tesis. Es de notar, que a pesar de haber usado la misma estrategia de conjugación que la reportada por Koppatscheck et al. [76], el IC_{50} del ELISA alcanzado en nuestro trabajo (3.5 ng/mL) fue unas 3-4 veces mejor que el valor de 12.5 ng/mL reportado por estos autores.

El ELISA se preparó en formato kit. Para esto se prepararon placas mediante sensibilización, bloqueo y secado, y se guardaron en bolsas de nylon selladas en heladera, se adicionó biocida (Trimerosal) a las soluciones empleadas, y se prepararon soluciones estándares de clomazone que se conservaron a 4°C. Comparaciones preliminares, mostraron que el ELISA preparado de esta forma, producía resultados equivalentes a los obtenidos con reactivos preparados en el momento a partir del stock conservado a -20°C.

Además, como se presenta en el capítulo III, se inmunizaron ratones con aminoclomazone-KLH y se produjeron anticuerpos monoclonales con alta afinidad por el clomazone. Por otra parte, se intentó la producción de anticuerpos en ratones con el Phe-Clo, pero se obtuvieron títulos muy bajos. También se hicieron inmunizaciones cruzadas en ratones con los dos haptenos, sin mejorar los títulos.

III INMUNOENSAYO NO COMPETITIVO PARA CLOMAZONE EMPLEANDO FAGOS ANTI-INMUNOCOMPLEJO (PHAIA)

En una segunda etapa de este trabajo se exploró el desarrollo de un método no competitivo para la detección de clomazone. Las razones para llevar adelante este empre fueron por un lado, el potencial aumento de la sensibilidad de un ensayo de este tipo. Por otro lado, interesaba generar un ensayo que produjera una señal positiva (un ensayo no competitivo da una señal directamente proporcional a la concentración del analito) que posibilitara su adaptación en formatos de uso en campo. La tecnología elegida fue el método PHAIA, que como se ha comentado fue desarrollado en nuestro laboratorio y se basa en el uso de péptidos que reconocen específicamente el IC, y que son expresados en partículas virales. Mi contribución al trabajo consistió en el desarrollo del anticuerpo monoclonal, el montaje de los ensayos de competición de referencia y los estudios de reactividad cruzada del ensayo. El trabajo se realizó con la colaboración de Martín Rossotti que llevó adelante los experimentos de panning y puesta a punto del ensayo no-competitivo. Este trabajo se resume en el **Artículo II** que se adjunta al final de esta tesis: Phage Anti-Immuno-complex Assay for Clomazone: Two-Site Recognition Increasing Assay Specificity and Facilitating Adaptation into an On-Site Format. *Anal. Chem.* 2010, 82:8838–884,

Producción de anticuerpos monoclonales para clomazone

Los anticuerpos monoclonales se produjeron y seleccionaron procediendo de acuerdo a lo descrito en Materiales y Métodos. Se partió de ratones inmunizados con conjugados aminoclomazone-KLH utilizando ratones cuyos sueros mostraban los mayores índices de inhibición con el herbicida. Cuando se obtuvieron los hibridomas, luego de una primera selección por reactividad en placas cubiertas con clomazone-BSA, se analizaron 96 clones positivos mediante un tamizaje competitivo. En la **figura 19** se muestra un esquema del tamizaje y el grado de inhibición que presentaron 6 hibridomas representativos.

Como se indica en la **figura 19** se seleccionaron los hibridomas 5 y 21. Estos se subclonaron y se seleccionaron los clones MAb5.6 y MAb21.1, por presentar mayor afinidad por el clomazone

libre en comparación con el conjugado y por no reaccionar con el carrier usado para inmunizar. En la **figura 1 del Artículo II** se muestra la performance de estos monoclonales, en un formato competitivo, luego de optimizar las condiciones de sensibilización de la placa y diluciones del anticuerpo empleando titulaciones en formato de ajedrez. El ensayo competitivo setead con el suero del ratón del que se partió presentaba un IC_{50} de 345.3 ng/mL, mientras que el MAb21.1 presentó un IC_{50} de 109.2 ng/mL y el MAb5.6 un IC_{50} de 28.0 ng/mL, por lo que se eligió el MAb5.6 para continuar con el desarrollo. De esta forma, el método de tamizaje por inhibición permitió seleccionar clones que presentaban una mejor reactividad cruzada con el hapteno libre, que el valor promedio del suero del animal del cual fueron generados.

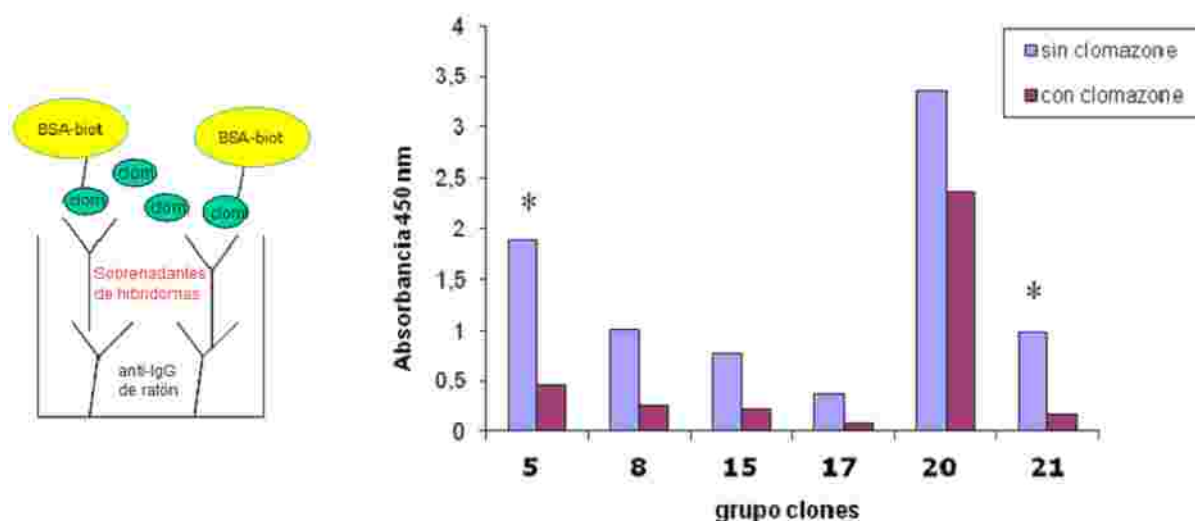


Figura 19. Esquema del ELISA competitivo para el tamizaje por inhibición de los hibridomas. Se muestra el resultado de clones representativos. La cantidad de anticuerpo en cada pozo está normalizada por saturación. Dado que el ensayo se realizó usando una cantidad fija del conjugado clomazone-BSA-biotina, y de clomazone libre, en ausencia de clomazone libre la diferencia de señal entre los distintos clones es el resultado de la diferente afinidad que presentan por el clomazone inmovilizado en el conjugado. Los clones que presentaron mayor inhibición en esta señal en presencia de clomazone libre (*) son los que tienen mayor afinidad por el clomazone libre en comparación con el conjugado, y por tanto tienen potencial para la detección del herbicida libre.

Desarrollo del PHAIA para clomazone

El MAb5.6 fue usado para seleccionar péptidos mediante "phage display". Se realizó la selección a partir de una biblioteca de péptidos al azar de 7 a 11 aminoácidos expresados en la proteína de superficie pVIII del fago M13, que reconocieran específicamente al inmunocomplejo MAb5.6-clomazone (**tabla 1** del artículo). Se eligió el péptido de 10 residuos ICX11 con el que se puso a

punto un ensayo PHAIA para clomazone en placas de ELISA cubiertas con MAb5.6, y el IC se detectó usando el fago anti-IC y se reveló con un anticuerpo anti-M13-HRP (**figura 3** del **Artículo II**). Este ensayo no competitivo tuvo un SC_{50} de 2.6 ng/mL (SC_{50} = concentración de analito a la cual la lectura de absorbancia del ELISA es la mitad de la absorbancia máxima). Ya que el ensayo competitivo seteado con el MAb5.6 tenía un IC_{50} de 28.0 ng/mL, la adaptación del ensayo competitivo al formato PHAIA, permitió aumentar la sensibilidad del ensayo en unas 10 veces, como se observó con otros sistemas anteriormente

Dado que se disponía de haptenos de clomazone con distintos grado de modificación (amino- y pheno-diazo-clomazone) este sistema permitió demostrar que además mejorar la sensibilidad del ensayo, el doble reconocimiento provisto por un ensayo tipo sándwich como el PHAIA, permite aumentar la especificidad. Esto se esquematiza en la **figura 20**, que recoge los resultados representados en la **figura 4** del **artículo II**, en el que se compara la reactividad del ensayo competitivo montado con el MAb5.6, respecto al ensayo HAIA montado con el mismo anticuerpo. Nótese como el amino-clomazone reacciona en forma idéntica al clomazone en formato competitivo, pero claramente distinta a la forma con que reacciona en el formato PHAIA. Como cabría esperar, el resultado es aún mucho más dramático para el phenol-diazo-clomazone.

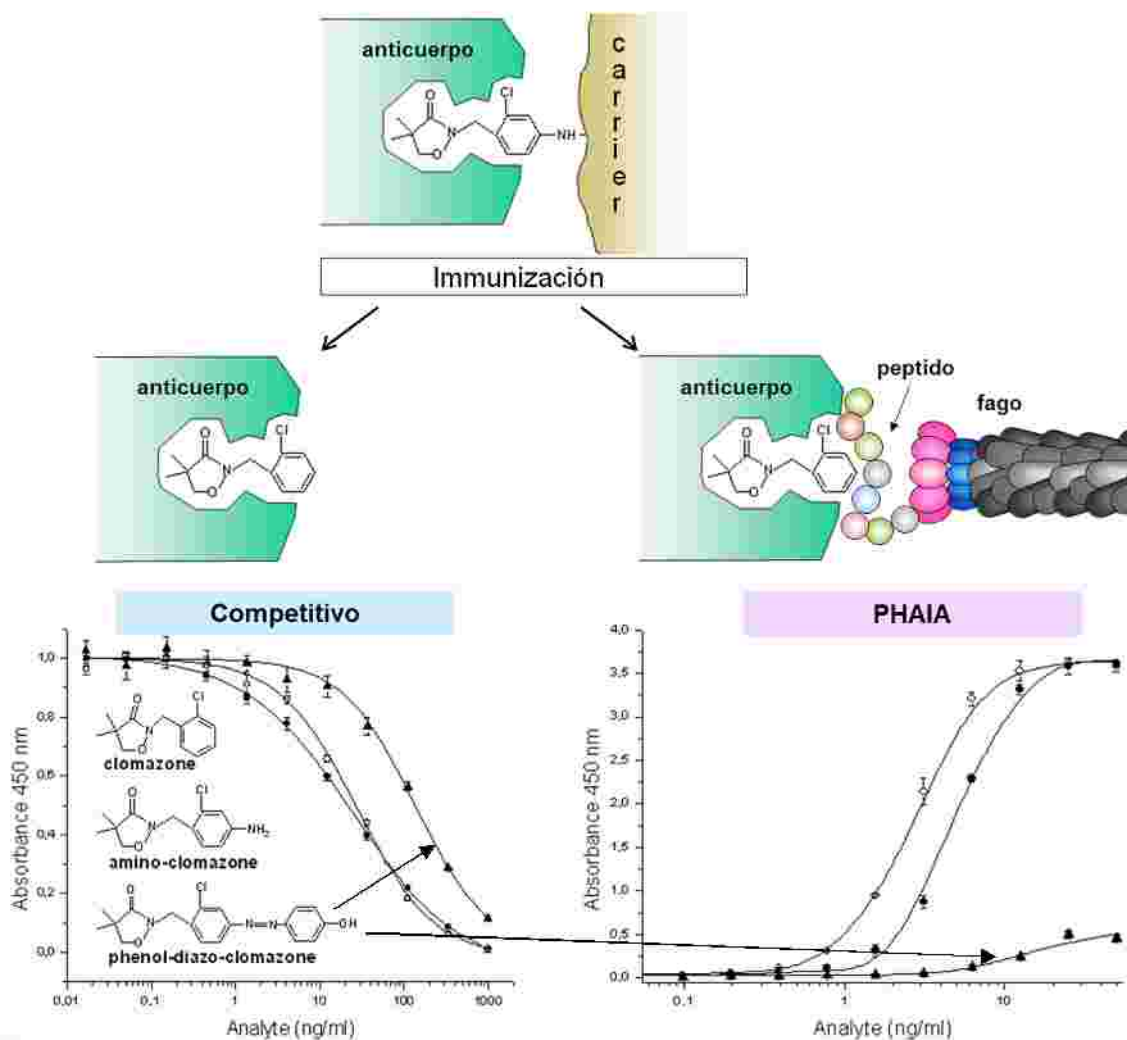


Figure 20. Representación esquemática mostrando la causa del aumento de especificidad y resultados de reactividad cruzada del ensayo PHAIA. Durante la inmunización el hapteno es reconocido por el anticuerpo de superficie o receptor de los linfocitos B (BCR) en la forma en que es expuesto debido a su conjugación al carrier. Una vez producido el anticuerpo monoclonal, en ambos ensayos el anticuerpo reacciona de igual forma con el analito, y en el caso de PHAIA hay un segundo reconocimiento que “afina” la especificidad del ensayo.

Asimismo, se compararon las determinaciones de clomazone por PHAIA y HPLC (método de referencia) de 13 muestras de agua del cultivo de arroz, obteniéndose una muy buena correlación entre ambos (**figura 5 del Artículo II**). El método funcionó con muestras reales de agua del cultivo, sin embargo para obtener recuperaciones aceptables de clomazone las muestras se debieron diluir al medio (**tabla 2 del Artículo II**), lo que determina que para estas muestras de agua los parámetros que caracterizan el ensayo eran del doble de los calculados en buffer, con un SC_{50} de 5.6 ng/mL y un LD considerado como el SC_{10} de 1.2 ng/ml. Además el ensayo tuvo un valor de LD definido como la concentración de clomazone que corresponde a un valor absorbancia igual al valor de cero concentración de analito más cinco desviaciones estándar de

0.3 ng/mL, 10 veces más bajo que el límite permitido por la CEE de clomazone para agua superficial.

La lectura positiva del PHAIA, permitió que fuera adaptado en un formato de inmunotubos rápido y sensible, con el cual fue posible detectar 0.4 ng/mL de clomazone en buffer por simple inspección visual, **figura 6 del Artículo II**, que se reproduce a continuación. Para las muestras de agua también fue necesario diluirlas al medio, lo que arrojaría un LD visual de 0.8 ng/mL.

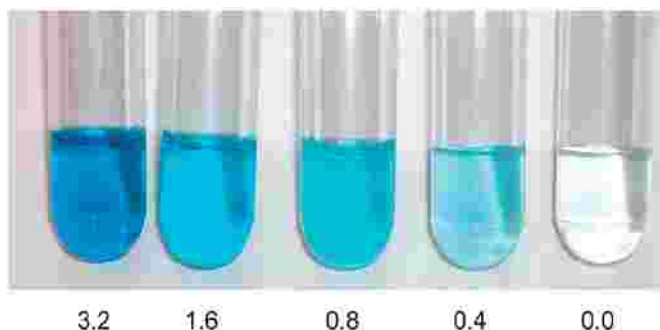


Figure 6. PHAIA immunotube assay. Tubes coated with MAb5.6 were incubated with clomazone standards (ng/mL) in PBST and phage ICX11, and the bound phage was detected with anti-M13-HRP.

De esta forma el método suministró una nueva herramienta para la detección de clomazone, y también constituyó un avance en el desarrollo de ensayos no competitivos, evitando la necesidad de síntesis química de haptenos (y sus conjugados) competitivos heterólogos.

Debido a que los anticuerpos policlonales para clomazone obtenidos en el capítulo II presentaban mayor sensibilidad por el clomazone que el MAb5.6 (IC_{50} de 3.5 vs 28.0 ng/mL respectivamente) se intentó la adaptación de este ensayo competitivo al formato PHAIA. Para esto se siguió la metodología descrita en el artículo II para buscar péptidos que reconocieran el IC anticuerpo policlonal-clomazone. Previamente los anticuerpos se purificaron, y se emplearon dos bibliotecas de fagos: la misma que fue usada en el artículo y otra biblioteca disponible en el laboratorio [77]. Sin embargo, no fue posible aislar péptidos de interés.

Conjugación de las partículas virales con HRP

Con el objetivo de disminuir los pasos involucrados (incubación con el anticuerpo anti-fago anti-M13-HRP) y obtener un ensayo más rápido, se exploró la conjugación del fago ICX11 con la HRP, procediendo de acuerdo a lo descrito en Materiales y Métodos. Los resultados de reactividad del fago modificado con la HRP usando distintas relaciones HRP/fagos se muestran en la **figura 21**.

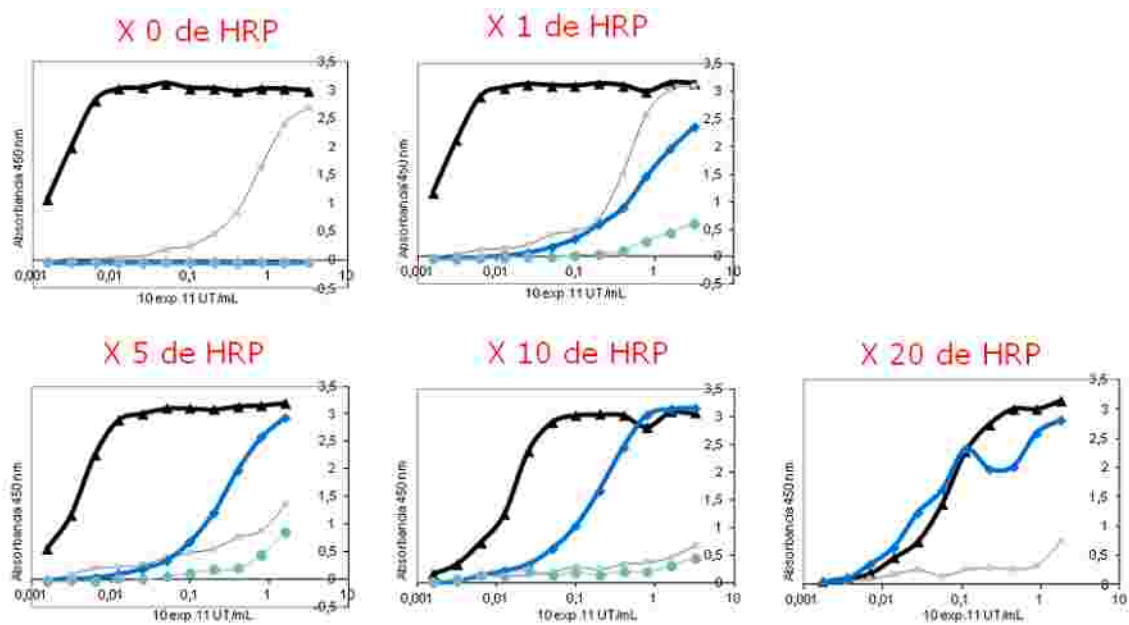


Figura 21. Evaluación de la reactividad del fago conjugado a HRP. La relación de masa HRP / masa de fago usada en la conjugación se muestra encima de cada gráfica. Se evaluaron distintas concentraciones del fago conjugado (UT/mL). El revelado de los sistemas se hizo por el agregado del anti M13-HRP (líneas negra y gris) o directamente mediante la actividad HRP conjugada al fago (líneas azul y celeste). La reactividad se ensayó contra el IC clomazone-MAb5.6 (líneas negra y azul) y contra el anticuerpo libre (líneas gris y celeste).

En el control sin conjugar (x 0) se obtuvieron curvas típicas de reactividad del fago contra el anticuerpo y el IC (revelando con antiM13-HRP, líneas negra y gris). En el resto de las gráficas se pudo evidenciar que ninguno de los conjugados del fago con HRP (líneas azul y celestes) permitió una discriminación tan clara entre el IC y el anticuerpo libre como los que se encontraron al usar el conjugado anti M13-HRP. El mejor resultado se obtuvo con una relación alta HRP/fago, pero la incorporación de HRP en la partícula viral deterioró la capacidad del fago de reaccionar con el IC (y con el anticuerpo), dado que aún revelando con el conjugado anti M13-HRP el resultado se vio afectado. Si bien el péptido ICX11 no posee lisinas, si puede afectarse su residuo amino-terminal en el proceso de conjugación (la HRP activada reacciona con aminos en el fago) y/o generarse efectos de impedimento estérico. Esto se evidenció al intentar usar estos conjugados en un formato PHAIA. Como se ve en la **tabla 1**, la química de conjugación afectó la funcionalidad de las partículas virales, disminuyendo la sensibilidad del PHAIA, dado que en ningún caso se alcanzaron los valores de SC_{50} de 2.6 ng/mL obtenidos con el fago sin modificar. En la Tabla 2 también se presenta la cantidad de moléculas de HRP incorporadas por fago.

Tabla 1. Caracterización de los conjugados fago-HRP con respecto al número de moléculas de HRP incorporadas por fago, y el SC₅₀ de los respectivos PHAIA, en presencia y ausencia de antiM13-HRP

Conjugado	moléc. HRP/ UT fago	SC ₅₀ (ng/mL) con antiM13-HRP	SC ₅₀ (ng/mL) sin antiM13-HRP
X 1 HRP	27.6 ± 0.8	12.3	*
X 5 HRP	99.9 ± 5.1	34.7	26.5
X10 HRP	159.1 ± 10.2	12.8	19.0
X20 HRP	227.5 ± 10.8	19.6	ND

*el conjugado no permitió obtener un formato de ensayo o para determinar el SC₅₀. ND: no se determinó

IV. ENSAYO ANTIINMUNCOMPLEJO PARA CLOMAZONE CON NANOPEPTÁMEROS RECOMBINANTES

El ensayo PHAIA no competitivo para clomazone, desarrollado en el capítulo III, presenta la desventaja de emplear partículas virales como reactivo químico. Si bien estas partículas son robustas y versátiles, no constituyen un reactivo convencional, y su naturaleza biológica podría resultar inconveniente para su uso en determinados laboratorios (ej. infección con fagos de *E. coli* usadas en biología molecular). Para sortear esta limitación, el laboratorio recientemente reportó la sustitución del fago por un complejo de péptidos sintéticos biotinilados y conjugados comerciales de estreptavidina, que denominamos nanopeptámeros [78]. Con estos nanopeptámeros se desarrollaron ensayos no competitivos con características similares a los ensayos de los cuales derivaron empleando partículas virales. Debido al costo de los péptidos sintéticos y los reactivos comerciales, en este trabajo se exploró la producción de un nanopeptámero recombinante formado por pICX11 y la estreptavidina, que pudiera utilizarse para la detección del clomazone, y revelando con un conjugado de biotina-HRP (**figura 22.A**). Los resultados se recogieron en el manuscrito “Recombinant nanopeptamer antiimmunocomplex assay for the detection of the herbicide clomazone in the runoff of rice fields”, **artículo 3** que se adjunta al final de esta tesis.

La estreptavidina es una proteína tetramérica que une una moléculas de D-biotina (vitamina H) por subunidad con una afinidad excepcionalmente alta (Kd de 10⁻¹³–10⁻¹⁶ M), siendo aproximadamente 10⁴-10⁶ veces mayor que la de interacciones antígeno anticuerpo típica. Además, tiene punto isoeléctrico neutro y no contiene carbohidratos, es más inerte en ensayos, resultando en menores uniones inespecíficas y por tanto mayor sensibilidad [79]. En *E. coli*, la estreptavidina ha sido expresada por otros autores tanto como proteína de fusión como sola, como una proteína insoluble o soluble [81, 82]. La estreptavidina es tóxica para *E. coli* debido a la unión a biotina. La sobreexpresión de proteínas recombinantes tóxicas en bacterias, lleva a bajos

niveles de producción debido al detenimiento del crecimiento, o a la formación reversible de agregados inactivos llamados cuerpos de inclusión que pueden ser difíciles de renaturalizar. Se pueden expresar grandes cantidades de estreptavidina como proteína insoluble en cuerpos de inclusión acumulándose a altas concentraciones, sin encontrarse efectos tóxicos sobre las células bacterianas [81], [83]. En uno de estos estudios se refoldó entre 40-50% del producto a tetrameros activos usando métodos estándar de diálisis, obteniéndose un tetramero sin biotina unida [83].

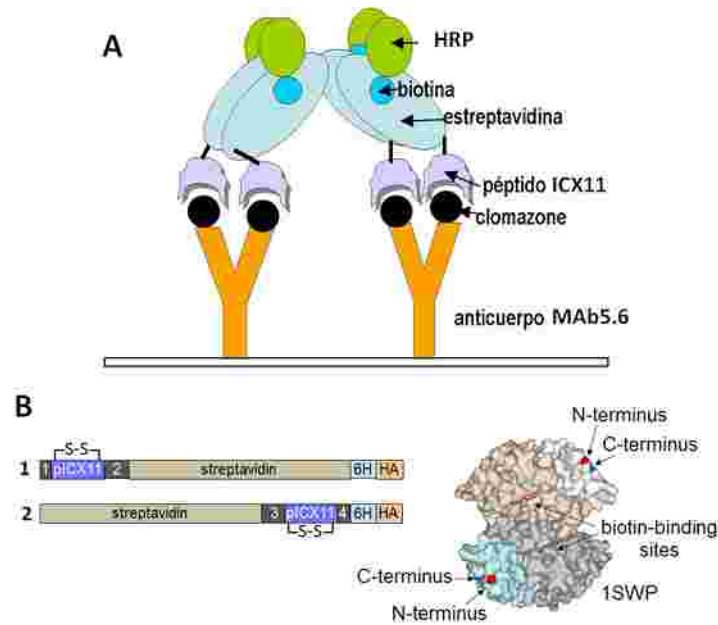


Figura 22. A. Esquema del ensayo no competitivo anti-inmunocomplejo MAb5.6-clomazone empleando estreptavidina recombinante con el péptido ICX11. HRP: Horse Radish Peroxidase. **B.** Esquema de la subunidad nanopeptamérica del core de estreptavidina (residuos 14-139) conteniendo el péptido (pICX11) anti-clomazone/MAb5.6 en el extremo N-terminal (quimera 1 = pICX11-STR) o C-terminal (quimera 2 = STR-pICX11). 6H y HA representan las secuencias tag HHHHHH e YPYDVPDYA, respectivamente. Los extremos N- y C- terminales donde se ancla el péptido pICX11, así como los sitios de unión a biotina se muestran en la estructura 1SWP (PDB) de la estreptavidina tetramérica.

El presente trabajo consistió en clonar y expresar en *E.coli* BL21 (DE3) dos quimeras de estreptavidina, con pICX11 unido al extremo N terminal o al C terminal de la estreptavidina, con una serie de secuencias separadoras, y secuencias que facilitaron su purificación por cromatografía de metales o su detección con un anticuerpo anti-HA, como se muestra en la **figura 22**. El vector de clonado también tenía la secuencia del péptido señal OmpA que dirige la proteína sintetizada al periplasma. El vector se electroporó en *E. coli*, y se probaron distintas condiciones de inducción (con IPTG) encontrándose en todos los casos que la proteína se producía en importante cantidad pero en forma de cuerpos de inclusión en el periplasma. Luego de solubilizar

los cuerpos de inclusión en urea 8M, la renaturalización de la proteína por dilución lenta por goteo se realizó en un formato de alto rendimiento (“high throughput”) ensayando 96 condiciones distintas resultantes de la combinación de distintas concentraciones de arginina, sacarosa, glicerol y polietilenglicol 800 y a distintos pHs (7, 8, 8.5 y 9). Posteriormente se seleccionaron las condiciones óptimas de renaturalización. Inicialmente, se analizó la funcionalidad de la estreptavidina en las quimeras estudiando la reactividad de las quimeras con la biotina, usando el formato A mostrado en la **figura 23**. El siguiente formato utilizado para testar las quimeras, esquema B de la **figura 23**, permitió examinar la reactividad de las quimeras contra el inmunocomplejo MAb5.6-clomazone, independientemente de su capacidad de unir biotina, para finalmente testarlas con el formato del ensayo donde ambos sitios de unión participaron, esquema C de la **figura 23**.

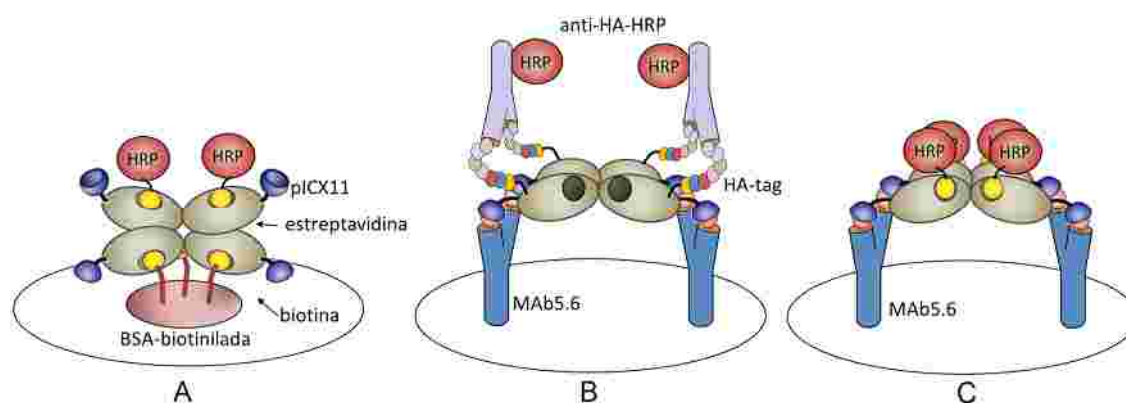


Figura 23. Distintos formatos usados para evaluar la reactividad de los nanopéptamos renaturalizados. El ensayo se realizó en placas de ELISA de 96 pocillos. Por simpleza, la secuencia “tag” HA solo se esquematiza en la figura B. En los formatos B y C se ensayó la habilidad de los nanopéptamos de reconocer el inmunocomplejo MAb5.6-clomazone, pero en el B se reveló con antiHA-HRP, y en el C con biotina-HRP. (El formato C es el mismo formato que el del ensayo que se planteó desarrollar).

Para las dos quimeras, en casi todos los experimentos de renaturalización se encontró una alta reactividad con la biotina (material suplementario del **Artículo III**). En los formatos B y C de la figura 23 de ensayos, la expresión C-terminal del péptido mostró una alta reactividad, pero de similar intensidad tanto con el IC como con el MAb5.6, dando lugar a una pobre relación señal/ruido (**Figura 3 del Artículo III**), por lo que esta quimera se descartó. La dificultad obtenida con esta quimera probablemente surja del hecho de que en la quimera el péptido está fusionado a las secuencias 6 x His y HA (**figura 22**), que aparentemente interferirían de alguna forma. Por otro lado, en los formatos B y C de la figura 23, en general, todas las quimeras con pICX11 unido al extremo N-terminal de la estreptavidina, reaccionaron fuertemente y

específicamente con el IC, con poca reactividad residual contra el MAb5.6 (**Figura 3 del manuscrito y figura S-2 de Supporting information**).

Para la quimera de expresión N-terminal, las señales más altas, y probablemente las renaturalizaciones más eficientes se dieron con los buffers sacarosa y glicerol. Con estos aditivos, al aumentar el pH, hubo una tendencia a disminuir la reactividad con el IC (**Figura 3**) y también levemente con la biotina (**Supporting information, figure S-1**). Entonces, a las quimeras que mostraron la mejor reactividad en los ensayos anteriores, se les estudió su performance mediante titulación en formato de tableros de ajedrez. El nanopeptámero reconstituido por dilución por goteo en buffer fosfato 100 mM, sacarosa 1.5M, pH 7.0, mostró las mejores relaciones de señal a ruido en un amplio rango de concentraciones de la quimera (**figura S-3, Supporting information del Artículo III**), y esta condición fue elegida para el desarrollo del ensayo.

El nanopeptámero se purificó por cromatografía de afinidad iónica empleando una columna de agarosa Ni-NTA, y se verificó la formación del tetrámero (PM~ 68 kDa) y la presencia del monómero (~18 kDa) en muestras tratadas a temperatura ambiente o calentadas a 95°C, respectivamente, por electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de SDS (Dodecil Sulfato de Sodio) (**Figura 4 del Artículo III**). Con el nanopentámero purificado, se optimizaron las condiciones del ensayo por ajuste en formato de tablero de ajedrez, y se montó un ensayo para clomazone basado en este nanopentámero, **figura 5 del Artículo III**. Se obtuvo un SC_{50} de 2.2 ± 0.3 ng/mL, un LD (SC_{10} : concentración del analito que dio un 10 % de aumento de la señal con respecto al cero) de 0.48 ng/mL. Además el ensayo tuvo un LD definido como la concentración de clomazone que corresponde a un valor de absorbancia igual al valor de cero concentración de analito más cinco desviaciones estándar, de 0.2 ng/mL, más de 10 veces más bajo que el límite permitido de clomazone para agua superficial. Estos parámetros son esencialmente los mismos que los reportados para el nanopeptámero preparado con péptidos biotinilados y estreptavidina-HRP comercial [78]. Esto indicaría un importante grado de flexibilidad respecto a la variación en el punto de unión del péptido al oligómero de estreptavidina, que no afectaría la avidéz global del nanopeptámero por el IC.

Estos parámetros son también similares a los obtenidos en el ensayo con fagos, en el cual el fago tenía varias copias del péptido en su superficie, y se revelaba con un anticuerpo en vez de con el sistema biotina-estreptavidina, pero estas diferencias no afectaron los parámetros que caracterizaron a los ensayos. Sin embargo, en el presente ensayo las recuperaciones de clomazone obtenidas por análisis directo de 3 muestras de agua del cultivo fortificadas, dio lugar a recuperaciones aceptables en el rango de 1.0 a 8.0 ng/mL (**Tabla 1 del Artículo III**), mientras que en formato PHAIA fue necesario diluir las muestras de agua al medio, por lo que el ensayo

con nanopeptámeros, en la práctica, operó con una sensibilidad del doble que el PHAIA. El ensayo así optimizado se empleó para analizar muestras de agua de la cuenca del arroyo Tala (Salto, Uruguay) cuyos resultados se presentan a continuación en el capítulo V de esta tesis.

V. MONITOREO DE CLOMAZONE Y QUINCLORAC

Empleando los inmunoensayos desarrollados para clomazone se analizó su perfil de disipación y la residualidad en muestras de agua en el cultivo de arroz y sus alrededores. Asimismo, si bien no fue posible obtener un inmunoensayo para quinclorac, se analizó su disipación en el agua del cultivo mediante HPLC. También se analizó la residualidad de clomazone y quinclorac en muestras de suelo del cultivo por HPLC. Para esto se realizaon dos estudios de disipación en cultivos piloto del INIA (Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria) en Treinta y Tres, en las zafra agrícolas 2008-2009 y 2009-2010, y un monitoreo en la cuenca del Río Tala (Salto) junto a una chacra comercial en la zafra 2010-2011.

Estudio de la disipación de clomazone y quinclorac en agua y suelo del cultivo de arroz bajo dos tratamientos de riego usando el inmunoensayo competitivo para clomazone

En la zafra 2008/2009 se instaló un ensayo en la Unidad Experimental Paso de la Laguna (UEPL-INIA), con el objetivo de determinar la disipación de clomazone y quinclorac en agua y suelo, y su relación con el manejo del agua del cultivo de arroz. Los ensayos piloto se planificaron de modo de simular las condiciones de cultivo empleadas en nuestro país, que se esquematizan en **figura 24**. Se evaluaron dos tratamientos de riego, el tratamiento de referencia (TR), reproducía las condiciones comúnmente usadas que implican esperar 16 días luego de la aplicación del herbicida para inundar, mientras que en el tratamiento temprano (TT) se esperaron solo 2 días.



Figura 24. Esquema de las condiciones de cultivo utilizadas en la producción de arroz nacional. El ensayo piloto TR, reproducían las condiciones comúnmente usadas que implica esperar 16 días luego de la aplicación del herbicida para inundar, y en el TT se esperaron 2 días.

Clomazone: La determinación de clomazone en agua del cultivo se realizó utilizando el ELISA policlonal dado que en ese momento no se disponía de los otros ensayos. Para este ELISA se registraron desvíos estándares inter-ensayos menores al 20%. Los principales resultados se resumen en el **Artículo I** presentado al final de la tesis. Para la determinación en muestras de suelo, el herbicida se extrajo del suelo liofilizado y el extracto se analizó por HPLC. El análisis de suelos fortificados con 45, 70 y 150 ng/g de clomazone, mostró buenas recuperaciones (entre 70-85%). Lamentablemente, las muestras de suelo no pudieron analizarse por ELISA ya que se presentó un importante efecto matriz, aún cuando éstas se diluyeron hasta 20 veces. La posibilidad de incluir buffers que compensaran este efecto o pre-tratamientos adicionales no se exploró dado que esta matriz no constituía el blanco principal de este estudio.

Los resultados se resumen en la **figura 25**, algunas de estas muestras se analizaron simultáneamente por HPLC, dando lugar a la gráfica de ELISA/HPLC presentada en la **figura 4** del **artículo I**.

TR

TT

Figura 25. Disipación de clomazone en agua y suelo de cultivos piloto de arroz en la zafra 2008/2009. Se utilizaron los tratamientos de referencia (TR) y temprano (TT) que se esquematizan al pie de la figura. Las determinaciones en agua se hicieron con el ELISA policlonal y las determinaciones en suelo por HPLC. Los valores correspondientes a concentraciones inferiores al límite de detección se representan como 0.

Los resultados mostraron una clara diferencia entre los dos sistemas de irrigación, a partir de concentraciones similares de herbicida en el suelo. El procedimiento comunmente usado, TR, promueve una persistencia del herbicida en el suelo donde, en los 12 días posteriores a la aplicación se produjo una disipación de clomazone de un 50%. En ambos tratamientos al inundar el predio la concentración de clomazone en agua aumentó rápidamente hasta a un máximo y luego descendió lentamente. Al inundar el TR, el herbicida comenzó a pasar a la capa acuosa alcanzando un pico de 25.6 ng/mL a los 9 días después de la inundación (DDI), para comenzar a disminuir hasta llegar a niveles menores a los ambientalmente permitidos hacia el día 35 DDI (50 después de la aplicación (DDA)). Una inundación temprana, TT, por el contrario se traduce en niveles muchos mayores en el agua, con un pico de 129.4 ng/mL (5 veces mayor que en TR) a los 6 DDI, para luego disminuir hasta alcanzar valores aceptables también a los 41 DDI (43 DDA). Este último método de irrigación dió lugar a concentraciones mucho más altas de herbicida en agua, durante un período más prolongado. Esta situación implicó un riesgo de vertido de agua con altas concentraciones del herbicida al ambiente, debido a desbordes por fuertes lluvias y viento. Sin embargo, como se discute más abajo, el TR también conllevó riesgo de salidas de clomazone del predio del cultivo. En ambos casos los niveles medidos en las últimas muestras antes del drenaje eran inferiores al límite de 3 ng/mL exigido para aguas superficiales por la CEE, evidenciando que en las condiciones en las que se desarrolló el ensayo, sería necesario esperar siempre, al menos, 35-45 DDI. Aún así, lo deseable sería disponer de un método simple que permitiera monitorear los niveles del herbicida antes de liberar el agua. En la literatura se

encuentran trabajos con distintas curvas para la disipación del clomazone, consecuencia de la cantidad de factores que afectan el comportamiento del mismo en el ambiente (composición del suelo, manejo del cultivo, condiciones climáticas) [84]. Además, los valores máximos de clomazone encontrados en suelo en estos ensayos son menores que los encontrados en un cultivo experimental en New South Wales, Australia, donde la concentración máxima media fue de 602.7 ng/g a los 4 días luego de la aplicación [11], pero mayores que los encontrados en estudios de disipación en el cultivo en Rio Grande do Sul donde detectaron valores residuales máximos de 63 ng/g [85].

El día en que se inundó el TT se realizó un baño al TR (aporte de 50 mm de agua). Los baños son una práctica común en el cultivo, la cual se realiza previo a la inundación definitiva. Consiste en regar el cultivo con el objetivo de favorecer la emergencia y/o el desarrollo de las plantas, fundamentalmente cuando el suelo se seca demasiado. De una muestra tomada a la salida del agua de esta parcela se detectaron 70 ng/g de clomazone. Asimismo en el período en que no estuvo inundado hubieron lluvias en dos momentos distintos de 15 y 43 mm, eventos que implicaron riesgo de salida de clomazone del sistema.

Con respecto al efecto de las condiciones climáticas en la disipación del clomazone, en el período en que el cultivo del TR estuvo sin lámina de agua, la media de temperaturas máximas fue de 28.5 °C y el suelo permaneció húmedo, lo que promovió la degradación microbiana del herbicida. El escurrimiento es otro factor que afectó la disipación luego del baño y en los dos eventos de lluvias. Por otro lado, la temperatura creciente favoreció la volatilización del clomazone. Estos factores climáticos también estimularon en el cultivo inundado la degradación microbiana anaerobia (que es más rápida que la aerobia) y la volatilización.

El estudio de disipación de clomazone se repitió en la zafra 2009-2010 y como se muestra en la **figura 26** los resultados siguieron un perfil similar a la zafra anterior, pero con concentraciones menores de clomazone. En esta zafra ocurrieron abundantes precipitaciones (mayores que en la zafra anterior) especialmente en los primeros días luego de la aplicación de los herbicidas, y hubieron altas temperaturas **figura 27**. Midiendo la concentración de clomazone en el agua de lluvia que drenaba (escurría) del cultivo con TR previo a la inundación, se encontraron 400.3, 22.2 y 53.1 ng/mL a los 3, 4 y 5 DDA, mostrando que, dependiendo del clima, el método TR puede dar lugar a la liberación ambiental de concentraciones muy altas de herbicidas. Esto, junto con los otros factores involucrados en la disipación, causaron que en el agua del TT se encontraran a niveles máximos 8 veces más altos del herbicida que en TR.

Asimismo, cuando se inundó las condiciones climáticas deben haber propiciado la degradación anaerobia y volatilización en la capa de agua, así como posiblemente desborde de las parcelas, lo que causó los menores niveles encontrados respecto a la zafra anterior. Además, la disipación fue más rápida en esta zafra, encontrándose que el nivel de clomazone se ubicó por debajo del límite estipulado para aguas superficiales a partir de los 42 DDA y 27 DDI y para el TR y de 37 DDA y 35 DDI para el TT.

Durante el período en que se llevaron a cabo estos estudios no se detectó residuos de clomazone en el agua del Río Olimar (fuente de agua), ni en el canal de riego.

Figura 26. Disipación de clomazone en agua de cultivos piloto de arroz en la zafra 2009/2010.

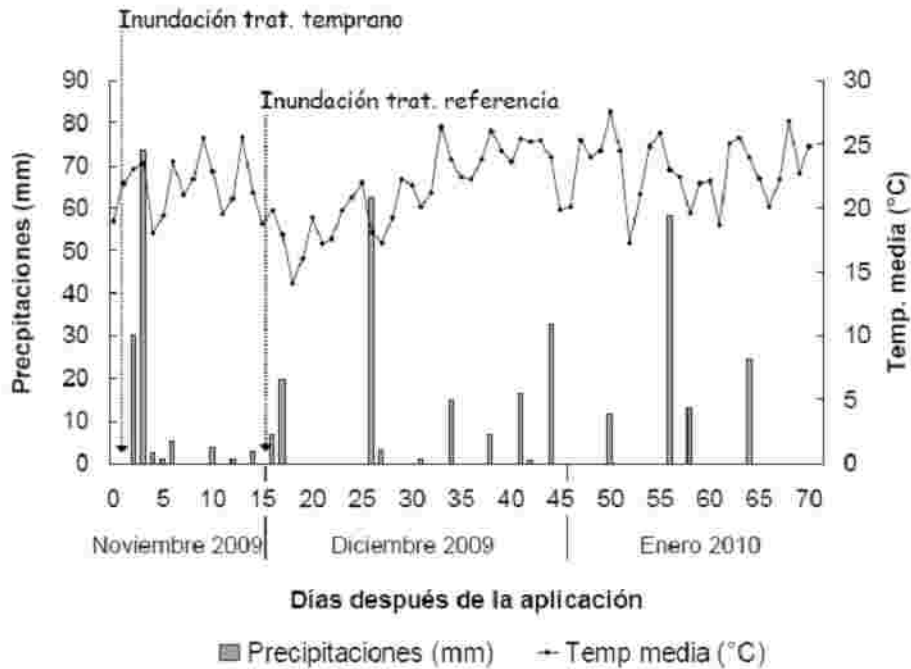


Figura 27. Precipitaciones y temperatura media a lo largo de la zafra 2009-2010. Los datos se recogieron entre el 16/11/2009 al 25/01/2010, por la Estación Meteorológica de la Unidad Experimental Paso de la Laguna/INIA, Treinta y Tres, Uruguay

Quinclorac: Al carecerse del correspondiente inmunoensayo, la determinación de quinclorac en la zafra 2008/2009 se realizó exclusivamente por HPLC, con un límite de detección 0.5 ng/mL, y los resultados se presentan en la **figura 28**. Para la determinación en muestras de suelo, el herbicida se analizó por HPLC en las mismas condiciones que para clomazone. En forma similar a lo observado para clomazone, el nivel máximo de quinclorac en agua en el TT fue 4 veces mayor al nivel máximo del TR (154 .1 vs. 40.1 ng/mL), los cuales se detectaron a los 6 y 9 DDI, respectivamente. También en suelos, en el TR antes de inundar se evidenció una disipación similar a la observada para clomazone, y luego hubo una menor concentración en la capa de agua. Asimismo, en el TR como consecuencia del baño, se encontró 80 ng/mL de quinclorac en el agua que drenaba del cultivo. Una preocupante diferencia, es que el quinclorac disipa más lento que el clomazone, apareciendo en concentraciones elevadas aún en las últimas tomas realizadas a los 60 DDA. Sin embargo en la toma realizada el día del drenaje la concentración fue menor al límite de detección del HPLC (0.5 ng/mL). Para futuro, es importante analizar muestras entre los 60 DDA y el momento del drenaje para determinar a partir de que momento sería inocuo liberar el agua del cultivo. Esta mayor persistencia del quinclorac ya se había visto otros autores en otros países. Se reportó que el quinclorac presentaba movilidad variable dependiendo del tipo de suelo

y materia orgánica, y podía persistir en el suelo por un año afectando a cultivos susceptible en programas de rotación[86].



Figura 28. Disipación de quinclorac en la zafra 2008/2009, determinada por HPLC, en los TR y TT. Con el círculo rojo se señala el alto nivel de quinclorac que persistió en agua después de los 50 días post aplicación. Los valores correspondientes a concentraciones inferiores al límite de detección se representan como 0.

UPAG-4. Además del estudio en los predios experimentales, se realizó un estudio similar en una unidad de producción arroz-ganadera del INIA (UPAG-4), en las dos zafras y analizando la residualidad de clomazone en agua y suelo. Esta unidad, a diferencia de los predios experimentales, tenía una escala similar a las unidades de producción de arroz comercial. El sistema de riego aplicado fue el equivalente a TR, y el estudio se llevó adelante con un esquema de muestreo similar al empleado en los predios pilotos, y las muestras de suelo antes y después del cultivo. En ambas zafras, en las muestras extraídas en puntos cercanos a la entrada de agua y en el medio de las parcelas, se observó una disipación de clomazone similar a la obtenida en los TR. Antes de la inundación, y como consecuencia de baños y lluvia, se encontraron salidas de agua de las parcelas de una concentración máxima de clomazone de 55.3 ng/mL para la zafra 2008-2009, y un máximo de 118.4 ng/mL para la zafra 2009-2010. En las muestras de suelo extraídas en la zafra 2008-2009, antes y después del cultivo, los niveles de clomazone estuvieron por debajo del límite de detección del ensayo (no se muestra).

Durante el período de estudio, los niveles de clomazone y quinclorac en muestras de agua del Río Olimar (de donde se toma el agua para el riego) y en el canal de riego, fueron menores que los niveles aceptados para aguas superficiales.

De estos datos se desprende que resulta importante realizar prácticas de manejo del agua que eviten o minimicen el movimiento de ésta hacia fuera del cultivo en el período previo a la inundación cuando se realicen baño/s u ocurran lluvias, y especialmente en los primeros días luego de la inundación, por ejemplo empleando sistemas de contención de agua adecuados. Si esto fuera así, una inundación más temprana tendría la ventaja de estimular la degradación anaerobia (que es más rápida que la aerobia) ya que la volatilización desde el suelo es otro factor de riesgo importante a considerar. Este tipo de estudios, si bien son preliminares, permiten ir generando información acerca de como las prácticas de manejo y las condiciones climáticas interactúan con los niveles de disipación de los agroquímicos y constituyen el pilar inicial para delinear buenas prácticas de manejo que permitan alcanzar buenos niveles productivos preservando el medio ambiente, así como alcanzar mercados más exigentes.

Análisis de cursos de agua cercanos a un cultivo de arroz comercial usando el ensayo no competitivo con nanopeptámeros

En este estudio, realizado en la zafra 2010-2011, se utilizó el ensayo desarrollado con nanopeptámeros recombinantes que se describió en el capítulo anterior, y forma parte de los resultados reportados en el **Artículo III**. El objetivo fue mostrar la capacidad de utilizar el ensayo para medir muestras reales y monitorear clomazone en cursos de agua cercanos a un establecimiento de producción de arroz comercial. Esta área productiva se compone de 930 ha, situada en la cuenca del arroyo Tala, en Salto. Además de los campos arroceros, en esta cuenca se cultivó: soja, sorgo de grano, sorgo de forraje y raigrass, pero el clomazone solo se aplicó en el cultivo de arroz. Los detalles experimentales se resumen en el **Artículo III**, y los principales resultados en la **figura 29**, que recoge datos de dicho artículo.

Si bien el estudio no incluyó un control del contenido de clomazone en el agua de las parcelas, no se observaron signos preocupantes del impacto del cultivo en los cursos de agua que drenan los campos. El único punto de muestreo con valores que superan el límite máximo de 3 ng/mL, que en este estudio se ha manejado como criterio para aguas superficiales, fue el punto 4, donde en general se observó una tendencia a producir valores por encima del LD, y en dos ocasiones llegó a superar, moderadamente, el límite de 3 ng/mL. Estos podrían estar vinculados a un menor efecto de dilución respecto a otros puntos, y de hecho, el agua de drenaje que pasa por el punto 4, pasa a formar parte de la laguna Bonita, y posiblemente se degrada o diluye en la misma, ya que no se encontraron niveles medibles a la boca de esta laguna (punto 6).



Table 2. Analysis of water samples from the Tala basin

Sampling point	day	Clomazone (ng/mL)	Sampling point	day	Clomazone (ng/mL)
	0	< LOD	0	0	ND
	13	< LOD	13	13	< LOD
	17	< LOD	17	17	< LOD
3	28	< LOD	5	28	< LOD
	37	< LOD		37	1.3 ± 0.1
	48	1.4 ± 0.0		48	1.4 ± 0.1
	55	1.7 ± 0.1		55	1.5 ± 0.2
	0	3.2 ± 0.0		0	< LOD
	13	1.0 ± 0.0	13	< LOD	
	17	1.0 ± 0.0	17	< LOD	
4	28	5.1 ± 0.1	7	28	< LOD
	37	1.7 ± 0.2		37	< LOD
	48	2.3 ± 0.2		48	1.1 ± 0.2
	55	1.2 ± 0.2		55	1.1 ± 0.2

Values represent the average of contiguous samples. ND, non determined. Samples from sampling points 1, 2, and 6 were all <LOD

Figura 29. Puntos de muestreo y niveles de clomazone detectados en la cuenca del arroyo Tala. Las zonas resaltadas en verde corresponden al cultivo de arroz. Solo se muestran los valores de los puntos de muestreo con valores medibles por el método de nanopéptidos, en el caso de los puntos 1, 2 y 6, los valores fueron siempre inferiores al LD (LOD).

Estudios similares en ríos afectados por el drenaje de cultivos de arroz en Río Grande do Sul, Brasil, durante tres años encontraron que el herbicida más frecuentemente encontrado fue clomazone, con concentraciones máximas de 8.8 ng/mL [87]. A su vez, en cuatro ríos en Arkansas, EEUU, entre 2002-2008, del 25% al 42% de las muestras tenían concentraciones superiores a 2.0 ng/mL de clomazone y quinclorac, y la mayoría de estas estaban por debajo de 10 ng/mL. Las concentraciones mayores de clomazone encontradas en el 2007 fueron de 14.0 ng/mL.[88]. Estos datos sugieren que ya sea por una menor área del cultivo, por la capacidad de dilución de la cuenca, o por una menor liberación a la misma, la situación de la cuenca de Tala es comparativamente mejor.

Por otra parte, en el monitoreo de clomazone antes mencionado en ríos drenados por el cultivo en Río Grande do Sul (Brasil) [87], encontraron que la cantidad de herbicida en el río fue dependiente de las precipitaciones. La contaminación de agua de río por herbicidas de arroz sería causada mayoritariamente por el manejo del agua del cultivo usado en los campos.

COMENTARIOS FINALES

Como se ha discutido, una vez instrumentados los inmunoensayos analíticos, estos tienen una serie de propiedades (bajo costo, simpleza, rapidez, bajo requerimiento de pre-tratamiento de

muestra, sensibilidad, análisis paralelo de muestras, que le otorgan un alto potencial como técnica de tamizaje (“screening”) que puede complementar el análisis instrumental. Sin embargo, uno de sus puntos débiles, o más críticos, es el tiempo requerido y la complejidad de su desarrollo. De hecho la producción de inmunoensayos es una actividad multidisciplinaria, que involucra a la inmunología, la biología molecular, y en el caso de analitos pequeños, también tiene un rol destacado la síntesis química de haptenos. Esto último se evidenció en la producción de anticuerpos contra clomazone y quinclorac. Mientras que en el primer caso, varios de los haptenos utilizados resultaron útiles, en el caso del quinclorac, esta etapa actuó como un cuello de botella en el desarrollo del ensayo. Se pudo evidenciar como las modificaciones químicas necesarias para formar conjugados covalentes del hapteno, pueden afectar la reactividad de los anticuerpos generados contra el compuesto blanco original. Todo hace suponer que el bolsillo de unión de haptenos de los anticuerpos generados con haptenos del quinclorac conjugados a través del grupo carboxilo, no son capaces luego de acomodar a la molécula de quinclorac que posee una carga negativa del carboxilato. En línea con lo anterior, el hapteno de quinclorac que mantuvo el grupo carboxilo intacto y se al conjugarse empleando CDI, fue el único que produjo sueros de ratones que mostraban cierta inhibición con el quinclorac libre, aunque no se obtuvieron anticuerpos adecuados. Aparentemente, aunque el CDI es uno de los reactivos de conjugación usados en la producción de conjugados de haptenos, parecería necesitarse un importante proceso de optimización para lograr una alta densidad de derivatización del carrier que de lugar a inmunógenos más potentes.

Otros aspectos interesantes que surgieron en este estudio, refieren al tipo de anticuerpo a utilizar. Empleando el mismo inmunógeno, los sueros anti-clomazone de ratones presentaron mucho menor afinidad por el clomazone que el suero policlonal de conejo. A pesar de esto, se desarrolló un método de "tamizaje por inhibición", que permitió identificar hibridomas secretores de MAb5.6 que derivaban de la subpoblación de células B productoras de anticuerpos con alta afinidad por el clomazone libre. Esto, permitió obtener el MAb5.6, que si bien dió lugar a un ensayo competitivo inferior al del suero policlonal, **tabla 2**, tiene las ventajas de ser un anticuerpo contra un epítipo único, ser estandarizable y poder producirse en cantidades ilimitadas. Por su naturaleza definida, los monoclonales son más adecuados para desarrollar ensayos no competitivos con péptidos anti-IC. Así se pudo desarrollar el ensayo PHAIA, a través de la identificación del péptido pICX11 expresado en fagos que reconocen el inmunocomplejo MAb5.6-clomazone. Interesantemente, como hemos visto en otros ejemplos, usando el mismo anticuerpo (MA5.6 en este caso) el ensayo PHAIA permitió aumentar unas 10 veces la sensibilidad al ensayo convencional competitivo y al dar una señal positiva permitió su adaptación en un formato rápido de visualización directa. También resultó interesante la sensibilidad de haptenos derivados del

herbicida, que permitió demostrar la fina especificidad que puede alcanzarse con el doble reconocimiento del complejo trivalente anticuerpo-clomazone-péptido.

Entre los desarrollos técnicos, un aporte significativo de la tesis, fue la demostración de una aplicación de la tecnología de nanopeptámeros adaptándola al formato recombinante. Si bien, recientemente hemos mostrado que utilizando péptidos sintéticos biotinilados anti IC en combinación con una estreptavidina de alta sensibilidad conjugada a HRP, es posible generar reactivos convencionales (no biológicos) para la inmunodetección no competitiva de pequeñas moléculas [89], la sustitución de estos reactivos comerciales de alto costo por nanopeptámeros recombinantes es un gran avance; sobre todo teniendo en cuenta que se ha ingresado una solicitud de patente en EEUU, y este desarrollo podría facilitar la aplicación comercial de esta tecnología.

Tabla 2. Parámetros que caracterizan a los inmunoensayos competitivos y no competitivos para clomazone aplicados a muestras de aguas superficiales (ng/mL)

Ensayo	IC ₅₀ o SC ₅₀	LD (IC ₂₀ o SC ₁₀)	LD*
Competitivo-policlonal	3.5	1.1	0.45
Competitivo-MAb5.6 ¹	28.0	6.8	1.20
PHAIA-MAb5.6 ²	5.2	1.2	0.30
Nanopeptámero-MAb5.6	2.2	0.5	0.20

* LD definido como la concentración de clomazone que corresponde a un valor de absorbancia igual al valor de cero concentración de analito más cinco desviaciones estándar en los no competitivos, o menos cinco desviaciones estándar en los competitivos.

¹ Valores de la curva en buffer, no se ensayó con muestras reales.

² Valores que surgen de la necesidad de diluir la muestra al 50% con buffer.

A modo de resumen, la **tabla 2** lista los parámetros que caracterizan los distintos ensayos desarrollados a lo largo de este trabajo. Se muestra que por distintos caminos se generaron ensayos de suficiente sensibilidad para permitir el monitoreo de cantidades del herbicida que están por debajo de los límites máximos exigidos para aguas superficiales (3 ng/mL). Como se ha mencionado anteriormente, una vez generados, el costo operativo por análisis es ínfimo se dispone de capacidad para el rápido procesamiento de una importante carga de muestras en paralelo. Esto se esquematiza en la **figura 30** comparando el análisis convencional por HPLC versus el uso de inmunoensayos, que muestra algunas de las características salientes de estos ensayos principalmente en términos de su simplicidad, ausencia de pre-tratamiento y uso y descarte de solventes, y la carga de muestras que es posible analizar.

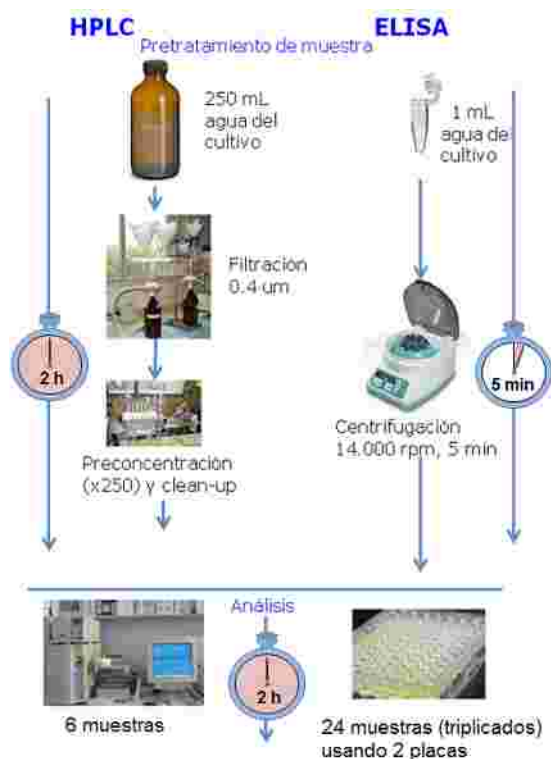


Figura 30. Esquema de las etapas y tiempos involucrados en el análisis convencional por HPLC e inmunoensayos.

Finalmente, con algunos de estos ensayos se hicieron estudios iniciales que permitieron estudiar la dispersión del herbicida en relación a uno de los cultivos más importantes del país. El seguimiento de los cultivos experimentales permitió comenzar a conocer los niveles y la dinámica de disipación del clomazone, y como estos pueden afectarse por las prácticas de riego, del manejo del cultivo, y las condiciones climáticas. Estos datos pueden ser de utilidad para revisar la f de uso de este herbicida, y también como base para diseñar otros estudios o programas de monitoreo. El estudio mostró que con las prácticas de actualmente en uso, al momento de drenaje de los campos los niveles de este herbicida en el agua de inundación están por debajo del límite exigido para aguas superficiales por la CEE. Por otra parte, el quinclorac presentó una disipación bastante más lenta, aunque en el momento del drenaje del cultivo no se encontraron concentraciones preocupantes en agua. También se encontraron altas concentraciones de clomazone en el agua que salía de los cultivos experimentales, así como de la UPAG en episodios de riegos y lluvias previos a la inundación. Por tanto, para reducir el riesgo de contaminación ambiental es importante adoptar medidas para evitar salidas de agua del sistema mientras no está inundado, así como el desborde de chacras inundadas, empleando sistemas de contención de agua adecuados. A pesar de esto, el monitoreo preliminar de clomazone en la cuenca de Tala mostró que no se produjo una liberación significativa del herbicida que afectara este curso de agua. Sería

deseable que la disponibilidad de estos ensayos ayude a promover un monitoreo sustentable de esta producción y sirvan como base para desarrollos futuros.

REFERENCIAS

1. DIEA-Estadísticas Agropecuarias. (2012) Encuesta de Arroz. Zafra 2011/12. Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca. Serie Encuestas N° 275. Disponible en: <http://www.mgap.gub.uy/portal> Acceso: junio 2012.
2. Lattimore MA (1994) Pastures in temperate rice rotations of southeastern Australia. *Aust J Exp Agric* 34: 959-965.
3. (Guía de buenas prácticas en el cultivo de arroz en Uruguay. ACA. (2009)) Disponible en internet en: http://64.76.123.202/SAGPYA/economias_regionales/_arroz/_publicaciones/Guia_BPA_de_Arroz_en_Uruguay.pdf.
4. Saucó S. EG, Heinzen H, Defeo O. (2010) Effects of and freshwater discharge on water chemistry, toxicity and benthos in a Uruguayan sandy beach. *Marine Environmental Research* 70 300-307.
5. Pareja L, Martínez-Bueno, M.J., Cesio, V., Heinzen, H., Fernández-Alba, A.R. (2011) Trace analysis of pesticides in paddy field water by direct injection using liquid chromatography-quadrupole-linear ion trap-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1218: 4790-4798.
6. Pareja L, Colazzo, M, Pérez-Parada, A, Besil, N, Heinzen, H, Böcking, B, Cesio, V, Fernández-Alba, AR. (2012) Occurrence and distribution study of es from pesticides applied under controlled conditions in the field during rice processing. *J Agric Food Chem* 60: 4440-4448.
7. Molina F, Cantou, G., Roel, A. (2009): Biblioteca virtual de INIA. Disponible en: <http://www.inia.org.uy/estaciones/ttres/actividades/Resumen%202008%202009.pdf> Acceso en junio 2012.
8. http://www.agrosoluciones.dupont.com/esp/ficha_tecnica.php?producto=88 citado: agosto 2012.
9. <http://www.laguiasata.com/Clomazone.htm> citado: agosto 2012.
10. Slobodnik J, Louter, A., Vreuls, J., Liska, I., Brinkman, U. A. (1997) Monitoring of organic micropollutants in surface water by automated on-line trace-enrichment liquid and gas chromatographic system with ultraviolet diode-array and mass spectrometric detection. *J Chromatogr* 768: 239-258.
11. Quayle WC, Oliver, D. P., Zrna, S. (2006) Field dissipation and environmental hazard assessment of clomazone, molinate, and thiobencarb in Australian rice culture. *Agric Food Chem* 54: 7213-7220.
12. Li LF, Li, G. X., Yang, R. B., Guo, Z. Y., Liao, X. Y. (2004) Clomazone dissipation, adsorption and translocation in four paddy topsoils. *J Environ Sci (China)* 16: 678-682.
13. Tomco PL, Tjeerdema, R.S. (2012) Photolytic versus microbial degradation of clomazone in a flooded California rice field soil. *Pest Manag Sci* 68: 1141-1147.
14. Environmental Protection Agency USA (1997) Clomazone Summary Document Registration Review.
15. Liu S.Y SM, Rosazza J.P.N. (1996) Microbial Transformations of Clomazone. *J Agric Food Chem* 44 313-319.

16. Albanis TA, Hela, D.G., Sakellarides, T.M., Konstantinou, I.K. (1998) *J Chromatogr A* 823: 59-71.
17. Wintersteiger R, Goger, B., Krautgartner, H. (1999) *J Chromatogr A* 846: 349-357.
18. Barcel D, Hennion, M.C. , editor (1997) Trace determination of pesticide and their degradation products in water.
19. Environmental Protection Agency USA (8 de marzo, 2007) Registration Review Docket. Clomazone. PPDC Registration Review Workgroup Meeting.
20. Vencill WK (2002) *Herbicide Handbook*; America WSSo, editor.
21. Zanella R, Adaime, M., Peixoto, S., do A. Friggi, Prestes, O., Machado, S., Marchesan, E., Avila, L. and Primel, E. (2011) Herbicides Persistence in Rice Paddy Water in Southern Brazil In: Hasaneen MNAE-G, editor. *Herbicides - Mechanisms and Mode of Action*: CC BY 3.0 license.
22. Caldas SSZ, R. & Primel, E.G. (2011) Risk Estimate of Water Contamination and Occurrence of Pesticides in the South of Brazil. *Herbicides and Environment*: Andreas Kortekamp, (Ed.) 471-492,.
23. Li Z, Shao, T., Min, H., Lu, Z., Xu, X. (2009) Stress response of *Burkholderia cepacia* WZ1 exposed to quinclorac and the biodegradation of quinclorac. *Soil Biology and Biochemistry* 41: 984-990.
24. Rohers R, Farias, F.M., Faoro, D. . Bioremediation of herbicides in water with *Enterobacter cloacae* combined with *Pistia stratiotes*.; 2011; Montevideo, Uruguay. ISBN: 978-9974-0-0737-6. pp. 228.
25. Pareja L, Pérez-Parada A., Agüera, A., Cesio, V., Heinzen, H., Fernández-Alba A. (2012) Photolytic and photocatalytic degradation of quinclorac in ultrapure and paddy field water: Identification of transformation products and pathways. *Chemosphere* 87 838-844.
26. Radjenovic J, Sirtori, C., Petrovic, M., Barceló, D., Malato, S. (200) Solar photocatalytic degradation of persistent pharmaceuticals at pilot-scale: kinetics and characterization of major intermediate products. *Appl Catal B* 89: 255-264.
27. Vencill WK, Hatzios, K, K., Wilson, H. P. (1990) Absorption, translocation, and metabolism of 14C-clomazone in soybean (*Glycine max*) and three *Amaranthus* weed species. *Journal of Plant Growth Regulation* 9: 127-132.
28. Taiz L. ZE (1998) *Plant Physiology*, Sinauer Associates: 184.
29. TenBrook PL, Tjeerdema, R. S. (2005) Comparative actions of clomazone on beta-carotene levels and growth in rice (*Oryza sativa*) and watergrasses (*Echinochloa* spp). *Pest Manag Sci* 61: 567-571.
30. Scott JE, Weston, L.A., Chappell, J., Hanley, K. Effects of clomazone on IPP isomerase and prenyl transferase activities in cell suspension cultures and cotyledons of solanaceous species. *Weed Sci* 42: 509-516.
31. Duke SO, Paul, R.N., J.M. Becerril, J.H. Schmidt (1991) Clomazone causes accumulation of sesquiterpenoids in cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *Weed Sci* 39: 339-346.
32. Norman MA, Liebl, R.A., Widholm, J.M. (1990) Site clomazone action in tolerant-soybean and susceptible-cotton photomixotrophic cell suspension cultures. *Plant Physiol* 94: 704-709.
33. Vencill WK, Hatzios, K. K., Wilson, H. P. (1989) Growth and physiological responses of normal, dwarf, and albino corn (*Zea mays* L.) to clomazone treatment. *Pestic Biochem Physiol* 35: 81-88.
34. Sandman G, Boger, P. (1987) Interconversion of prenyl pyrophosphates and subsequent reactions in the presence of FMC 57020. *42*: 803-807.

35. Lange BMC, R. (1999) Isoprenoid biosynthesis via a mevalonate independent pathway in plants: cloning and heterolous expression of 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate reductoisomerase from peppermint. *Arch Biochem Biophys* 365: 170-174.
36. Milborrow BV, Lee, H. S. (1998) Endogenous biosynthesis precursors of (+)-abscissic acid. VI. Carotenoids and ABA are formed by the "nonmevalonate" triose-pyruvate pathway in chloroplasts. *Aust J Plant Physiol* 25: 507-512.
37. Lichtenthaler HK, Schwender, J., Disch, A., Rohmer, M. (1997) Biosynthesis of isoprenoids in higher plant chloroplasts proceeds via a mevalonate independent pathway. *FEBS Lett* 400: 271-274.
38. ElNaggar SF, Creekmore, R.W., Schocken, M.J., Rosen, R.T., Robinson RA (1992) Metabolism of clomazone herbicide in soybean. *J Agric Food Chem* 40: 880-883.
39. Croteau R (1992) Clomazone Does Not Inhibit the Conversion of Isopentenyl Pyrophosphate to Geranyl, Farnesyl, or Geranylgeranyl Pyrophosphate in Vitro. *Plant Physiol* 98: 1515-1517.
40. Mueller C. S. J. SJ, Lichtenthaler HK (2000) Properties and inhibition of the first two enzymes of the non-mevalonate pathway of isoprenoid biosynthesis. *Biochem Soc Trans* 28: 792-793.
41. Ferhatoglu Y, Barrett, M. (2006) Studies of clomazone mode of action. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 85: 7-14.
42. Norman MA, Liebl, R. A. et al. (1990) Uptake and Metabolism of Clomazone in Tolerant-Soybean and Susceptible-Cotton Photomixotrophic Cell Suspension Cultures. *Plant Physiol* 92 3.
43. Weimer MR, Balke, N. E. et al. (1992) Herbicide Clomazone Does Not Inhibit In Vitro Geranylgeranyl Synthesis from Mevalonate. *Plant Physiol* 98: 427-432.
44. Grossmann K (1998) Quinclorac belongs to a new class of highly selective auxin herbicides. *Weed Science* 46: 707-716.
45. Crestani M, Menezes, C., Gluszczak, L., dos Santos Miron D., Spanevello, R., Silveira, A., Goncalves, F. F., Zanella, R., Loro, V.L. (2007) Effect of clomazone herbicide on biochemical and histological aspects of silver catfish (*Rhamdia quelen*) and recovery pattern. *Chemosphere* 67: 2305-2311.
46. dos Santos Miron D, Crestani, et al. (2005) Effects of the herbicides clomazone, quinclorac, and metsulfuron methyl on acetylcholinesterase activity in the silver catfish (*Rhamdia quelen*) (Heptapteridae). *Ecotoxicol Environ Saf* 61: 398-403.
47. dos Santos Miron D, Crestani M, Rosa Shettinger M, Maria Morsch V, Baldisserotto B, et al. (2005) Effects of the herbicides clomazone, quinclorac, and metsulfuron methyl on acetylcholinesterase activity in the silver catfish (*Rhamdia quelen*) (Heptapteridae). *Ecotoxicol Environ Saf* 61: 398-403.
48. Dutta HM, Arends DA (2003) Effects of endosulfan on brain acetylcholinesterase activity in juvenile bluegill sunfish. *Environ Res* 91: 157-162.
49. Crestani M, Menezes C, Gluszczak L, dos Santos Miron D, Spanevello R, et al. (2007) Effect of clomazone herbicide on biochemical and histological aspects of silver catfish (*Rhamdia quelen*) and recovery pattern. *Chemosphere* 67: 2305-2311.
50. dos Santos Miron D, Pretto A, Crestani M, Gluszczak L, Schettinger MR, et al. (2008) Biochemical effects of clomazone herbicide on piava (*Leporinus obtusidens*). *Chemosphere* 74: 1-5.
51. Resgalla Jr C, Noldin, J., Tamanaha, M., Deschamps, F., Eberhardt, D., Rorig, L. (2007) Risk analysis of herbicide quinclorac residues in irrigated rice areas, Santa Catarina, Brazil. *Ecotoxicology* 16: 565-571.
52. Howard GC, Kaser, M. R., editor (2007) Making and using monoclonal antibodies. A practical handbook. New York: CRC Press. Taylor and Francis group.

53. Debnath M, et al. (2010). *Molecular Diagnostics: Promises and Possibilities*: Springer Science+Business Media B.V. .
54. Pedersen MK, Sorensen, N.S., Heegaard, P.M., Beyer, N.H., Bruun, L. (2006) Effect of different hapten-carrier conjugation ratios and molecular orientations antibody affinity against a peptide antigen. *J Immunol Methods* 311: 198-206.
55. Nunes G, Toscano A, Barceló D (1998) Analysis of pesticides in food and environmental samples by enzyme-linked immunorbent assays. *Trends Anal Chem* 17: 79-87.
56. Ballesteros B, Barcelo D, Sanchez-Baeza F, Camps F, Marco MP (1998) Influence of the hapten design on the development of a competitive ELISA for the determination of the antifouling agent Irgarol 1051 at trace levels. *Anal Chem* 70: 4004-4014.
57. Hermanson G (1996) Preparation of Hapten-Carrier Immunogen Conjugates. In: Hermanson G, editor. *Bioconjugate techniques* New York: Academic Press. pp. 419-454.
58. Singh KV, Kaur, Jasdeep, Varshney, Grish C., Raje, Manoj, Suri, C. Raman (2004) Synthesis and Characterization of Hapten-Protein Conjugates for Antibody Production against Small Molecules. *Bioconjugate Chem* 15: 168-173.
59. Self CH, Dessi JL, Winger LA (1994) High-performance assays of small molecules: enhanced sensitivity, rapidity, and convenience demonstrated with a noncompetitive immunometric anti-immune complex assay system for digoxin. *Clin Chem* 40: 2035-2041.
60. Ullman EF, Milburn G, Jelesko J, Radika K, Pirio M, et al. (1993) Anti-immune complex antibodies enhance affinity and specificity of primary antibodies. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90: 1184-1189.
61. Nagata S, Tsutsumi T, Yoshida F, Ueno Y (1999) A new type sandwich immunoassay for microcystin: production of monoclonal antibodies specific to the immune complex formed by microcystin and an anti-microcystin monoclonal antibody. *Nat Toxins* 7: 49-55.
62. Gonzalez-Techera A, Vanrell L, Last JA, Hammock BD, Gonzalez-Sapienza G (2007) Phage anti-immune complex assay: general strategy for noncompetitive immunodetection of small molecules. *Anal Chem* 79: 7799-7806.
63. Gonzalez-Techera A, Kim HJ, Gee SJ, Last JA, Hammock BD, et al. (2007) Polyclonal antibody-based noncompetitive immunoassay for small analytes developed with short peptide loops isolated from phage libraries. *Anal Chem* 79: 9191-9196.
64. Smith GP (1985) Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. *Science* 228: 1315-1317.
65. Kim HJ, McCoy M, Gee SJ, Gonzalez-Sapienza GG, Hammock BD (2011) Noncompetitive phage anti-immunocomplex real-time polymerase chain reaction for sensitive detection of small molecules. *Anal Chem* 83: 246-253.
66. Kim HJ, Gonzalez-Techera A, Gonzalez-Sapienza GG, Ahn KC, Gee SJ, et al. (2008) Phage-borne peptidomimetics accelerate the development of polyclonal antibody-based heterologous immunoassays for the detection of pesticide metabolites. *Environ Sci Technol* 42: 2047-2053.
67. Inaba JN, S.; Shimizu, K.; Asami, T.; Suzuki, Y. (2009) *Anal Biochem* 388: 63-70.
68. Tanaka F, Hu Y, Sutton J, Asawapornmongkol L, Fuller R, et al. (2008) Selection of phage-displayed peptides that bind to a particular ligand-bound antibody. *Bioorg Med Chem* 16: 5926-5931.
69. Sellergren B, Andersson, L. (1990) Molecular recognition in macroporous polymers prepared by a substrate-analogue imprinting strategy. *Journal of organic Chemistry* 55: 3381-3383.
70. Varnavas A, Lassiani, L., Valenta, V., Mennuni, L., Makovec, F., Hadjipavlou-Litina, D. (2005) Anthranilic acid based CCK1 receptor antagonists: preliminary investigation on their second "touch point". *European Journal of Medical Chemistry* 40: 563-581.

71. Langone J, Van Vunakis, H. Res. Commun. (1975) Radioimmunoassay for dieldrin and Chem Pathol Pharmacol 10: 163-171.
72. Xiao H, Clarke, J. R., Marqijardt, R. R. & Frohlich, A. A. (1995) Improved methods for conjugating selected mycotoxins to carrier proteins and dextran for immunoassays. Journal of Agricultural and Food Chemistry 43.
73. Gonzalez G, Orn A, Cazzulo JJ, Gronvik KO (1994) Production and characterization of monoclonal antibodies against the major cysteine protease of *Trypanosoma cruzi*. Scand J Immunol 40: 389-394. Food Chem 54: 7213-7220.
75. Koppatschek FKL, R. A., Alan L. Kriz, A. L. and Melhados, L. L. (1990) Development of an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for the Detection of the Herbicide Clomazone. J Agric Food Chem 38: 1519-1522.
76. Koppatschek FL, R.; Alan, L.; Kriz, A.; Melhado, L. (1990) Development of an enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of the herbicide clomazone. J Agric Food Chem 38 1519-1522.
77. González-Techera A U-FM, Cardozo S, Obal G, Pritsch O, Last JA, Gee SJ, Hammock BD, González-Sapienza G. (2008) High-throughput method for ranking the affinity of peptide ligands selected from phage display libraries. Bioconjug Chem 19: 993-1000.
78. Vanrell L, Gonzalez-Techera A, Hammock BD, Gonzalez-Sapienza G (2013) Nanopeptamers for the development of small-analyte lateral flow tests with a positive readout. Anal Chem 85: 1177-1182.
79. Geoffrey Wild D (2013) The Immunoassay Handbook : Principles and Applications of Ligand Binding, ELISA and Related Techniques. 4th ed ed. Oxford: Elsevier Science.
80. Sano T, Cantor, C. R. (1990) Expression of a cloned streptavidin gene in *Escherichia coli*. Proc Natl Acad Sci USA 87: 142-146.
81. Kipriyanov SM, Little, M., Kropshofer, H., Breitling, F., Gotter, S., and Dubel, S. (1996) Affinity enhancement of a recombinant antibody: formation of complexes with multiple valency by a single-chain Fv fragment-core streptavidin fusion. Protein Eng 9: 203-211.
82. Schultz J, Lin, Y., Sanderson, J., et al. (2000) A tetravalent single-chain antibody-streptavidin fusion protein for pretargeted lymphoma therapy. Cancer Res 60: 6663-6669.
83. Sorensen HP, Sperling-Petersen, H. U., and Mortensen, K. K. (2003) Dialysis systems for protein refolding: preparative streptavidin production. Protein Expr Purif 31: 149-154.
84. Santos FM, Marchesan, E., Machado, S.L.O., Avila, L.A., Zanella, R., & Gonçalves, F.F. (2008) Persistência dos herbicidas imazethapyr e clomazone em lâmina de água do arroz irrigado. Planta Daninha 26: 875-881.
85. Mattos MA, A; dos Santos, I. (2005) Disipação do herbicida clomazone em solo, água e sedimentos de lavoura de arroz irrigado, no Rio Grande do Sul. In: II. AV, editor. IV Congresso de arroz irrigado XXVI Reuniao da Cultura de Arroz Irrigado.
86. Vencill WK (2002) Herbicide Handbook, 8th ed.; Weed Science Society of America, editor. ISBN 1891276336, Lawrence, KS.
87. Marchesan ERZ, L.A.; De Avila, L.A.; Camargo, E.R.; De Olivera Machado, S.L.; Macedo, V. R., et al. (2007) Rice herbicide monitoring in two Brazilian states during rice growing season. Scientia Agricola 64: 131-137.
88. Mattice JDS, B.W.; Norman, R.J.; Gbur, E.E. (2010) Analysis of river water for rice pesticides in eastern Arkansas from 2002 to 2008. Journal of Soil and Water Conservation 65: 130-140.
89. Vanrell L, Gonzalez-Techera, A., Hammock, B.D. and Gonzalez-Sapienza, G. (2013) Nanopeptamers for the development of small-analyte lateral flow tests with a positive readout. Anal Chem 85: 1177-1182.