

3.1-INTRODUCCIÓN

3.1.1-*Características moleculares*

El ciclopentanoperhidrofenantreno (también llamado esterano o gonano) es un hidrocarburo policíclico que se puede considerar un producto de la saturación del fenantreno. Su esqueleto carbonado contiene 17 átomos de carbono, formando cuatro anillos condensados, tres de 6 átomos y uno de 5, tal como se muestra en la Figura 3.1.1.1-a.

Las sustancias derivadas de este núcleo muestran grupos metilo $-CH_3$, en las posiciones 10 y 13 para integrar los carbonos 18 y 19; generalmente existe una cadena lateral en el carbono 17, la longitud de dicha cadena y la presencia de metilos en el carbono 10 y 13 determina las diferentes estructuras de estas sustancias (Morrison y Boyd, 1998). Los principales grupos de sustitución de este esqueleto, están representados por distintas cadenas carbonadas, grupos $-OH$ y grupos ceto, también pueden aparecer insaturaciones (Campbell 2004), siendo la más común la C_4-C_5 (Figura 3.1.1.1-b) o la aromaticidad completa del anillo. Este esqueleto de esterano está presente en diversos compuestos de interés biológico como puede ser colesterol, ácidos y sales biliares, terpenos y hormonas esteroides (Baynes y Dominiczak, 2007)

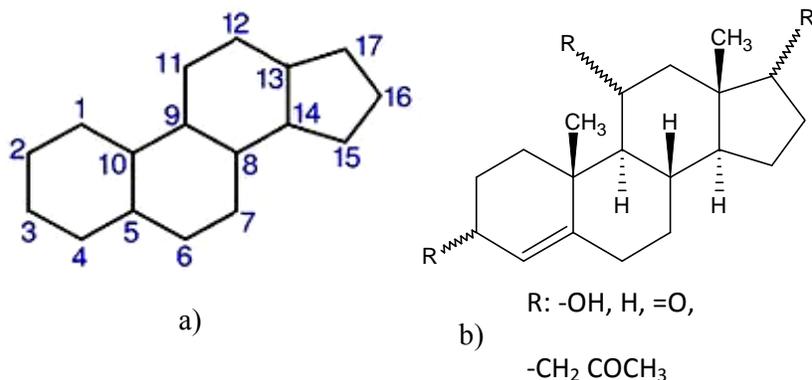


Figura 3.1.1.1: esquema de una molécula de a) esterano, con la numeración de los átomos de carbono según IUPAC y b) una molécula de esterano con posibles sustituciones, el esqueleto base, donde todos los $-R$ son H , corresponde al esqueleto de la molécula de androstano y sus posibles sustituciones.

Esta sustitución sistemática de la estructura del esterano, conlleva al cambio de las propiedades fisicoquímicas como una consecuencia directa de estos grupos funcionales, tanto desde el punto de vista estérico como electrónico (Zhu et al., 2006). En la literatura se publican distintos estudios orientados al modelado estructural de estas moléculas por métodos derivados de la fisicoquímica computacional (como se reportara en el Capítulo I, en los ítems 1.6 y 1.7), *Ab initio* (Kubli-Garfias, 1998) y semiempíricos (Kubli-Garfias et al., 1996a, 1996b). En los mismos se calculan las energías de los distintos conformeros, su relación con

las distintas distribuciones espaciales y sus posibles incidencias en las estereo selectividades biológicas (Zhu et al., 2006).

3.1.2-Hormonas esteroideas. Características y biosíntesis.

Las hormonas son sustancias orgánicas producidas por las glándulas y tejidos endocrinos que, por lo general, pasan al torrente sanguíneo y ejercen su acción en otros tejidos distantes del lugar de secreción. Las hormonas son auténticos "mensajeros químicos" (Berridge, 1985; Crapo, 1985).

En las últimas décadas, la consideración de hormona como "mensajero químico" de acción distante ha rebasado su concepto clásico, de forma que también se consideran hormonas otras de acción sobre células o tejidos vecinas (paracrinia), incluso sobre la propia célula o tejido productor (autocrinia), sobre glándulas exócrinas (exocrinia) o sobre organismos ajenos a través del medio ambiente (ferocrinia) (García-Sainz, 1996).

Las hormonas pueden dividirse en peptídicas o lipídicas. Las primeras no pueden atravesar la membrana plasmática, por lo que estos receptores se ubican en la superficie de la célula (a excepción de las tiroideas), mientras que las lipídicas, dado su carácter lipófilo, atraviesan sin problemas la bicapa lipídica de las membranas celulares y sus receptores específicos se hallan en el interior de la célula diana, a este tipo se las denomina esteroideas (Bullock et al., 2001). Todas las hormonas esteroideas tienen una estructura básica similar, la molécula del estrano. Se dividen en tres grupos principales, según el número de átomos de carbono que poseen (Esplugues, 1978):

- La serie de 21 carbonos incluye los corticoides y progestágenos y su núcleo es el ***pregnano***.
- La serie de 19 carbonos incluye los andrógenos y su núcleo es el ***androstano***.
- Los de 18 carbonos son los estrógenos y su núcleo es el ***estrano***.

Los seres vivos producen diversas hormonas esteroideas, donde algunas de ellas sólo difieren en un doble enlace o la orientación espacial de un grupo -OH. El colesterol es un precursor necesario de todas las HE, donde por la acción sucesiva de diversas enzimas, se van sintetizando todas las hormonas esteroideas, (C21, C19 y C18 por ejemplo, cortisol, testosterona y estrógenos respectivamente), con sus grupos químicos específicos. En estos casos, la síntesis y liberación de hormonas se controla a través de los genes codificantes para las enzimas que intervienen en la biosíntesis (Morgan y Morgan, 1997), un ejemplo biosintético es presentado en la figura (3.1.2.1).

Son de especial interés para este trabajo las hormonas esteroideas andrógenas, relevantes en el estudio de peces, derivadas de la testosterona y androstenodiona, por la sustitución de un hidrógeno del C₁₁ por oxidrilo y la oxidación del mismo a grupo ceto a partir de las respectivas estructuras moleculares.

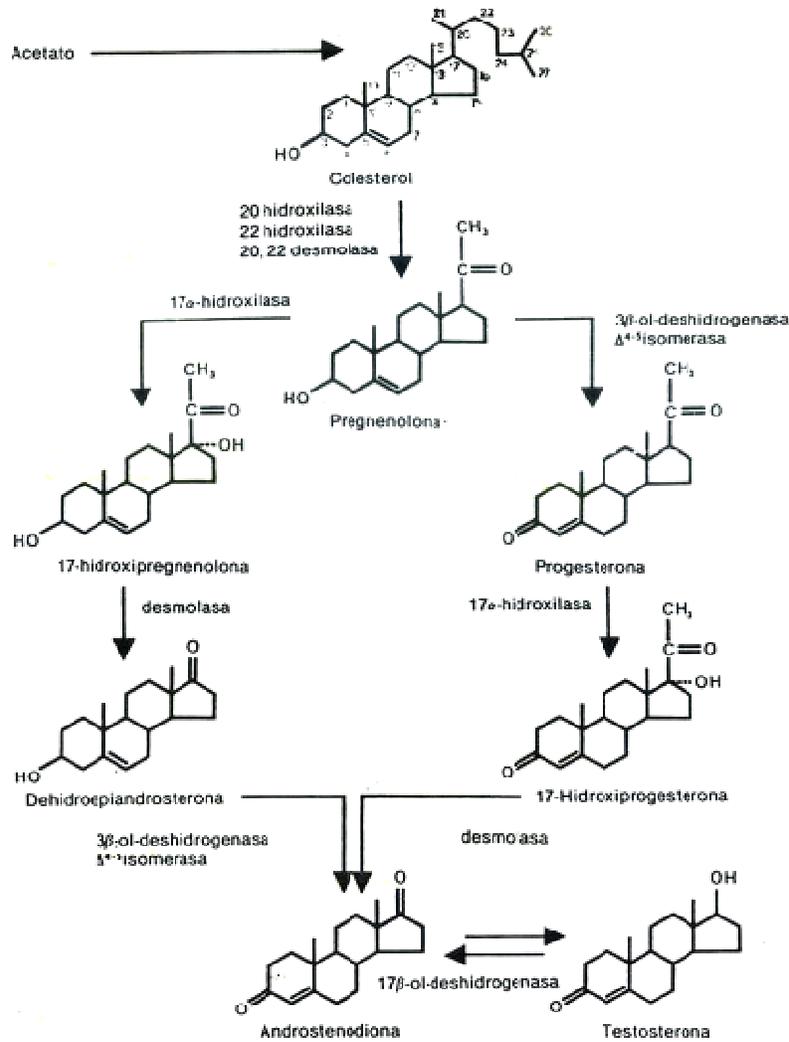


Figura 3.1.2.1: ejemplo biosintético, a partir del colesterol, para testosterona y androstenodiona (Baynes y Dominiczak, 2007).

3.1.3-Presencia de andrógenos en peces. Aplicaciones

Las Hormonas Esteroides (HE) se almacenan en cantidades muy limitadas en sus sitios de producción (gónadas y tejidos internos) y se sintetizan según sea necesario. Los esteroides gonadales, andrógenos y estrógenos tienen una variedad de funciones de reproducción como la inducción de la producción de vitelogenina en el hígado, el desarrollo de los caracteres sexuales secundarios y el inicio de una serie de cambios de comportamiento relacionados con las actividades de desove (Jobling, 1995).

En peces *teleostei*, los andrógenos Δ^4 -11-oxigenados, son considerados los esteroides andrógenos prevalentes (Borg, 1994; Lokman et al., 2002), situación que no se da en los

mamíferos (Kime, 1993; Wilson et al., 2002). Éstos compuestos derivan de la testosterona (T) y la androstenodiona (A_4), por acción de las enzimas 11- β -hidroxilasa (CYP11B) y 11- β -hidroxisteroide dehidrogenasa (11- β -HSD). Ello da como resultado la inserción de un grupo –OH en el C_{11} y su siguiente oxidación a grupo ceto (Liu et al., 2000; Socorro et al., 2007; Wang y Orban, 2007) (Figura 3.1.3.1). Es importante destacar que estos precursores, T y A_4 , son también los sustratos para la síntesis de estrógenos por acción de aromatasas (CYP19), que resulta ser una enzima clave en el balance andrógeno/estrógeno (Nebert y Gonzalez, 1987; Simpson et al., 1994; Simpson et al., 2002)

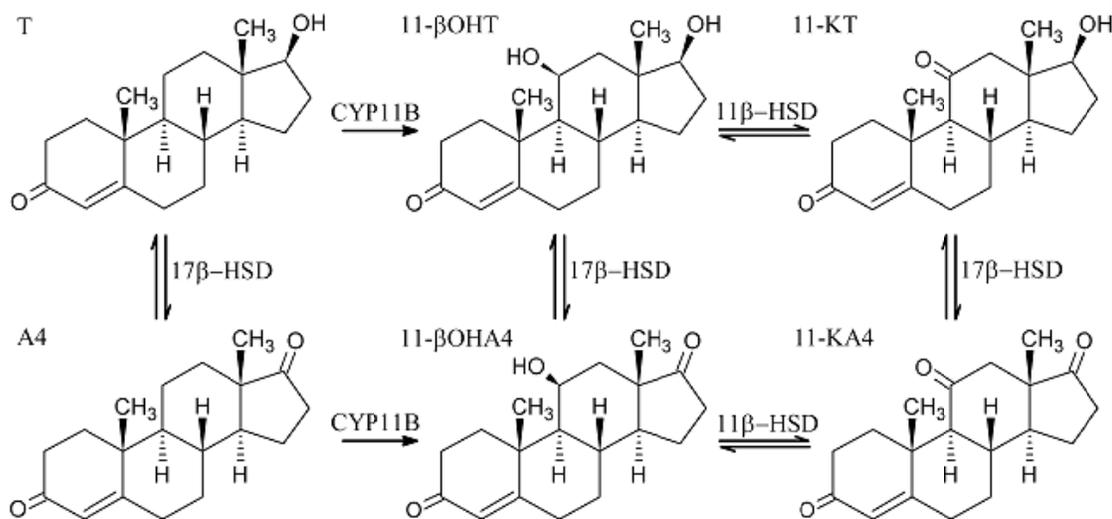


Figura 3.1.3.1: Esquema de moléculas derivadas de la acción enzimática sobre la testosterona y la androstenodiona. T=testosterona, A_4 =androstenodiona, 11- β OHT= 11-beta hidroxitestosterona, 11-KT= 11-cetotestosterona, 11-KA $_4$ = 11-cetoandrostenodiona, 11- β OHA $_4$ = 11-betahidroxiandrostenodiona.

De todo el grupo de andrógenos presentados, además de la testosterona y la androstenodiona, la 11-cetotestosterona es considerada la molécula más relevante en los peces teleósteos (Borg, 1994). La 11-KT fue encontrada por primera vez en el plasma del género masculino de salmón Sockeye, *Oncorhynchus nerka* (Idler et al., 1960), se encuentran en niveles más elevados en el plasma de machos que en hembras, mientras que este no es el caso de la T. Los esteroides andrógenos 11-oxigenados son generalmente más eficaces que la T para estimular el desarrollo de caracteres sexuales secundarios en machos: el comportamiento reproductivo y la espermatogénesis (Schultz y Miura, 2002).

Distintos estudios se han focalizado en relacionar la concentración de 11-KT con los ciclos reproductivos de distintas especies de peces (Kindler et al., 1989; Cardwell y Liley, 1991; Gazola y Borella, 1997; Kobayashi y Nakanishi, 1999; Matsubara et al., 2003; Frisch et al., 2007). Así mismo otros andrógenos 11-oxigenados han sido estudiados en numerosas especies de peces como la 11- β OHA $_4$ (Tanaka et al., 1992; Liu et al., 2000; Wilson et al.,

2001; Kusakabe et al., 2006; Socorro et al., 2007). A partir del conocimiento de estos mecanismos endógenos de regulación pueden diseñarse estrategias de control reproductivo con distintos objetivos. Por ejemplo, la dosificación intencional de algunos andrógenos se realiza para regular los ciclos reproductivos de cría artificial con fines económicos (modificar la espermatogénesis, a través de la concentración de T y 11-KT) (Borg, 1994; Blanco Chafiero, 1995). Otro uso importante es que, a partir del conocimiento de los biociclos reproductivos, caracterizados por los distintos niveles hormonales, se pueden regular los períodos de veda pesquera, para un mejor manejo de los recursos (Blanco Chafiero, 1995).

Desde el punto de vista ambiental, los peces fueron los primeros vertebrados en desarrollar una respuesta al estrés (Engelsma et al., 2002; Flik, et al., 2006). La evidencia de que los peces responden a esteroides que no son activos en mamíferos implica que no tienen la misma respuesta a xenobióticos (Baker, 2001a, 2001b). Por ejemplo una sustancia química puede afectar a más de un receptor hormonal y/o enzima en peces, lo cual tendrá múltiples efectos sobre su sistema endócrino, tal es el caso de carbenoxolone, donde en mamíferos, produce actividad glucocorticoide y mineralcorticoide debido a la inhibición de la enzima 11- β HSD, mientras que en peces la inhibición de esta enzima baja la concentración de 11-KT y por lo tanto aparece como anti-andrógeno (Baker y Fanestil, 1991; Monder, 1991; Baker, 2001b; Edwards et al., 1996).

El medio acuático en el que habitan los peces aumenta su exposición a los xenobióticos comparado con animales terrestres, estas diferencias de hábitats hace necesario ser cuidadoso al momento de extrapolar resultados sobre efectos de xenobióticos entre animales (Baker, 2001a). Es indispensable, en función de los antecedentes citados, disponer de herramientas para la medición de las hormonas esteroides en distintos tipos de matrices y especialmente en los tejidos y fluidos biológicos.

3.1.4- Métodos de cuantificación de Hormonas Esteroides.

Las hormonas esteroideas, generalmente son cuantificadas por el método de ensayo radio-inmune, denominado “radio-inmuno-ensayo” (del inglés Radio inmuno assay, RIA) o el ensayo inmuno-enzimático (del Inglés Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, ELISA).

3.1.4.1- Método de RIA.

El RIA es un método radio-inmuno-métrico que se basa en la formación específica de los complejos Antígeno-Anticuerpo (Ag-Ac) lo que le dota de una gran especificidad sumado a la sensibilidad de los métodos radiológicos (Yalow y Berson, 1960). Casi todas las moléculas pueden ser antigénicas y esto se usa para que los anticuerpos puedan unirse a esa molécula y así marcarla radiactivamente (García-Segura, 2002). Utilizando anticuerpos de gran afinidad se pueden detectar hasta picogramos de antígeno ($1 \text{ pg} = 10^{-12} \text{ g}$).

El fundamento se puede resumir en una serie de pasos (Figura 1.1.4.1) (Moss et al., 1982):

- Se mezcla una cantidad constante de **antígeno marcado radioactivamente** y una cantidad constante de **un anticuerpo** para ese antígeno
- Se produce la **reacción entre antígeno (Ag) y anticuerpo (Ac)**
- **se separa la fracción de antígeno que se ha unido** de la que permanece libre
- **se determina la radioactividad**
- Si la muestra contiene además antígeno frío (no marcado), éste competirá con el marcado para unirse al anticuerpo, y se observará un descenso en la medida de la radioactividad
- Este descenso es proporcional a la concentración de antígeno frío en la muestra.

Este método, para el caso de las HE presenta la desventaja de posibles interferencias cruzadas, ya que en las matrices biológicas son complejas, aún luego de procesos sucesivos de extracción y purificación. Lokman et al. (2002), resumen las distintas interferencias cruzadas, las que se muestran en la Tabla 3.1.4.1.1, donde puede observarse que el grado de especificidad de los anticuerpos no es absoluto.

Tabla 3.1.4.1.1: Reactividad cruzada (%) del antígeno androgénico (AS) usado para el radio-inmuno-ensayo. Los valores reflejan la reactividad cruzada del esteroide competidor al 50% del desplazamiento del nivel en el radio-inmuno-ensayo. (Publicada por Lokman et al., 2002)

Esteroides	A _{4AS}	11-β- A _{AS}	11-β- T _{AS}	11-KT _{AS}	T _{AS}
Cort	N.D.	N.D.	<0,1 (3,6)	<0,1	N.D.
A ₄	100	[3,2]	N.D.	N.D.	2,2
11-βOHA ₄	N.D.	100	(41,4)	<0,1	N.D.
11β-OHT	N.D.	[4,0]	100	2,8	N.D.
11-KA ₄	4,0	[4,1]	<0,1 (31,8)	0,3	N.D.
11-KT	N.D.	[0,4]	4,6 (41,2)	100	2,0
T	2,0	[0,4]	1,4 (20,7)	1,7	100
E2	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	<0,1

N.D.: No hay datos, Cort: cortisól

(), reducción en la unión causada por 100 pg del esteroide competidor comparado con 100 pg del homólogo.

[], valor porcentual como medida de la competencia en experimentos con un exceso molar del esteroide competidor.

3.1.4.2- Método de ELISA.

La técnica ELISA se basa en la detección de un antígeno inmovilizado sobre una fase sólida mediante anticuerpos, que directa o indirectamente producen una reacción cuyo producto puede ser medido espectrofotométricamente, existen distintas variantes metodológicas: método indirecto, método sandwich, método competitivo y el más nuevo es el método de mecanismo inverso (Van Venrooij et al., 1993; Van Oss y Van Regenmortel, 1994; Lequin, 2005). Por ejemplo la técnica de sandwich puede resumirse en los siguientes pasos (Figura 1.1.4.2):

- Los tubos se rellenan con el antígeno en solución, que se ensayaron. Cualquier molécula de antígeno presentes se unen a las moléculas de anticuerpos inmovilizados.
- El conjugado enzima-anticuerpo se añade a la mezcla de reacción. Parte del anticuerpo conjugado se une a moléculas de cualquier antígeno que estaban vinculados con anterioridad, ocurre la creación de un anticuerpo-antígeno-anticuerpo tipo "sandwich".
- Después de lavar los complejos conjugados no unidos, se añade la solución del sustrato.
- Transcurrido un cierto tiempo la reacción se detiene (por ejemplo, mediante la adición de NaOH 1 N) y la concentración de los productos coloreados formados se miden espectrofotométricamente, donde la intensidad de color es proporcional a la concentración de antígeno unido.

Esta técnica tiene la ventaja de manejar simultáneamente un importante número de muestras, con buena sensibilidad analítica y evitar el manejo de sustancias radioactivas, aunque existen interferencias de adsorciones inespecíficas de algunas proteínas y/o lípidos durante la incubación de la muestra (Ciusset et al., 1995).

3.1.4.3-Método aplicado en peces.

A pesar de la radioactividad, el RIA se ha convertido en una importante herramienta en el laboratorio donde se utiliza para el ensayo corriente. Para el caso de las hormonas esteroides, contenidas en fluidos biológicos de peces, el método de RIA es uno de los preferidos (Idler, 1979; Roseblum et al., 1985; Wade y Van Der Kraak, 1991; Gazola y Borella, 1997; Lokman et al., 2002; Matsubara et al., 2003). Una secuencia metodológica posible involucra los siguientes pasos (Blasco et al., 2007):

1ro. Extracción con 2 contactos de 5 volúmenes de éter etílico.

2do. RIA (Figura 3.1.4.1): Se incuba por 16 h a 4 °C una mezcla conteniendo, el anticuerpo específico para el esteroide en una dilución dada (en PBS-gelatina), una cantidad fija de el esteroide radiactivo (generalmente se utilizan esteroides trititados) en PBS y un volumen determinado de muestra (extracto etéreo seco resuspendido en PBS-Gelatina)

- Luego se trata la mezcla con un volumen de carbono activado recubierto con dextrano (carbon-dextran) por 15 minutos en hielo y se centrifuga 20 min a 3000-5000 rpm. El sobrenadante se pasa a viales de centelleo conteniendo solución centelleadora con tritón.
- Para realizar la curva estándar se procede reemplazando la muestra por la misma cantidad de diluciones del esteroide no radiactivo de modo que estas diluciones abarquen el rango esperado para las muestras (y dentro de los límites de cuantificación de la técnica 0,01ng/mL en general).

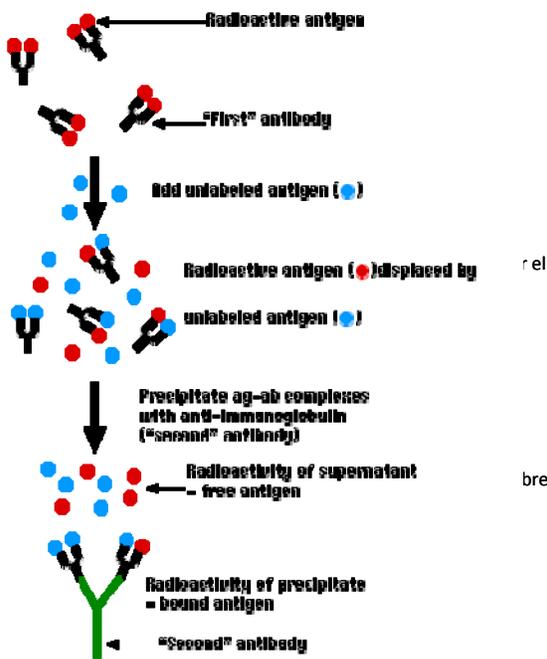


Figura 3.1.4.1: esquema general para una secuencia de pasos del método RIA

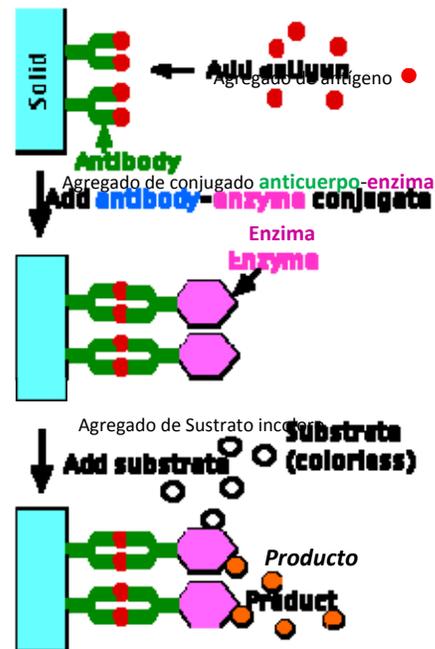


Figura 3.1.4.2: esquema general para una secuencia de pasos del método RIA

3.1.5- Herramientas de la química analítica aplicadas a las ciencias biológicas.

Cuando se miden diferentes esteroides, al mismo tiempo, los métodos descriptos presentan distintas desventajas, que pueden resumirse en:

- i) el tamaño de la muestra suele ser un factor limitante
- ii) existe la necesidad de una separación previa de los distintos esteroides
- iii) los anticuerpos contra esteroides son difíciles de obtener debido a la reactividad cruzada con otros esteroides y
- iv) los trazadores radiactivos normalmente utilizados son difíciles de obtener porque no están comercialmente disponibles.

Todos estos puntos son especialmente importantes cuando se miden andrógenos haciendo hincapié en la necesidad de alternativas y métodos de cuantificación simultánea de esteroides.

Una herramienta que cumple con la condición de cuantificación simultánea son las distintas técnicas cromatográficas, acopladas a diversas opciones de detección (De Brabander et al., 2009). En la literatura se reporta el uso de técnicas cromatográficas líquidas (HPLC), a escala preparativa, para la separación previa de esteroides para luego ser cuantificados por métodos tipo RIA (Roseblum et al., 1985; Ciusset et al., 1994; Lokman et al., 2002).

Tal como se describiera en el ítem 1.5 del Capítulo I (particularmente los 1.5.2 y 1.5.2.1), las técnicas cromatográficas líquidas HPLC, acopladas a un espectrómetro de masas cumplen con ambas condiciones, la separación y la detección, logrando niveles de sensibilidad en el modo de trabajo de Monitoreo de Ion Selectivo (Single Ion Monitoring, SIM) del orden de los picogramos en la inyección (McIntyre, 1998). En este sentido han sido publicados trabajos aplicando técnicas cromatográficas, acopladas a espectrometría de masas, para la medición de residuos de esteroides en distintos alimentos (Impens et al., 2002; Noppe et al., 2008), como una alternativa a los métodos tipo RIA o ELISA.

En la literatura se registran técnicas aplicadas a la medición de testosterona por HPLC-UV (Ng y Yuen, 2003) y HPLC-MS, en distintos fluidos biológicos de humanos (Niwa et al., 2005; Hauser et al., 2008), no así a la determinación simultánea de esteroides andrógenos, presentes en los peces, para ser utilizados como una herramienta rápida de cuantificación y su potencial uso como sistema indirecto para el monitoreo de exposición a contaminantes por parte de estos organismos, ya que se podrían medir simultáneamente un conjunto de moléculas, con un pre-tratamiento mínimo de las muestras y alcanzando niveles de detección y cuantificación similares a técnicas tan complejas como las RIA y ELISA.

3.1.6-Objetivos e Hipótesis de trabajo.

Para el desarrollo de este tipo de metodologías se plantean los siguientes objetivos:

- a) Desarrollar una técnica de separación y detección de esteroides andrógenos en distintos fluidos biológicos de peces por HPLC detección masa.
- b) Estudiar la influencia de distintos factores separativos sobre la formación de iones en el espectrómetro de masas tanto en tipo como en intensidad observada de cada uno.
- c) Aplicar las metodologías desarrolladas para su estudio en peces, comparar los resultados obtenidos con otras técnicas experimentales convencionales
- d) Estudiar computacionalmente las distintas estructuras moleculares de esteroides por mecánica y dinámica molecular para identificar energías mínimas de cada especie química y relacionar distintas propiedades fisicoquímicas de las moléculas con las distribuciones de iones formados en el espectrómetro de masas.

Los mismos serán logrados con el soporte de las siguientes hipótesis:

- *Los esteroides derivados de la ruta de la testosterona y androstenodiona, en peces, pueden cuantificarse por HPLC-detección masa con un mínimo pretratamiento de las muestras. Las respuestas instrumentales guardan una estrecha relación con las características estructurales de estas moléculas.*
- *La aplicación de HPLC-detección masa en muestras de peces del ambiente permite evaluar, según el perfil de esteroides presentes, posibles rutas de síntesis metabólicas y alteraciones de las mismas por exposición a contaminantes ambientales, en forma rápida, simple y precisa.*

3.2-METODOLOGÍA

3.2.1-Caracterización espectrométrica de los esteroides. Cuantificación.

3.2.1.1-Reactivos empleados en el trabajo.

Se utilizaron reactivos de origen comercial, de calidad y marca que se detallan:

- Acetonitrilo (ACN), grado HPLC, marca J.T.Beaker (New Jersey, EEUU).
- Agua grado HPLC (Academic MilliQ® water purification system Millipore, Bedford, MA, USA),
- Metanol (MeOH), grado HPLC, marca J.T.Beaker (New Jersey, EEUU).
- Ácido Fórmico (HCOOH), para análisis Merck (Merck KGaA, Darmstadt, Germany)
- Ácido acético (HAc), para análisis, J.T.Beaker (New Jersey, EEUU)
- Los esteroides: 4-androsteno 17-beta-ol 3-ona (testosterona, T), 4-androsteno 3,17-diona (androstenediona, A₄), 4-androsteno 11-beta-ol 3,17-diona (11-beta-hidroxi androstenediona, 11β-OHA₄), 4 androsteno 17-beta-ol 3, 11-diona (11-cetotestosteron, 11-KT), 4-androsteno-3, 11, 17-triona (11-cetoandrostenediona, 11-KA₄), 4 androsteno-11, 17-diol 3-ona (11-beta-hidroxitestosterona, 11-βOHT), fueron adquiridos de Steraloids (Newport, Rhode Island, USA).

3.2.1.2-Equipamiento.

Independientemente de las condiciones separativas, que se presentaran en cada caso, los estudios fueron realizados con una columna separativa de C₁₈ modificada, marca GEMINI® de Phenomenex (Torrance, California, USA), de 15 cm de longitud, de 4,6 mm de diámetro interno y 3 μm de tamaño de partícula, el sistema separativo esta constituido por un sistema de bombas binarias marca Agilent y mezclador, modelo 1100 (Agilent Technologies Inc, USA) acoplado a un detector de masas de cuadrupolo simple MSD-VL, equipado con fuentes de ionización intercambiables de Electro spray (ESI) y de Ionización química a Presión Atmosférica (APCI) (Agilent Technologies, USA) y un generador de Nitrógeno que produce la nebulización de las muestras (Agilent nitrogen generator, Agilent Technologies, USA). Las muestras se ingresan en el sistema cromatográfico a través de un inyector Rheodyne 7725i con un *loop* de 20 μl. La adquisición de datos y el control de los distintos módulos instrumentales son realizados con un programa informático para LC/MSD, Agilent ChemStation Rev. A.10.02.

La preparación de las soluciones estándares se realizaron por pesada de una cantidad definida del analito en una balanza marca Mettler, (precisión ±0,0001 g) y llevadas a volumen en material de vidrio de uso cuantitativo. Las diluciones de las mismas fueron realizadas con una micropipeta calibrada marca Eppendorf® en matraces volumétricos de 10 ml.

3.2.1.3-Optimización de las condiciones de separación y detección.

Soluciones nominales de 100 ppm ($\mu\text{g/litro}$) de los distintos esteroides son inyectadas en el sistema separativo utilizando como fase móvil 50:50 de ACN: Agua (0,1 % HCOOH), en modo isocrático a 0,50 ml/min utilizando como fuente de ionización ESI y APCI.

A partir de la mejor detección lograda entre fuentes, se barren distintas energías de ionización y distintas condiciones de nebulización, así como modos de detección positivo y negativo. Seguidamente se realizan optimizaciones de las condiciones separativas con distintas relaciones de ACN: Agua evaluando la dependencia, tanto de la separación como de la detección de cada esteroide, con la concentración y tipo de ácido orgánico (HCOOH y HAc), que será medido a través del tipo e intensidad del ion formado. Posteriormente se ajustan los flujos de elución para lograr la resolución de los 6 esteroides en una misma corrida cromatográfica.

Con las condiciones optimizadas de separación, los valores de energía de ionización y de nebulización de la fuente, que logren la mejor detección, se procede a desarrollar la técnica de cuantificación de las HE, a partir de los iones medidos para cada compuesto, por programación de un Monitoreo de Ion Selectivo (SIM) en función de los distintos tiempos de retención.

3.2.1.4-Validación cuantitativa de la técnica.

La validación analítica se realiza en forma completa sobre testosterona, 11-cetotestosterona y 11β -hidroxiandrostenediona y parcial sobre Androstenediona, 11β -cetoandrostenediona y 11β -hidroxitestosterona. Los parámetros que se validan son: linealidad, precisión y exactitud, límite de detección (LD) y cuantificación (LC), según los criterios de la norma ICH (2001), utilizando el área bajo la curva como respuesta de concentración. Para este procedimiento se utilizan soluciones madres de 1,003, 1,040 y 1,025 mg/ml, para T, 11-KT y $11\beta\text{OHA}_4$, respectivamente preparadas en metanol, las que fueron mantenidas a $-20\text{ }^\circ\text{C}$ hasta su uso. Las soluciones de trabajo fueron preparadas por diluciones seriadas en acetonitrilo de los compuestos individuales o mezclas de ellos según cada caso.

La linealidad se estudia en el intervalo de 0,3-100,0 ng/mL. La precisión (%DER) y exactitud (ER) se evalúan para distintas concentraciones nominales: 3,125, 12,5 y 50 ng/mL, según las ecuaciones 3.2.1.4.1 y 3.2.1.4.2. Los LD y LC se calculan según el método basado en la desviación estándar de la respuesta y la pendiente (Ecuaciones 3.2.1.4.3 y 3.2.1.4.4)

$$\text{Desviación estándar relativa \%DER} = \frac{\text{DE}}{\bar{x}} \times 100 \quad \text{Ecuación 3.2.1.4.1}$$

Donde:

$$DE = \text{Desviación estándar: } DE = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n-1}}$$

\bar{x} = Promedio, x_i corresponde al valor medido y n = número de observaciones

$$\text{Error relativo } ER = \frac{(X_i - X_{real}) \times 100}{X_{real}} \quad \text{Ecuación 3.2.1.4.2}$$

$$\text{Límite de detección LD} = \frac{3,3 \sigma}{S} \quad \text{Ecuación 3.2.1.4.3}$$

$$\text{Límite de cuantificación LC} = \frac{10 \sigma}{S} \quad \text{Ecuación 3.2.1.4.4}$$

Donde:

σ : es la desviación estándar de la respuesta (se usa la desviación estándar de ordenada al origen de la curva de Linealidad)

S: es la pendiente de la curva de Linealidad

También se evalúa la recuperación sobre las matrices estudiadas, por comparación entre los niveles medidos sobre muestras tal cual y muestras con sobreagregados de esteroides, las cuales son sometidas al proceso integral de análisis que incluye la extracción y cuantificación de los analitos. La metodología de extracción consiste en la propuesta por Blasco et al. (2007), donde las muestras son extraídas con éter etílico en una relación muestra extractante de 1:5, con tres contactos, luego los extractos son unificados, tratados con Na_2SO_4 , llevados a sequedad en corriente de nitrógeno y resuspendidos en ACN, para su inyección en el instrumento.

La calidad de recuperación se evalúa a partir de APHA-AWWA-WEF (1998), expresadas como % recuperado según ecuación 3.2.1.4.5.

$$\% Ri = 100 \times \frac{C_i^S - C_i^{nS}}{C_i^m} \quad \text{Ecuación 3.2.1.4.5}$$

Donde

C_i^S = concentración del $i^{\text{ésimo}}$ analito en la matriz fortificada

C_i^{nS} = concentración del $i^{\text{ésimo}}$ analito en la muestra sin fortificar

C_i^m = concentración conocida del $i^{\text{ésimo}}$ analito agregado

3.2.2-*Aplicación de la metodología desarrollada sobre peces de laboratorio y de campo.*

A partir de la técnica validada y el conocimiento de las propiedades moleculares de cada andrógeno estudiado, se aplica la metodología sobre peces de laboratorio, para comparar, independientemente de la concentración, el perfil de los esteroides medidos en cada caso y las posibles relaciones con la especie, el sexo y el ambiente.

3.2.3-*Modelado molecular de los esteroides andrógenos.*

Las moléculas estudiadas: testosterona, 11 β -cetotestosterona, 11 β -hidroxitestosterona, androstenodiona, 11 β -cetoandrostenodiona y 11 β -hidroxiandrostenodiona, son cargadas individualmente en el programa Hyperchem (Versión 6.03, 2000. Hypercube, Inc.) Para la optimización estructural se aplica una dinámica molecular para encontrar los tiempos de relajación de cada molécula y a partir de ese instante se muestrean 20 estructuras, seguidamente la geometría de los distintos conformeros son optimizados con métodos semiempíricos, particularmente por AM1 (Kubli-Gatias et al., 1998). Simultáneamente, los distintos andrógenos son cargados en el programa EPIWEB 4.0 (descrito en el Capítulo I, ítem 1.8.1) para obtener los valores de K_{ow} y solubilidad. El valor del momento dipolar es medido sobre el conformero más estable de los 20 muestreados con el programa Hyperchem. Las distribuciones de las especies iónicas, medidas en el espectrómetro de masas, son correlacionadas con las propiedades generales de las moléculas, descritas anteriormente, a partir de los balances de masas sobre el total de especies químicas medidas en la cámara en valor absoluto de intensidades. Las intensidades iónicas son sumadas y luego cada una de ellas es referida, en forma porcentual, al total (Ecuación 3.2.2.1 y 3.2.2.12).

$$C_i = \frac{IC_i}{I_t} \times 100 \quad \text{Ecuación 3.2.3.1}$$

Donde

C_i es el porcentaje de la especie i , relacionada con cada HE.

IC_i es la intensidad de la especie química formada en la cámara

I_t es la suma de las intensidades de cada especie iónica.

Así queda

$$C_a = \sum C_i \quad \text{Ecuación 3.2.3.2}$$

Donde C_a es la concentración del analito estudiado, que al entrar a la cámara se distribuye en una serie de iones relacionados C_i .

3.3-RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

3.3.1- Caracterización de las distintas moléculas por espectrometría de masas.

Los distintos ensayos de optimización mostraron que en la fuente de ionización de APCI la formación de iones secundarios es mínima (Figura 3.3.1.1), pero las variaciones instrumentales como temperatura del gas de secado, energía de impacto, voltaje de corona y distintas condiciones de nebulización, no produjeron valores de respuesta específica (RE= Área/Concentración) por encima de los obtenidos con ESI, para todos los compuestos. En los modos negativos de detección, en ambas fuentes, se observa la pérdida de protón, dando como producto un m/z correspondientes $[M-H]^-$, pero las RE son inferiores a los medidos para el modo ESI positivo. Esta tendencia, a la ionización, que mostraron las moléculas ensayadas, está en acuerdo con las publicaciones que analizan algunas de ellas donde se informa a la fuente de ESI en modo positivo como la óptima para este tipo de aplicaciones según lo publicado por Hauser et al. (2008). En esta fuente, los iones formados dependen de la energía de impacto (Figura 3.3.1.1), ya que un valor por debajo de 150 eV produce espectros de masa con mayor población de iones secundarios respecto a la especie protonada, en cambio un aumento de la energía de impacto produce diversos iones moleculares de difícil asociación con una especie química definida, posiblemente por distintas fragmentaciones moleculares, en función de estos resultados se caracterizan las distintas HE con la fuente ESI, en modo positivo a 150 eV (Tabla 3.3.1.1). Los espectros de masa correspondientes se muestran en la Figura 3.3.1.2.

Las variaciones en el caudal de secado mostraron un comportamiento característico de las técnicas de HPLC-MS: para bajos caudales se observan picos fantasmas derivados del ruido proveniente de la fase acuosa (Figura 3.3.1.3) y para altos, se produce un descenso en el valor de sensibilidad por una dilución de la muestra en la cámara de ionización tal como lo describe Niessen (1999), el valor que minimiza el ruido y maximiza la detección, para la fuente de ESI a 150 eV, fue de 7 litros/minuto de N_2 , para este grupo de moléculas.

Tabla 3.3.1.1: Iones detectados por electroespray con una energía de fragmentación de 150 eV para las distintas HE analizadas.

Molécula	Masa molecular	$[M+H]^+$	$[M+Na]^+$	$[M+K]^+$	$[2M+H]^+$	$[2M+Na]^+$
		$[M+1]$	$[M+23]^+$	$[M+39]^+$	$[2M+1]^+$	$[2M+23]^+$
11 β -OHT	304	305	327	343	609	631
11-KT	302	303	325	341	605	627
11-KA ₄	300	301	323	339	601	623
11- β OH A ₄	302	303	325	341	605	627
T	288	289	311	327	577	599
A ₄	286	287	309	325	573	595

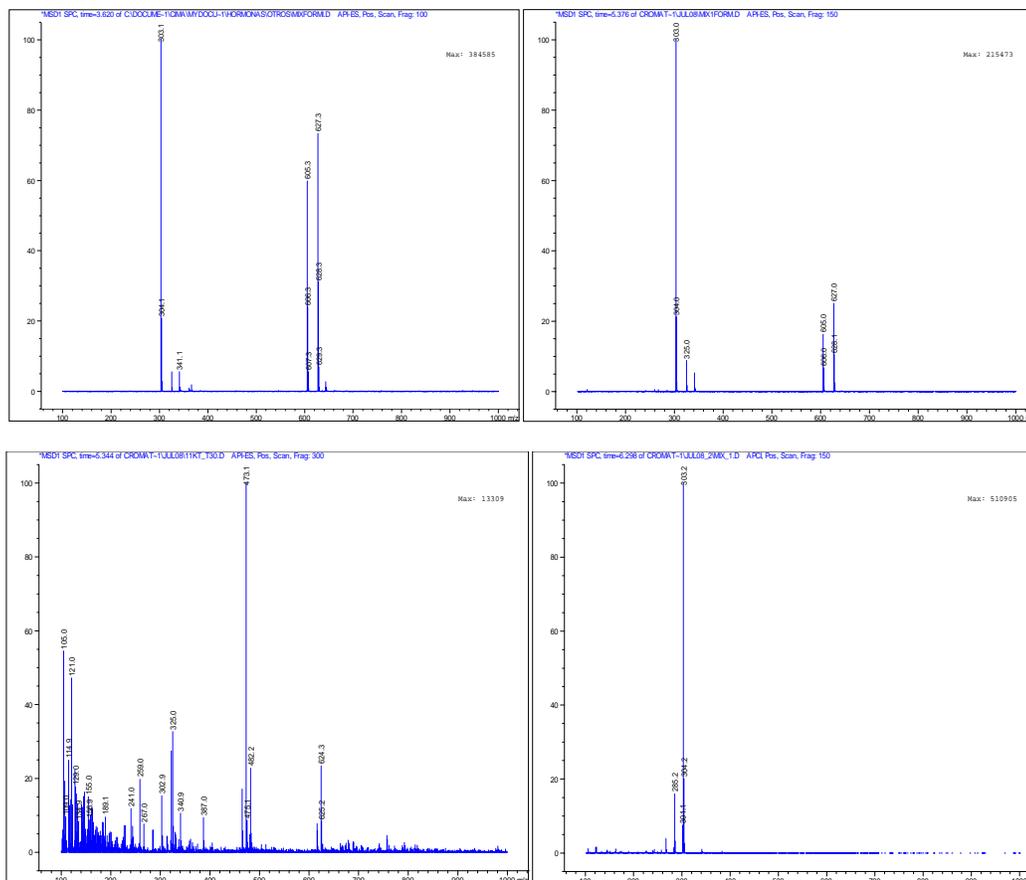


Figura 3.3.1.1: comparación de espectros de masa de 11-KT para energías de ionización de a) 100, b) 150 y c) 300 eV, d) Fuente de APCI a 150 eV.

Para las condiciones establecidas de energía de fragmentación (150 eV) y de nebulización de 40 psi, se evalúan distintas composiciones de fases móviles (ACN: H₂O), su incidencia separativa y la dependencia de formación de iones, tanto en tipo como en intensidad. La mejor separación cromatográfica se obtuvo para una relación ACN: componente acuosa de 55:45. La utilización de HCOOH, HAC y NH₄Ac (al 0,1 % y 0,5 % v/v) en la componente acuosa, muestran que la separación analítica no se ve mayormente afectada por la variación del tipo y concentración del dopante. Un comportamiento similar muestran los iones formados, en cuanto a su tipo, en todos los casos se observan los detallados en la Tabla 3.3.1.1, en cambio las intensidades relativas entre ellos sí dependen de la concentración de la especie química presente en la fase móvil, ya que por ejemplo, para el agua conteniendo ácido acético al 0,1 % el pico base, para todas las HE, corresponde a [2M+H]⁺ y al 0,5% el ion mayoritario es [M+H]⁺ (Figura 3.3.1.4), una comparación detallada de los iones (normalizados respecto al pico base) para 11KT, 11-βOHA₄ y T se muestra en la Tabla 3.3.1.2.

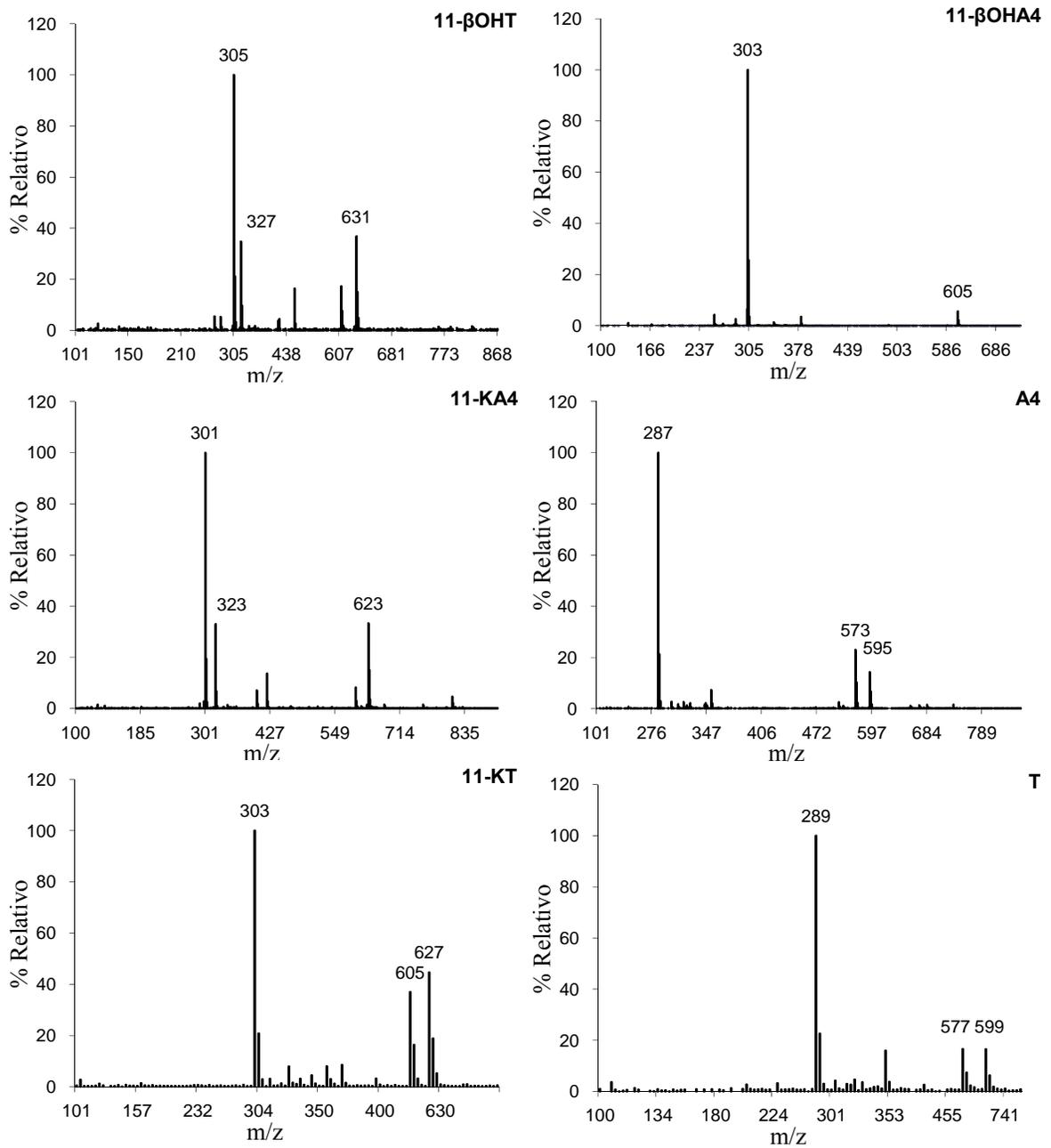


Figura 3.3.1.2: Espectros de masa para los distintas HE estudiadas, obtenidos con fuente ESI a 150 eV. Iones normalizados respecto al ion mas abundante (ion base).

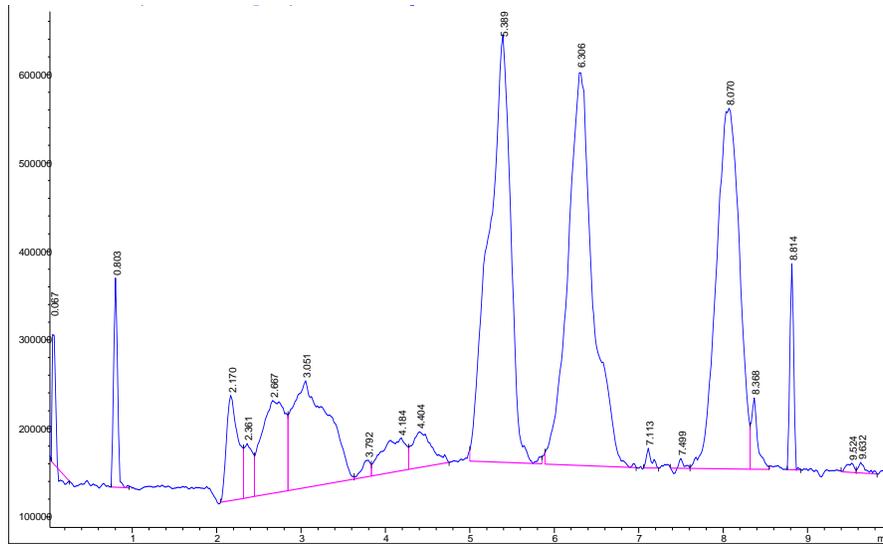


Figura 3.3.1.3: cromatograma de 11-KT, 11-KA₄ y 11-βOH A₄ con bajo caudal de secado, las flechas indican ruido en el cuadrupolo derivado de la falta de eliminación de moléculas de agua en la cámara de ionización.

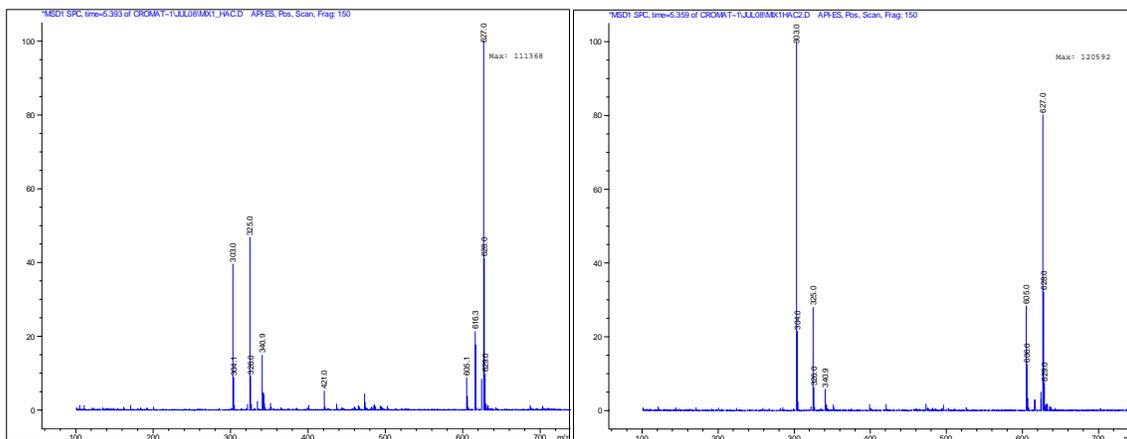


Figura 3.3.1.4: Espectro de masas de 11-KT, para a) HAC 0,1% v/v en agua y b) HAC 0,5% v/v en agua.

Tabla 3.3.1.2: Distribución de iones (normalizada %) formados para 11KT, 11-βOHA₄ y T, con agua conteniendo 0,1% y 0,5 % (v/v) de HAC.

Molécula	HAc 0,1 %					HAc 0,5 %				
	M+H	M+Na	M+K	2M+Na	2M+H	M+H	M+Na	M+K	2M+Na	2M+H
11KT	39,4	46,6	14,7	base	8,8	base	27,9	5,7	80,4	28,5
11-βOHA ₄	38,8	43,3	14,4	base	7,4	base	29,1	6,0	90,3	26,4
T	61,3	65,6	13,2	base	10,1	base	27,2	3,7	68,0	25,3

El comportamiento del NH_4Ac , es el mismo que el observado para el HAc . Las distribuciones iónicas formadas con el HCOOH , son iguales, en cuanto a el ion base ($[\text{M}+\text{H}]^+$) y los relacionados, para ambas concentraciones. En función del comportamiento frente a los dopantes acuosos, se puede decir que la formación del ion base es dependiente de la concentración de protones en la cámara, lo que puede resumirse como una competencia entre la dimerización del analito y la protonación del mismo, la prevalencia de una u otra reacción depende de la disponibilidad de protones (H^+) en la cámara y por consiguiente de la fuerza del ácido y su concentración en la fase acuosa; esto permite interpretar a los iones base formados a concentración 0,1%, ya que el HCOOH ($K_a=1,78 \cdot 10^{-4}$, que es el más fuerte de la serie) a esa concentración es capaz de proveer los protones necesarios para favorecer el ion $[\text{M}+\text{H}]^+$, mientras que el HAc ($K_a=1,75 \cdot 10^{-5}$) y el NH_4Ac (Anfolito de igual K_a y K_b), necesitan mayores concentraciones para igual resultado.

Los $[\text{M}+\text{H}]^+$, para las concentraciones 0,5 % v/v medidos como intensidad absoluta de salida del cuadrupolo (Tabla 3.3.1.3). Los formados en la atmósfera de ácido fórmico son más numerosos respecto al acético y al acetato de amonio para 5 de las 6 moléculas estudiadas.

Todas las razones detalladas anteriormente hacen que el dopante seleccionado para la fase acuosa, para la validación de la técnica sea el HCOOH en la concentración 0,5 %v/v.

Tabla 3.3.1.3: intensidad de iones $[\text{M}+\text{H}]^+$, detectados con dopante al 0,5 %v/v en la componente acuosa de la fase móvil, para las distintas HE. ESI positivo, fragmentador 150 eV y 7 litros/minutos de caudal de gas de secado.

Molécula	HCOOH	HAc	NH_4Ac
11 β -OHT	239167	162263	110069
11-KT	247828	217360	120043
11-KA ₄	29276	33599	18122
11- β OH A ₄	162836	151824	105171
T	272745	229348	132321
A ₄	243427	191094	115063

3.3.2- Características de los iones formados.

Tal como se mostrara en la Figura 3.1.3.1, las distintas moléculas varían en el número de OH- y de grupos ceto en su estructura, donde la 11-KA₄ tiene todos grupos ceto (C_3 , C_{11} y C_{17}) y la 11 β -OHT es la especie química donde se encuentra el mayor número de oxidrilos de la serie (C_{11} y C_{17}). Estas características estructurales guardan una estrecha relación con la formación de los dímeros, ya que la que produce una mayor cantidad es la 11 β -OHT, lo cual estaría indicando que el OH- tiene una participación relevante en la formación de la estructura dimérica. Otro factor a considerar en este proceso es la estereoquímica, al comparar los % normalizados de la 11-KT, 11- β OHA₄ y la T, que poseen un solo grupo OH-, se evidencia que la molécula más simple del grupo (T) es la que forma el $[\text{2M}+\text{H}]^+$ en mayor proporción y la inclusión sucesiva de grupos ceto es acompañada por una disminución también regular de este tipo de iones (Tabla

3.3.2.1), posiblemente vinculado a las limitaciones roto-conformacionales por la aparición de electrones π en la unión C-O.

Tabla 3.3.2.1: % de iones $[2M+H]^+$, normalizados al ion base, para las distintas HE, detectados con HCOOH 0,5 % v/v, ESI positivo, fragmentador 150 eV y 40 psi de nebulizador.

Molécula	$[2M+H]^+$
11 β -OHT	23,7
11-KT	16,2
11-KA ₄	4,1
11 β -OH A ₄	12,5
T	18,1
A ₄	9,4

En mucho menor proporción que los demás iones del espectro, para el caso de la 11 β -OH A₄ (7,0%) y de 11 β -OHT (4,4%), se observa pérdida de un OH-. No es el caso de las demás moléculas del grupo, por lo que el OH- en el C₁₁, es más lábil que los ubicados en la posición C₁₇ (T, 11-KT), esta pérdida se observa como $[M-H]^+$, según el mecanismo propuesto en la Figura 3.3.2.1.

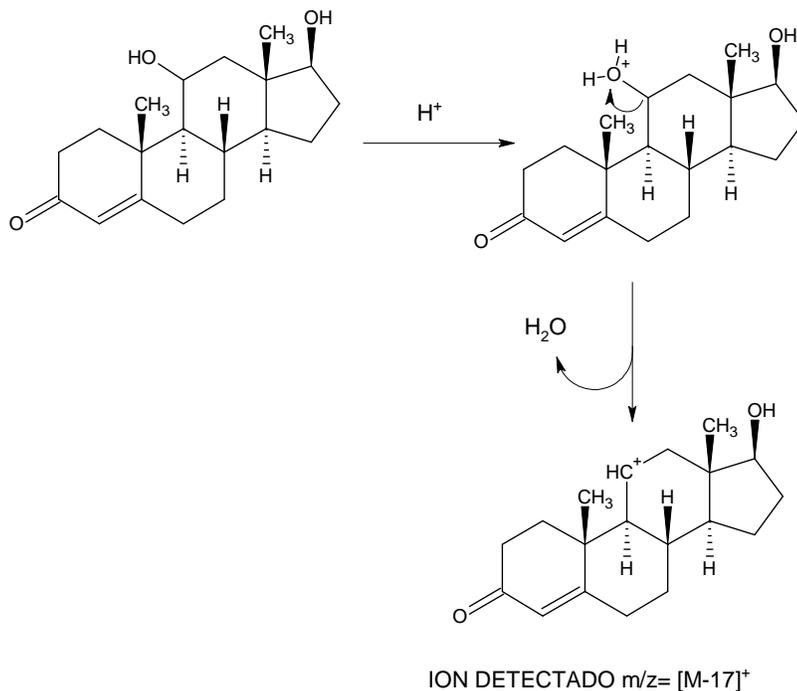


Figura 3.3.2.1: esquema de reacciones propuesto para la pérdida de oxidrilo en la 11 β -OHT.

3.3.3-Validación analítica de la técnica de HPLC-MS.

A continuación se citan las condiciones instrumentales, separativas y de detección, para la validación de la técnica analítica usando los iones $[M+H]^+$ citados en la tabla 3.3.1.1. Un cromatograma típico se muestra en la Figura 3.3.3.1., donde los anchos de pico fueron 0,16; 0,19 y 0,21 minutos y las simetrías de picos, para T, 11-KT y 11- β OHA₄ respectivamente resultaron 1,009; 1,037 y 0,987.

Equipamiento	Condiciones
	<i>Separación</i>
Columna separativa	Gemini C ₁₈ de 15 cm×4,6 mm de Ø
Fase móvil	ACN : H ₂ O (HCOOH 0,1 %) 55:45, isocrático.
Flujo	0,5 ml/min
Inyección-Loop	20µL
	<i>Detección</i>
Fuente de ionización	ESI-modo SIM positivo
Flujo gas nebulizante	7 l/min (40 Psi)
Temperatura	330°C
Energía de fuente	150 eV

La validación de la técnica fue exhaustivamente desarrollada para T, 11-KT y 11- β OHA₄

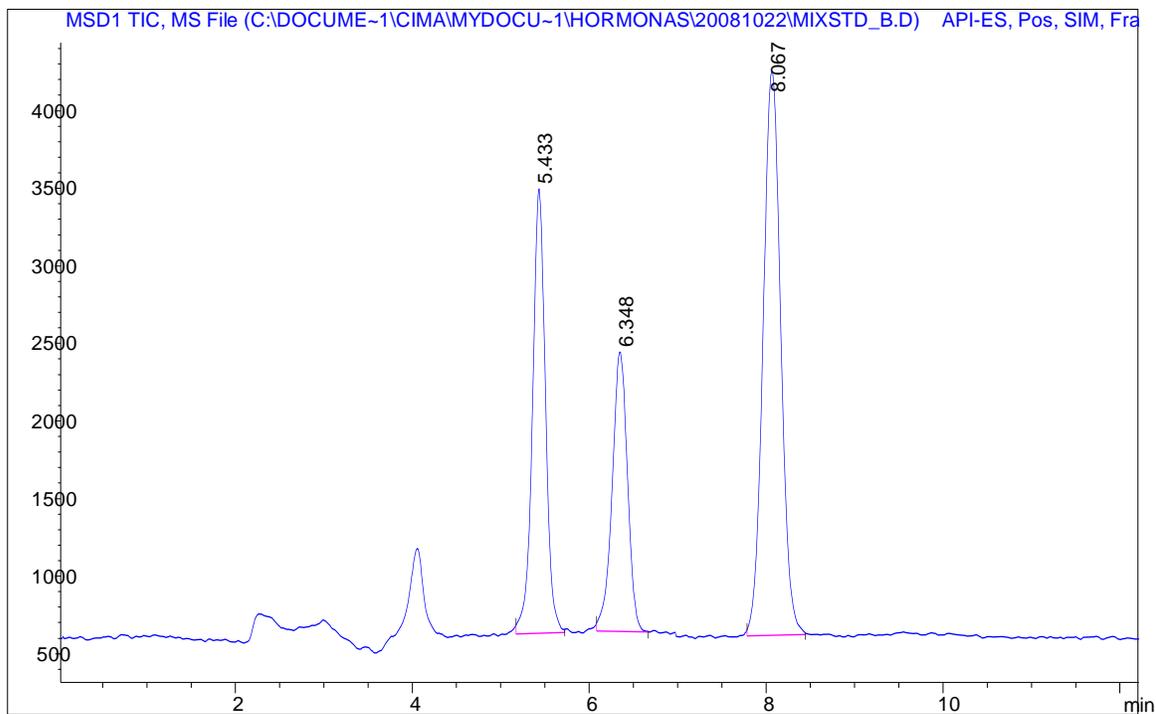


Figura 3.3.3.1: cromatograma característico de T, 11-KT y 11- β OHA₄, en las condiciones de corrida del método.

3.3.3.1-Linealidad.

Los resultados de la linealidad se muestran en la Tabla 3.3.3.1.1. El intervalo de trabajo estudiado fue de 0,3-100 ng/mL. Por encima de los 100 ng/mL la recta comienza a curvarse. Los parámetros incluyen el coeficiente de correlación (r), la pendiente y la desviación estándar de la misma (DE), el tiempo de retención para cada analito (t_r) y el ión utilizado para la detección (m/z).

Tabla 3.3.3.1.1: resultados de linealidad y tiempos de retención de las distintas HE medidas en las condiciones instrumentales citadas en el ítem 3.3.3

Esteroides	$t_r \pm 0,1$ (min)	PM	m/z	Pendiente (valor \pm DE)	R	N
11 β -OHT	5,3	304,43	305	--	--	--
11-KT	5,5	302,43	303	2186,4 \pm 21,2	0,9996	4
11 β -OH A ₄	6,3	302,43	303	1549,9 \pm 23,4	0,9987	4
11-KA ₄	6,6	300,43	301	--	--	--
T	8,0	288,43	289	3747,6 \pm 40,1	0,9988	4
A ₄	9,7	286,43	287	--	--	--

N/D: no determinado experimentalmente.

Los resultados muestran una buena separación entre los distintos compuestos, los casos más críticos, los pares 11 β -OHT/11-KT y 11-KA₄/11 β -OH A₄, se intentaron resolver a partir de la utilización de gradientes ACN:H₂O, pero el corrimiento de los picos se producía en forma conjunta. Desde el punto de vista práctico este inconveniente fue resuelto trabajando con distintas mezclas de compuestos:

-mezcla 1(Mix1): 11-KT, 11 β -OH A₄, T., medidos en programación SIM-1

-mezcla 2 (Mix2): 11 β -OHT, 11-KA₄, A₄ medidos en programación SIM-2

En virtud de estos resultados se realizó una evaluación de interferencia iónica, analizando tanto los perfiles cromatográficos como las áreas bajo la curva de Mix1 (en SIM1), Mix2 (en SIM2) y una solución de todos las HE (corridos en SIM1 y SIM2) en las condiciones instrumentales de cuantificación, esto fue realizado sobre patrones y sobreagregados de ellos en plasmas de peces. Los resultados mostraron que no hay diferencias significativas en las áreas cromatográficas por lo cual se asume que no hay interferencias entre ellos en la programación SIM, esto esta de acuerdo con la resolución de masas para esta marca y modelo de instrumento (luma).

3.3.3.2-Presición y exactitud.

En la tabla 3.3.3.2.1 se presentan los resultados de precisión y exactitud para T, 11-KT y 11- β OHA₄ en distintas concentraciones, a partir de las rectas de linealidad del ítem 3.3.3.1.

Tabla 3.3.3.2.1: Resultados de precisión y exactitud para T, 11-KT y 11- β OHA₄, para distintos valores de concentración

11-KT				T				11- β OHA ₄			
Conc.	Conc. Calc.	ER (%)	DER (%)	Conc.	Conc. Calc.	ER (%)	DER (%)	Conc.	Conc. Calc.	ER (%)	DER (%)
52,00	54,17	4,17	1,37	50,15	48,32	-3,65	2,14	51,25	49,02	-4,35	3,58
52,00	52,73	1,40		50,15	50,43	0,56		51,25	52,65	2,73	
52,00	53,71	3,29		50,15	49,36	-1,58		51,25	50,67	-1,13	
13,00	12,25	-5,77	4,97	12,54	13,00	3,67	1,30	12,81	12,05	-5,93	3,20
13,00	12,77	-1,77		12,54	12,67	1,04		12,81	12,77	-0,31	
13,00	13,52	4,00		12,54	12,79	1,99		12,81	12,13	-5,31	
3,25	3,33	2,46	5,32	3,13	3,34	6,71	0,52	3,20	3,38	5,62	3,84
3,25	3,07	-5,54		3,13	3,31	5,75		3,20	3,27	2,19	
3,25	3,40	4,62		3,13	3,34	6,71		3,20	3,13	-2,19	

Conc.= concentración

Conc. Calc.= concentración calculada con las rectas de calibración del ítem 3.3.2.1.

ER= error relativo, DER= desviación estándar relativa

La precisión de este método, medida a través de la DER (%), arrojo un valor de variabilidad máximo del 5,3%, la exactitud oscilo entre -5,93% y 6,71%.

3.3.3.3-LD y LC.

Los límites de detección y cuantificación se calculan con las Ecuaciones 3.2.1.4.1 y 3.2.1.4.2 y corresponden a los detallados en la Tabla 3.3.3.3.1. Una aproximación gráfica se muestra en la figura 3.3.3.3.1.

Tabla 3.3.2.3.1: LD y LC para 11-KT, 11 β -OHA₄ y T.

Esteroides	LD (ng/ml)	LC (ng/ml)
11 β -OHT	N/D	N/D
11-KT	0,1	0,3
11-KA ₄	N/D	N/D
11 β -OHA ₄	0,2	0,5
T	0,1	0,2
A ₄	N/D	N/D

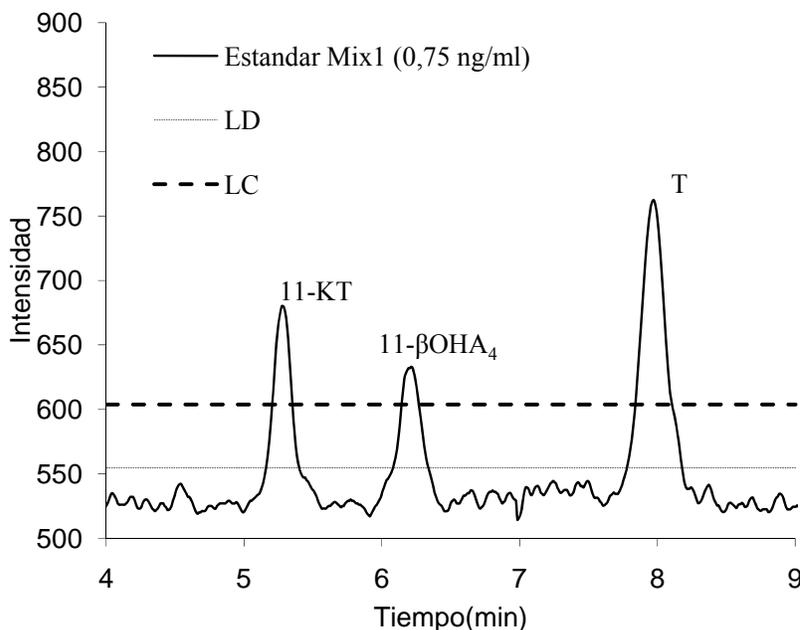


Figura 3.3.2.3.1: comparación de un estándar de 0,75ng/ml de cada compuesto del Mix1, para evaluación señal/ruido de los distintos compuestos, según las intensidades esperadas para LD y LC

Los límites de cuantificación (LC) y detección (LD), de cada compuesto, son comparables a los datos ya publicados, para esteroides estructuralmente relacionados, por Janzen et al. (2008).

3.3.3.4-Recuperación.

La recuperación de cada compuesto se calculó comparando plasmas de peces con y sin sobregregados. Los valores obtenidos fueron 92 ± 5 ($n = 6$), 102 ± 13 ($n = 6$), y 92 ± 7 ($n = 6$), expresados como % según la ecuación 3.2.1.4.5 para 11-KT, β OHA₄ y T, respectivamente. Estos resultados son comparables a los reportados por Mylonas et al. (1997) y Hauser et al (2008), para compuestos similares utilizando el mismo método de extracción. Una comparación gráfica es mostrada en la Figura 3.3.3.4.1

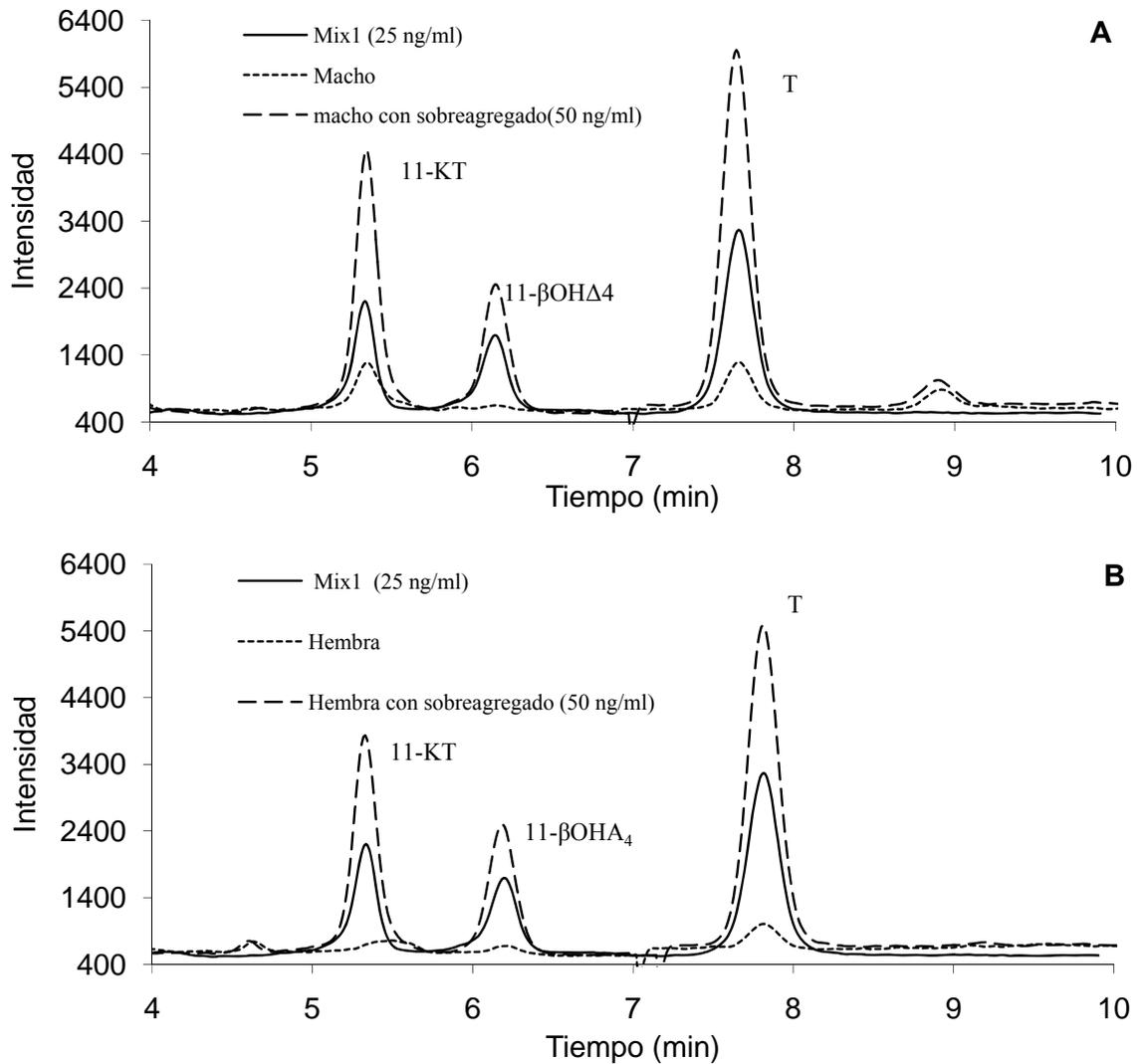


Figura 3.3.3.4.1: Comparación de un estándar de 25 ng/ml para las HE validadas, sobre un extracto de plasma con y sin sobreagregado para un A) Macho y B) Hembra.

3.3.3.5-Aplicación a muestras de peces.

La metodología desarrollada y validada en los ítems anteriores fue aplicada en muestras de suero plasmático de peces (Goldfish), los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 3.3.33.5.1. Las concentraciones de estos esteroides en el suero fueron comparables con los obtenidos para 11-KT y T en una fase reproductiva equivalente según lo publicado por Kobayashi et al. (1986). En este sentido no se hacen análisis de la dependencia de los niveles observados respecto a su vinculación biológica, sino que lo destacable es que esta metodología permite cuantificar esteroides en manera rápida (10 minutos de corrida cromatográfica) y con resultados similares a los informados por otros autores, con metodologías convencionales que miden los niveles de estas HE en peces, las cuales incluyen un mayor manipuleo de las muestras, con una serie de pasos sucesivos tal como se describe en el ítem 3.1.4. Además estos

procedimientos pueden estar afectados por contaminación cruzada tal como lo informan Lokman et al (2002). En este sentido la espectrometría de masas proporciona resultados confiables, al detectar una especie química relacionada con la molécula de interés y particularmente, para las moléculas estudiadas las posibles interferencias iónicas cruzadas fueron descartadas en función de los resultados obtenidos en el ítem 3.3.2.1.

Tabla 3.3.3.5.1: Datos de muestras de goldfish medidos en suero plasmático, para 11-KT, 11- β OHA₄ y T. Los resultados de exactitud y precisión de los valores presentados en esta tabla están afectados por los descriptos en el ítem 3.3.3.2.

Rótulo de muestra	Sexo	Madurez	T (ng/ml)	11-KT (ng/ml)	11- β OHA ₄ (ng/ml)
GF102_11/03/08	H	Ma	3,7	< 0,3	< 0,5
GF106_11/03/08	H	Ma	1,6	5,8	1,9
GF107_11/03/08	H	Ma	1,2	3,1	< 0,5
GF205_22/04/08	H	Ma	2,5	< 0,3	1,4
GF206_22/04/08	H	Ma	3,6	< 0,3	0,5
GF103_11/03/08	M	Ma	4,3	12,3	3,4
GF104_11/03/08	M	Ma	4,9	14,5	6,6
GF105_11/03/08	M	Ma	5,9	11,7	1,3
GF201_22/04/08	M	Ma	5,9	13,6	1,5
GF202_22/04/08	M	Ma	5,2	19,4	< 0,5
GF203_22/04/08	M	Ma	5,4	12,6	0,9
GF204_22/04/08	M	S	13,2	18,7	0,9
GF1H_25/02/08	H	Ma	7,7	0,9	98
GF2M_25/02/08	M	Ma	9	4,9	110
GF4M_25/02/08	M	Ma	12	3,4	106
GF5M_25/02/08	M	Ma	4,0	1,0	35
GF6M_25/02/08	M	Ma	9	2,6	42
GF7H_25/02/08	H	Ma	7	4,3	68

H= Hembra, M= Macho, Ma= maduro S=en espartogénesis

Los resultados muestran una mayor concentración de 11-KT para los machos maduros, en una fase de su ciclo reproductivo y un incremento de 11- β OHA₄, en otro momento de su estadio. Estos resultados están de acuerdo a los publicados por Borg et al. (1989) y Lokman et al. (2002).

3.3.4-Modelado molecular de las distintas HE.

Luego de aplicar una dinámica molecular, evaluar los confórmeros más estables y optimizarlos por AM1, las energías totales y de HOMO-LUMO de los más estables, para cada molécula, se muestran en la Tabla.

Tabla 3.3.4.1: resultados de energías totales y HOMO-LUMO para las distintas HE, exploradas por dinámica molecular, optimizando los distintos conformeros por el método semiempírico AM1.

Molécula	E_{tot} (Kcal/mol)	$E_{\text{HOMO-LUMO}}$ (Kcal/mol)
11 β -OHT	-87201,2	-10,050
11-KT	-86556,8	-10,175
11-KA ₄	-85901,2	-10,173
11 β -OHA ₄	-86547,9	-10,158
T	-79811,2	-9,958
A ₄	-79162,8	-10,001

Los resultados muestran que la molécula de menor energía total es la 11 β -OHT y la de mayor energía es la A₄, para el caso de las energías HOMO-LUMO tanto la 11-KT y la 11-KA₄ resultan ser las más estables del grupo, mientras que la T es la de energía mayor. Este comportamiento es acorde a las observaciones biológicas, por ejemplo, en el sentido de que a partir de la presencia de testosterona ésta se convierta en 11-KT, una molécula energéticamente más estable, aunque estos procesos desde el punto de vista biológico, estén dominados por la demanda de cada una de ellas regulados a través de las enzimas 11- β -HSD y CYP11B.

3.3.5-Relaciones entre la energía molecular y la espectrometría de masas.

En función de los estudios realizados en el ítem 3.3.1, a partir de las concentraciones de los distintos dopantes en la componente acuosa de la fase móvil, se plantea un balance iónico de las distintas especies moleculares formadas en la cámara de ionización, para la concentración 0,5% v/v, en los casos donde se observa la pérdida de OH⁻ es considerada como una especie química para el balance iónico, pero a fines comparativos en la Tabla 3.3.5.1 se presentan las especies comunes formadas con los distintos compuestos presentes en la fase móvil.

Es una práctica corriente el hecho de aplicar herramientas de la química computacional para justificar, en función de energías moleculares, la aparición de distintos iones en la espectrometría de masas. Una hipótesis *ad hoc* podría decir que la “los iones que se producen en la cámara están relacionados tanto con la energía de la molécula como con su estructura”. Para evaluar esto se correlacionan las E_{tot} y la $E_{\text{HOMO-LUMO}}$, con las distribuciones de los iones dependientes de cada HE mostrados en la Tabla 3.3.5.1. Para ello se comparan los resultados obtenidos utilizando, como variables descriptivas, a todos los iones, con los seleccionados por “mejor modelo” del programa XLStat, en función de las mejores correlaciones individuales (Capítulo II, ítem 2.5.6.1), para los tres dopantes. (Tabla 3.3.5.2).

Tabla 3.3.5.1: Distribuciones para los iones comunes, formados para las distintas HE, con los dopantes al 0,5% v/v en la componente acuosa de la Fase móvil, medidos como una función de la detección absoluta, aplicando la ecuación 3.2.2.1. (Expresados en % al total).

	<i>HCOOH</i>					
	M+H	C ₁₃ M+H	M+Na	M+K	2M+Na	2M+H
11β-OHT	46,42	9,27	6,33	3,33	23,65	11,01
11KT	56,39	12,07	5,36	3,00	14,07	9,12
11-KA4	67,62	13,04	8,07	2,46	6,15	2,65
11-βOHA4	50,89	11,36	7,01	3,41	17,15	6,33
T	59,12	12,26	5,79	1,58	10,57	10,68
A ₄	62,02	12,02	8,87	0,77	5,81	10,50
	<i>HAc</i>					
11β-OHT	34,08	6,53	6,88	3,32	32,78	16,42
11KT	37,92	7,97	10,60	2,14	30,55	10,81
11-KA4	63,72	12,63	7,93	4,07	7,78	3,87
11-βOHA4	36,63	7,67	10,68	2,21	33,16	9,66
T	40,78	8,49	11,08	1,50	27,77	10,35
A ₄	45,38	10,20	15,40	1,30	22,58	5,14
	<i>NH₄Ac</i>					
11β-OHT	54,44	11,20	3,81	0,99	17,28	9,41
11KT	57,26	11,86	4,98	0,56	14,87	10,09
11-KA4	72,21	15,05	4,04	1,37	2,98	2,68
11-βOHA4	53,66	11,08	6,08	0,77	17,93	6,72
T	60,29	12,54	4,13	0,29	9,83	12,34
A ₄	66,81	14,34	4,74	0,30	5,93	7,30

M+H= molécula protonada, C₁₃M+H = molécula protonada con C₁₃, M+Na= aducto molecular con sodio, M+K=aducto molecular con potasio, 2M+H= dímero molecular protonado, 2M+Na=dímero molecular aducto con sodio

Las relaciones entre las energías y su dependencia con las distintas moléculas, medidas por medio de sus distribuciones iónicas, se presentan en la Tabla 3.3.3.2. En la misma se observan valores de correlación entre la E_{tot} y $E_{HOMO-LUMO}$ y las distribuciones porcentuales de los iones, de 1,000, lo que indicaría que el balance de masas iónicas en la fuente ESI, es dependiente de las características energéticas de cada molécula. Asimismo, para los casos de todas las variables, el programa selecciona las linealmente independientes y mayormente esto está reflejado en la capacidad de protonarse o de formar aductos con Na o K, presentes en a fase acuosa. En cambio a la hora de seleccionar las variables de mejor correlación mutua, respecto a la energía, se incorpora a la tendencia de dimerización como una propiedad molecular de peso en las propiedades estudiadas. Estas especies formadas, indirectamente contienen información estructural, ya que la posibilidad de aproximación entre las distintas moléculas esta directamente relacionada con la distribución de los átomos en el espacio.

Tabla 3.3.5.2: coeficientes estadísticos de la correlación entre E_{tot} y $E_{\text{H-L}}$, modelados a partir de los distintos iones formados en la cámara de ionización ESI del espectrómetro de masas para los distintos dopantes a 0,5% v/v. Con * se muestran las especie iónicas que están contenidas en la ecuación de modelado.

	M+H	C ₁₃ M+H	M+Na	M +K	2M+Na	2M+H	r	S	F
HCOOH									
Todas las variables									
E_{tot}	*	*	*	*			0,954	3677,03	2,54
$E_{\text{HOMO-LUMO}}$	*	*	*	*			0,860	0,094	0,710
Mejor modelo									
E_{tot}	*			*	*	*	1,000	3677,03	2936,7
$E_{\text{HOMO-LUMO}}$			*	*	*	*	1,000	0,094	15669,2
HAc									
Todas las variables									
E_{tot}	*	*	*	*			0,954	3677,03	2,539
$E_{\text{HOMO-LUMO}}$	*	*	*		*	*	0,860	0,094	0,710
Mejor modelo									
E_{tot}	*			*	*	*	1,000	3677,03	308,3
$E_{\text{HOMO-LUMO}}$	*	*	*		*		1,000	0,094	376,1
NH₄Ac									
Todas las variables									
E_{tot}	*	*	*	*			0,945	3677,03	2,089
$E_{\text{HOMO-LUMO}}$	*	*	*	*			0,885	0,094	0,901
Mejor modelo									
E_{tot}	*	*			*	*	1,000	3677,03	2352,0
$E_{\text{HOMO-LUMO}}$	*	*	*		*		0,967	0,094	3,659

Dada esta buena correlación entre los iones y las energías, puede plantearse una segunda hipótesis *ad doc*: “si las propiedades fisicoquímicas y las actividades biológicas pueden modelarse utilizando descriptores energéticos y a su vez la energía de una molécula puede interpretarse en términos de las distribuciones iónicas del espectrómetro de masas, entonces tanto las propiedades como las actividades pueden modelarse a través de las distribuciones iónicas existentes en el espectrómetro de masas bajo una misma atmósfera química (H^+)”.

Lo que se debe resaltar de estas ecuaciones son los residuos medidos, por ejemplo en la Tabla 3.3.5.3, se citan los medidos para las E_{tot} y $E_{\text{HOMO-LUMO}}$ y sus respectivos errores porcentuales (ER%, ecuación 3.2.1.4.2), correspondientes al HCOOH.

Para evaluar esto se estudian las correlaciones entre la lipofilidad (Log P), bioconcentración (Log BCF) y Solubilidad (Sol), a partir del programa EPIWIN (que en caso de estar en su base de datos reportó los valores experimentales, T y 11-KT) y los momentos dipolares (calculados a partir de los conformeros más estables por AM1 del Hyperchem) y sus relaciones con los iones formados en la fuente ESI, con los distintos dopantes al 0,5% v/v.

Tabla 3.3.5.3: errores absolutos y relativos porcentuales para las energías totales y de HOMO-LUMO, modeladas a partir de las distribuciones de iones (mejor modelo) para el ácido fórmico al 0,5% v/v.

Molécula	Residuo	Residuo	ER (%)	ER (%)
	E_{H-L}	E_{tot}	E_{H-L}	E_{tot}
11 β -OHT	0,000	-41,01	0,00	0,05
11KT	0,000	39,47	0,00	-0,05
11-K A ₄	0,000	-26,19	0,00	0,03
11- β OHA ₄	-0,001	30,22	-0,01	-0,03
T	0,000	-22,61	0,00	0,03
A ₄	0,000	20,12	0,00	-0,03

A continuación se citan los mejores modelos, para el ácido fórmico, aunque para todos los dopantes se obtuvieron parámetros estadísticos (r, S, F y error relativo porcentual) de iguales características, donde las variaciones se producen en los coeficientes que afectan a cada una de las variables.

$$\text{Mom Dipolar } (\mu) = -87,92 + 1,66 \times [\mathbf{M+H}]^+ - 2,211 \times [\mathbf{C_{13}M+H}]^+ + 1,22 \times [\mathbf{2M+Na}]^+ + 0,53 \times [\mathbf{2M+H}]^+$$

r=1,000 S= 0,893 F= 261,9 Valor más alto de residuo (ER%)=1,4 (T)

$$\text{Log } K_{ow} = 15,66 - 0,49 \times [\mathbf{C_{13}M+H}]^+ - 0,55 \times [\mathbf{M+Na}]^+ - 1,29 \times [\mathbf{M+K}]^+ - 0,12 \times [\mathbf{2M+H}]^+$$

r=1,000 S= 0,786 F= 379,8 Valor más alto de residuo (ER%)=2,6 (11- β OHA₄)

$$\text{Log BCF} = -11,77 + 9,0 \text{ E-}02 \times [\mathbf{M+H}]^+ + 0,55 \times [\mathbf{C_{13}M+H}]^+ - 1,21 \times [\mathbf{M+K}]^+ + 0,32 \times [\mathbf{2M+Na}]^+$$

r=1,000 S= 0,527 F= 285,1 Valor más alto de residuo (ER%)=2,9 (11- β OHA₄)

$$\text{Sol (mg/l)} = -10542,15 + 90,46 \times [\mathbf{M+H}]^+ + 255,92 \times [\mathbf{M+Na}]^+ + 1285,66 \times [\mathbf{M+K}]^+ + 162,98 \times [\mathbf{2M+H}]^+$$

r=1,000 S= 639,2 F= 652,1 Valor más alto de residuo (ER%)=1,12 (11- β OHT)

En función de estos resultados, puede plantearse a los iones formados en la cámara del espectrómetro de masas como una variable descriptiva de distintas propiedades, tanto biológicas como fisicoquímicas, que contienen información tanto energética como estructural de las moléculas. Que la formación de los mismos no es al azar sino que guarda una estrecha relación con estas propiedades intrínsecas de las moléculas y por lo tanto los iones ocuparían el lugar de un “*descriptor molecular empírico*”, situación de la cual no se registran antecedentes bibliográficos.

Por lo que una familia de moléculas podría modelarse a partir de su capacidad de formar iones en el espectrómetro de masas, bajo condiciones isocráticas, es decir bajo una misma atmósfera externa, donde se dan reacciones de competencia, que dependen de la energía de cada molécula y de la distribución espacial de sus átomos.

3.4-CONCLUSIONES

Según los resultados presentados en el ítem 3.3.3 puede concluirse que la técnica analítica desarrollada para la cuantificación de 11-KT, 11 β -OHA₄ y T, es robusta y de buena exactitud y reproducibilidad, y que al aplicarla sobre plasmas de peces las recuperaciones de estos analitos está dentro de los valores encontrados en la literatura. Así mismo, al aplicar esta técnica sobre muestras de peces, se observó que los resultados obtenidos son comparables con los publicados en la literatura determinados por metodologías como RIA, evitando numerosos pasos experimentales y las posibles interferencias.

En esta metodología de HPLC-MS los tiempos de análisis se reducen considerablemente, por lo que constituye una herramienta importante para evaluar casi de manera *on line* las HE y detectar un cambio en sus perfiles, ya sea para aplicaciones de manejo reproductivo-comercial o para detectar la presencia de disruptores endócrinos en un cuerpo de agua, a partir de comparaciones entre peces expuestos y no expuestos, o desviaciones significativas de una media histórica para un determinado cuerpo de agua y una especie fijada, en los distintos ciclos reproductivos.

Es también destacable el hecho de las relaciones existentes entre los iones observados y las distintas variaciones estructurales, sobre un esqueleto carbonado común; su relación con la presencia de distintas atmósferas químicas, representadas por los dopantes en la fase móvil y las reacciones que compiten en el proceso de ionización. Este comportamiento ocurre como consecuencia de propiedades intrínsecas de las moléculas, tanto energéticas como estructurales, a tal punto que las mismas pueden modelarse a partir de los porcentajes de los iones formados en condiciones de nebulización, impacto y detección prefijados, para toda la familia de compuestos analizados.

En este análisis se desarrollan modelos tipo QSPR y QSAR, para las distintas HE utilizando como descriptores moleculares a las distribuciones iónicas de cada uno de ellas. Tal como fuera el caso de los HAPs, una distribución de concentraciones (indirectamente representada, en este caso, por los iones formados a partir de una masa de analito) es capaz de representar el comportamiento de distintas propiedades físicas y biológicas.

Extrapolando estas observaciones puede proponerse a la espectrometría de masas, para una misma familia y bajo las mismas condiciones separativas y de detección, como una herramienta predictiva de propiedades fisicoquímicas y biológicas.