

4.1-INTRODUCCIÓN

4.1.1-Características de la molécula. Importancia toxicológica.

La cipermetrina pertenece al grupo de los piretroides sintéticos, su nombre IUPAC es Carboxilato de RS-9-alfa-ciano-3-fenoxibenzil (1RS)cis-trans-3-(2,2-diclorovinil)-2,2-dimetil-ciclopropano. Cipermetrina es su nombre ISO para el compuesto racémico de ocho estereoisómeros, donde las relaciones de isómeros *cis-trans* varían de 50:50 a 40:60. En la Figura 4.1.1 se presenta la molécula general de cipermetrina. En la Tabla 4.1.1.1 se presentan algunas propiedades fisicoquímicas de relevancia ambiental para este compuesto, conjuntamente en la Tabla 4.1.1.2 se muestran toxicidades para distintos organismos.

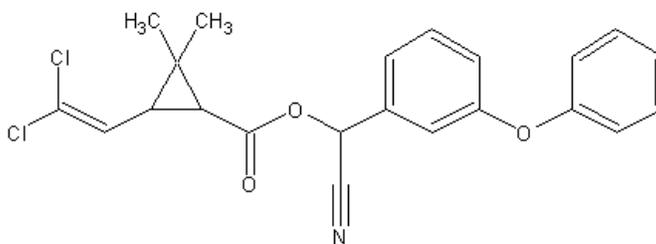


Figura 4.1.1.1: molécula de cipermetrina, en términos generales, sin diferenciación de isómeros cis-trans.

Desde el punto de vista toxicológico, tanto en los organismos vertebrados como en los invertebrados, la cipermetrina actúa principalmente sobre el sistema nervioso. Es considerada tanto un veneno de contacto como de ingestión (Jin y Webster, 1998). Se ha demostrado que este compuesto inhibe las enzimas ATPasa que intervienen en el movimiento de los iones en contra de un gradiente de concentración, regulados por el transporte activo.

Tabla 4.1.1.1: Propiedades fisicoquímicas de interés ambiental para Cipermetrina.

Propiedad	Valor
Fórmula Molecular ^a	C ₂₂ H ₁₉ O ₃ NC ₁₂
Peso Molecular ^b	416,3
Solubilidad en agua (a 200 °C) ^a	4 ppb (µg/litro)
Presión de Vapor (a 200 °C) ^a	1,3x10 ⁻⁹ mmHg
Constante de Henry (promedio de 3 pH's a 200 °C) ^a	2,5x10 ⁻⁷ atm·m ³ /mol
Vida media por hidrólisis ^b	>50 días
Coefficiente de partición octanol-agua (Kow) ^a	3,98x10 ⁶
Coefficiente de adsorción en suelos (Koc) (promedio de 5 tipos de suelo) ^c	6,1x10 ⁴ mL/g o cm ³ /g

a) Kollman and Segawa (1995); b) Walker y Keith (1992); c) USDA Agricultural Research Service (1995). Las unidades reportadas en las Tabla 4.1.1.1 corresponden a las mostradas en las literaturas de origen

Esta acción es especialmente crítica para peces e insectos acuáticos, donde las enzimas ATPasas proporcionan la energía necesaria para el transporte activo y son muy importantes en los sitios de intercambio de oxígeno. Esta acción posiblemente afecte tanto el movimiento como la capacidad de mantener el equilibrio de iones, por lo que las superficies respiratorias son perturbadas, lo que indicaría que la cipermetrina es inherentemente más tóxica para los organismos acuáticos respecto a otros (Siegfried, 1993). Esta consecuencia se refleja en los valores de dosis letales que afectan al 50% de la población (DL50), citados en la Tabla 4.1.1.2, donde para especies terrestres como ratas, patos o pollos los valores están en el orden porcentual (10.000ppm=1%), mientras que en el caso de especies acuáticas las concentraciones letales del medio que afectan al 50% de la población (CL50), como por ejemplo las truchas, caen al orden de la ppb (1ppb=0,001ppm=μg/litro).

Tabla 4.1.1.2: valores de DL50 para distintas especies terrestres y CL50 para distintas especies acuáticas.

Especie	Sensibilidad
Rata (oral, agudo) ^a	DL50 247 mg/kg (machos) DL50 309 mg/kg (hembras)
Pato Mallard (oral, agudo) ^b	DL50 > 10.000 mg/kg
Pollos (oral, agudo) ^b	DL50 > 2000 mg/kg
Pato Mallard y Codorniz Bobwhite (oral) ^a	CL50>20.000 ppm
Trucha marrón (96 hrs) ^b	CL50 2,0-2,8 ppb
Trucha arco iris (96 hrs) ^b	CL50 0,82 ppb
Perca (96 hrs) ^b	CL50 1,78 ppm
Pejerreyes (96 hrs) ^d	CL50 0,0002 mg/L
Daphnia magna ^a	CL50 0,26 ppb
Abejas ^c	DL50 0,025 μg/abeja

a) Walker y Keith (1992); b) The Agrochemicals Handbook, Third Edition (1991); c) Delabie et al., (1985); d) Carriquiriborde y Ronco, 2006. Las unidades reportadas en las Tabla 4.1.1.2 corresponden a las mostradas en las literaturas de origen.

4.1.2-Relevancia ambiental de cipermetrina en nuestro país. Estudios regionales

La producción de soja es uno de los pilares de la economía argentina. Durante los últimos 25 años el crecimiento del área sembrada se amplió desde 1,9 millones de hectáreas (campana 1980/81), a 17,0 millones de hectáreas relevadas en diciembre de 2008, con un proyectado de 17,8 para el presente año (Dirección de Coordinación de Delegaciones de la SAGPyA, Nación). Esto trae la consecuente demanda de distintos pesticidas, alcanzando el uso de 500.000 Kg/año del insecticida cipermetrina, más del 50 % del volumen total utilizado (Pengue, 2000). Este piretroide adquiere una relevancia ambiental propia y por lo tanto demanda el desarrollo de distintos tipos de herramientas que apunten a su monitoreo químico y biológico (Martin et al., 2003; Natale et al., 2003; Peruzzo et al., 2003; Marino et al., 2004).

En la región pampásica existen diversos estudios dirigidos a evaluar los niveles de cipermetrina tanto en cuerpos de aguas superficiales como en suelos y sedimentos (Peruzzo et al., 2003; Marino et al., 2004), también se publican resultados de efectos de este piretroide sobre especies no blanco como son anuros autóctonos (Natale et al., 2003), peces (Carrquiriborde et al., 2006, 2007) y flora riparia y acuática (Martín et al., 2003; Martín y Ronco, 2006).

4.1.3-Antecedentes ecotoxicológicos.

La exploración entre la composición de un biofluido y la información toxicológica de un compuesto, en relación a su presencia o ausencia en el ambiente, genera información asociada a los biomarcadores de toxicidad-exposición (McCarthy and Shugart, 1990; Galloway et al., 2004). Tal como se mencionara anteriormente, los piretroides son particularmente tóxicos para los peces en comparación a los mamíferos, debido a que el sistema de detoxificación de los primeros es menos eficiente y la principal vía de eliminación de los piretroides en los peces es a través de la bilis (Glicman et al., 1982; Edwards y Millburn, 1985). En este contexto se registran estudios de respuestas fisiológicas a cipermetrina en algunas especies de peces (Edwards et al., 1987; Davies et al., 1994) y de los posibles metabolitos de excreción por técnicas analíticas convencionales (Jin and Wedster, 1998). Por otro lado la bilis y el plasma han sido utilizados en estudios ecotoxicológicos para la evaluación de biomarcadores, ya que las respuestas de los metabolitos que contienen (perfil metabólico), han demostrado ser efectivas para evaluar el efecto de diferentes tipos de contaminantes (Leonard and Hellou, 2001; Hecker et al., 2002; Gibson et al., 2005a; Gibson et al., 2005b).

Edwards et al. (1987), publican un trabajo referido a la toxicidad y metabolismo de cipermetrina (isómeros *cis* y *trans*), en *Salmo gairdneri*, por caracterización de metabolitos presentes en la bilis (Figura 4.1.3.1), productos de la biotransformación de este piretroide. Se informan toxicidades similares para ambos isómeros, además de observar que el metabolito mayoritario, detectado en este biofluido, resultó ser el glucurónido derivado de la cipermetrina-OH (compuesto **2**, Figura 4.1.3.1)

Tabla 4.1.3.1: Estudios ecotoxicológicos realizados con Pejerreyes. Según lo reportan Carriquiriborde y Ronco (2006).

Respuestas	Descripcion	Metales				Orgánicos			
		Cd	Cr	Cu	Hg	Cip	Clp	End	Glf
Respuestas letales	Sensibilidad y Toxicidad relativa a sustancias químicas	*	*	*	*	*	#	#	*
	Dosis-respuesta y tiempo-efecto	*	*	*	*	*			
	Dependencia de la toxicidad con la composición química del agua	*	*	*	#	*			
	Dependencia de la toxicidad con la edad de los organismos	*	*	*	#				
Respuestas subletales	Toxicocinética	*	*						
	Citotoxicidad	*	*						
	Genotoxicidad	*	*	#					

Notas: *Corresponde a estudios terminados, #Corresponde a estudios en curso. Cip=cipermetrina, Clp=clorpirifos, End= endosulfán, Glf=glifosato.

En este sentido los pejerreyes (*Odontesthes bonariensis*, Pisces Atherinopsidae) ha demostrado ser un organismo sensible a distintos tipos de contaminantes, siendo utilizados en distintas evaluaciones ecotoxicológicas (Carriquiriborde y Ronco, 2006) (Tabla 4.1.3.1). Asimismo existen estudios que muestran la influencia de la cipermetrina, asociada a su empleo en sistemas de cultivo de siembra directa, sobre las poblaciones de peces autóctonos de los cuerpos de agua próximos a los campos de cultivo (Carriquiriborde et al., 2007). De estos antecedentes se desprende que una buena aproximación sería estudiar los biofluidos de pejerreyes en función de la exposición a cipermetrina, como una herramienta de diagnóstico ambiental regional.

4.1.4-Antecedentes químicos y computacionales aplicados a estudios metabólicos.

En los últimos veinte años con el desarrollo de instrumentos de alta prestación, y más específicamente de la espectrometría de masas, se abre un gran campo de estudio aplicado a la investigación y elucidación de estructuras químicas de moléculas de interés biológico (Covey, 1985; Verbeck et al., 2002; Hsieh, 2006). Posteriormente, con la incorporación de sistemas informáticos aplicados al manejo de los datos espectrométricos (iones formados, intensidad y tiempo de retención cromatográfico), se amplían las posibilidades para la detección de compuestos traza, lo que constituye una herramienta muy interesante para el estudio de metabolitos tanto de interés farmacológico como ecotoxicológico (Wang et al.,

2005; Wilson et al., 2005; B'Hymer and Cheever, 2008). Los espectrómetros de masas combinados con distintos sistemas separativos se han aplicado a estudios metabólicos en la opción de cromatografía gaseosa (Jonsson et al., 2004; Xin et al., 2007; Ralston-Hooper et al., 2008), líquida de alta resolución, HPLC (Wilson et al., 2005; Wang et al., 2005; Lu et al., 2008) y líquida de ultra alta resolución, UPLC (Nordström et al., 2006; Bruce et al., 2008; Li et al., 2008).

Cis y trans

Cipermetrina

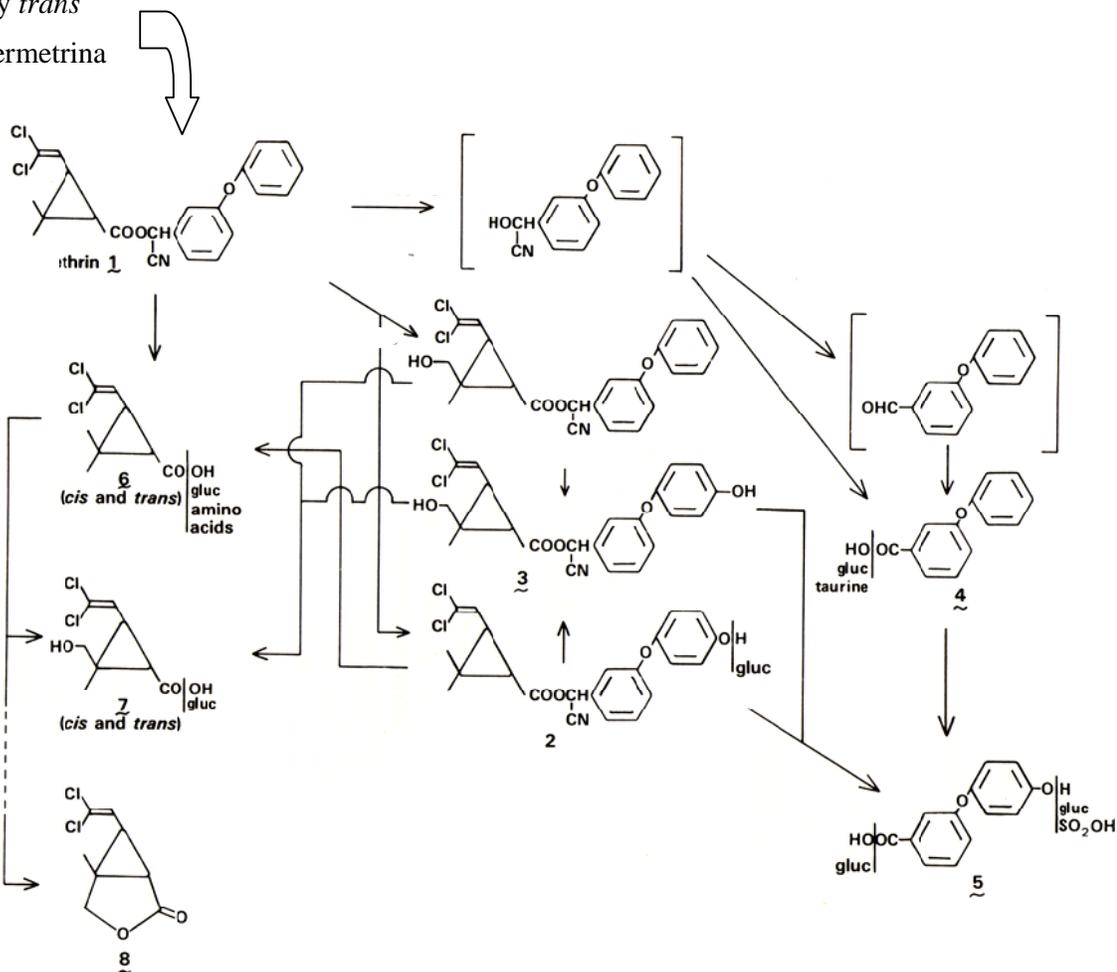


Figura 4.1.3.1: metabolitos de biotransformación de cipermetrina en bilis de *Salmo gairdneri*, reportados por Edwards et al., 1987. Glucurónido 2, compuesto mayoritario.

La aplicación simultánea de una técnica cromatográfica y una detección tipo MS o una RMN genera conjuntos de datos compuestos por tiempos de retención y espectros de MS o UV (en el caso de acoplar un detector DAD al sistema separativo), o corrimiento químico y espectros de RMN. Una evaluación rigurosa de diferencias metabólicas causadas por la exposición, requiere el uso de estadística tipo análisis multivariado (Choi et al., 2005) y algoritmos cognitivos. Métodos como Análisis de componentes principales (PCA) (Jackson,

1992) o Análisis de Discriminates-Cuadrados Mínimos Parciales (PLS-DA) (Wold et al., 1984; Wold et al., 2001) o Cuadrados Mínimos Parciales Ortogonales (OPLS) (Wiklund et al., 2008), pueden ser usados para clasificar los espectros obtenidos en función del tóxico y la dosis. También, métodos basados en chemometría permiten evaluar un espacio metabólico multidimensional, para una mejor clasificación y comparación entre organismos expuestos y no expuestos (Duart et al., 2001; Lord, 2004; Broekling et al., 2006; Want et al., 2007). En la actualidad existen Softwares de libre disponibilidad para el análisis de datos tanto para RMN o MS (Nordström et al., 2006; Smith et al., 2006; Benton et al., 2008). En los casos donde es necesario conocer en forma precisa la presencia o ausencia de metabolitos parentales de algún compuesto, en especial las estrategias instrumentales, apuntan a su detección y cuantificación (Du et al., 2004; Carriquiriborde et al., 2007; B'Hymer et al., 2008; Sabatini et al., 2008). Para tal caso es necesario contar con información de tipo estructural, energético y químico-mecanístico aplicados a la elucidación de la estructura y la identidad del compuesto (Varmuza et al., 1997). Para tal objetivo se suelen aplicar herramientas de la química teórica y computacional, donde se modelan las moléculas estudiadas, se optimizan sus estructuras y se evalúan parámetros energéticos característicos por alguna de las metodologías existentes tipo, *Ab initio*, Métodos Semienpíricos, Funcional de la Densidad o Mecánica molecular (Roncaglioni et al., 2004; Barone et al., 2007).

4.1.5-Objetivos e Hipótesis de trabajo.

En función de los antecedentes presentados se proponen los siguientes objetivos de trabajo:

- a) Desarrollar una técnica analítica que permita cuantificar cipermetrina en distintas matrices ambientales y distintos tipos de tejidos biológicos con buenos niveles de sensibilidad.
- b) Caracterizar la presencia/ausencia de cipermetrina en distintos órganos en peces (*Pejerreyes-Odonthestes bonariensis*) expuestos al insecticida.
- c) Identificar y caracterizar estructuralmente metabolitos derivados de la exposición a cipermetrina por HPLC, detección masa mediante la aplicación de programas computacionales de cálculo, en peces expuestos, para ser usados como biomarcadores.

Los mismos se sustentan en las siguientes hipótesis:

- *Los peces expuestos a cipermetrina tienen una respuesta endógena tal que les permite biotransformarla químicamente para su excreción, con una consecuente alteración en las concentraciones de moléculas fisiológicamente relevantes como proteínas, aminoácidos y derivados.*

- *La aplicación de programas estadísticos-computacionales favorece la identificación inequívoca de las especies químicas formadas en el proceso de detoxificación para su potencial uso como biomarcador de exposición.*

4.2-METODOLOGÍA

4.2.1-Caracterización espectrométrica de la Cipermetrina

4.2.1.1-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),
- Éter etílico, grado pesticida, marca J.T.Beaker (New Jersey, EEUU).
- Diclorometano (CH₂Cl₂), para análisis, Merck (Merck KGaA, Darmstadt, Germany).
- Hidróxido de Amonio(NH₄OH), para análisis Merck (Merck KGaA, Darmstadt, Germany)
- Ácido acético (HAc), para análisis, J.T.Beaker (New Jersey, EEUU)
- HCl, para análisis, marca J.T.Beaker (New Jersey, EEUU).
- Cipermetrina (mezcla racémica), estándar secundario, valorado contra patrón primario ChemService (P=99%).

4.2.1.2-Equipamiento.

Independientemente de las condiciones separativas, que se presentaran en cada caso, los estudios fueron realizados con una columna separativa de C₁₈, marca Agilent®, 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 es realizado 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 Metler, (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.

4.2.1.3-Optimización de las condiciones de separación y detección.

Una solución nominal de 100 ppm de cipermetrina es inyectada en el sistema separativo utilizando como fase móvil 85:15 de ACN: Agua (0,5% NH₄Ac pH=4, preparado a partir de HAc y NH₄OH, para lo cual el NH₄OH se agrega a 1 litro de agua calidad HPLC, y se ajusta el pH hasta el valor de 4 con HAc), en modo isocrático a 0,8 ml/min utilizando como fuente de ionización ESI y APCI.

Se exploran distintas opciones de detección en función de energía de ionización, de presiones de nebulización, modos positivo y negativo de trabajo. Se evalúan distintas fases móviles y flujos de elución. Con las condiciones optimizadas de la técnica se determina la linealidad del método y el límite de detección, a partir de los iones medidos, por programación de un Monitoreo de Ion Selectivo (SIM).

4.2.2-Exposición de Peces a Cipermetrina.

Se trabaja con dos grupos de cinco Pejerreyes adultos cada uno, seis individuos son expuestos a concentraciones de 0,5 ppb (µg/l de agua) de cipermetrina en agua reconstituída (USEPA, 2001, 2003) mientras que los cuatro restantes se mantienen en las mismas condiciones experimentales pero sin el agregado del piretroide. Transcurridas seis horas se apartan tres ejemplares expuestos y 2 no expuestos, los demás se dejan hasta cumplir el tiempo de ensayo de 24 horas. En cada muestreo los ejemplares son sacrificados separándose el hígado, el cerebro, la bilis, plasma sanguíneo y tejido. *Este trabajo fue realizado por el Dr. Pedro Carriquiriborde.*

4.2.2.1- Transporte de Cipermetrina en peces expuestos.

Los distintos componentes sólidos son unificados (los hígados, los cerebros y las branquias, de los distintos ejemplares expuestos), triturados y extraídos con tres contactos sucesivos de diclorometano, por sonicación, los extractos son tratados con sulfato de sodio y llevados a sequedad en corriente de nitrógeno. Los fluidos biológicos (bilis, unificadas entre los distintos ejemplares) son acidificados con HCl al 10% v/v y extraídos con tres contactos de diclorometano, por agitación en vortex; siguiendo a continuación los mismos pasos metodológicos que en el caso de los tejidos. Luego las muestras son resuspendidas en 0,2 ml de fase móvil (ACN:H₂O, 85:15), para ser inyectadas en el sistema cromatográfico. Conjuntamente se realizan ensayos de recuperación sobre las distintas matrices (Ecuación 3.2.1.4.5). No se realizan cuantificaciones, solo se obtienen resultados, presente/ausente.

4.2.2.2-Metabolitos de cipermetrina en bilis.

La bilis es extraída siguiendo el protocolo de Edwards et al. (1987), donde un volumen de bilis se diluye 20 veces con agua destilada y se ajusta a pH=2 con HCl 0,1M. Luego se extrae con tres contactos de éter etílico (2 Volúmenes), los extractos son llevados a sequedad en corriente de N₂ y resuspendidos en 0,2 ml de fase móvil. Las corridas cromatográficas se realizan en las condiciones detalladas en la tabla 4.2.2.2.1, con las fuentes ESI y APCI.

También se analizan muestras de bilis extraídas, sin acidificar, es decir donde la dilución inicial se realiza solo con agua destilada y con bilis pura, sin pre-extraer.

Tabla 4.2.2.2.1: Condiciones instrumentales para el la exploración de metabolitos de cipermetrina en bilis de pejerreyes.

Equipamiento	Condiciones
	<i>Separación</i>
Columna separativa	C ₁₈ de 15 cm×4,6 mm de Ø
Fase móvil	ACN : H ₂ O (0,5 % NH ₄ Ac, preparado tal como se describió anteriormente). Gradiente 30:70 durante 3 minutos, luego lineal hasta 100:0 en 20 minutos.
Flujo	0,8 ml/min
Inyección-Loop	20µL
	<i>Detección</i>
Fuente de ionización	ESI-modo SCAN positivo
Flujo gas nebulizante	10 l/min (40 Psig)
Temperatura	330°C
Energía de fuente	120 eV

La utilización de un gradiente es apropiado para eluir de la columna, con un alto porcentaje de agua, las sales biliares, para luego separar los distintos compuestos orgánicos presentes en la matriz, sin interferencias de estos componentes mayoritarios de la bilis.

4.2.3-Aplicaciones de herramientas computacionales para la identificación de metabolitos.

En la observación de los cromatogramas de salida del detector de masas, que usa un analista, se tienen los ejes del tiempo de retención y de intensidad del ión, también pueden obtenerse los espectros de masas de los picos detectados. Esto en realidad constituye un sistema de tres coordenadas: tiempo, intensidad y tipo de ión (Figura 4.2.3.1). Los distintos resultados están en función del plano de corte que se utilice de esta terna de datos, por

ejemplo si un plano a corta al eje tiempo, se obtiene el espectro de masas, que no es otra cosa que pares numéricos (intensidad, ión) (Figura 4.2.3.1).

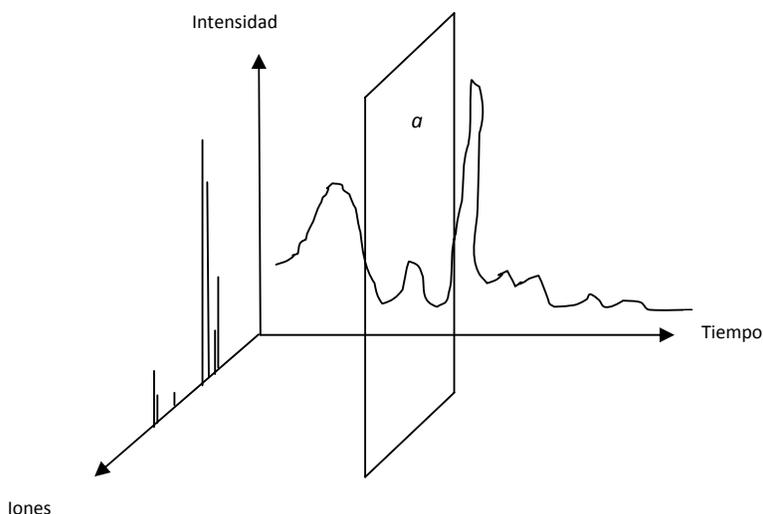


Figura 4.2.3.1: terna de datos recolectada por el programa ChemStations, a partir de las detecciones del espectrómetro de masas.

Por lo tanto cuando un analista cuantifica un compuesto por el área bajo un pico, lo hace en base al plano intensidad-tiempo y cuando obtiene un espectro de masas lo hace en el plano intensidad-Iones.

Para el estudio de los metabolitos de exposición de cipermetrina se trabaja con el conjunto completo de valores intensidad/tiempo/iones, los mismos son exportados en formato (**.AIA) a partir del archivo original (**.D) del programa cromatográfico, para cada una de las muestras analizadas. Seguidamente estos conjuntos de valores son procesados con el módulo *ad on XCMS* del programa *R* (*The R Project for Statistical Computing*, <http://www.r-project.org/>). En este procedimiento los iones son agrupados por categorías espectrales de pertenencia, luego se corrigen los tiempos de retención de todos los iones por posibles desplazamientos, propios del sistema separativo y se llenan los “huecos iónicos” tal que los datos de cada muestra tengan un mismo número (n), con datos cromatográficos agrupados, alineados y completos, se analizan aquellos iones que cambian su intensidad en relación expuesto/no expuesto por mas 10 veces.

Las salidas del programa *XCMS* (**.txt), son levantadas en planillas de Excel para se exploradas con el programa *XLStat*, por análisis de componentes principales donde la *variable no métrica* es pez expuesto/no expuesto y las variables métricas lo constituyen las intensidades iónicas, para cada ion. A partir de la información de los factores (F) del ACP, según los criterios del ítem 2.5.2 del capítulo II, se tendrán los iones con más peso en cada grupo y su posible relación con los metabolitos generados en los procesos de biotransformación.

4.3-RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

4.3.1-*Caracterización de las cipermetrina por espectrometría de masas.*

La utilización de NH_4Ac pH=4, como dopante de la fase móvil se basa en normas preexistentes (Shell, 1975) donde la molécula de cipermetrina mejora su comportamiento en la columna a partir de un entorno iónico apropiado (efecto del par iónico).

La detección realizada con la fuente de APCI, en modo negativo, fue evaluada en las energías de fragmentación de 50, 70, 100 y 150 eV, los resultados muestran que la molécula de cipermetrina se rompe en la unión éster que presenta, aún a energías de fragmentación bajas, como 50 eV. Esta fragmentación se asocia a la pérdida de la fracción aromática junto al grupo ciano, también se observa la relación de iones característica de moléculas conteniendo cloro ($m/z=206,5$; $m/z=208,5$), por la abundancia isotópica $^{35}\text{Cl}/^{37}\text{Cl}$ presente en la naturaleza (McLaffarty, 1993) (Figura 4.3.1.1-a,b). La intensidad de los iones formados es muy dependiente de la energía del instrumento tal como puede verse por la comparación de los cromatogramas en la figura 4.3.1.2, al punto que, a 150eV, los picos cromatográficos prácticamente no se detectan.

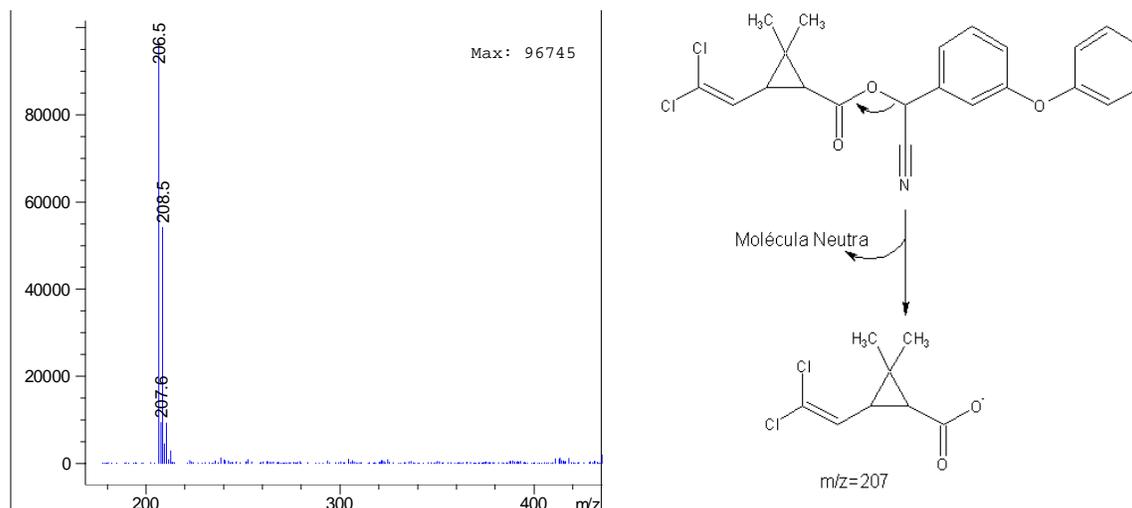


Figura 4.3.1.1: a) espectro de masas para cipermetrina detectada con fuente APCI en modo negativo. b) ruptura propuesta de la molécula de cipermetrina para el ion base 207 con ^{35}Cl .

En el modo positivo de detección de APCI, solo a 100 eV se obtiene una detección baja, comparada con los resultados en modo negativo para una misma concentración del analito, a las otras energías de detección la molécula directamente no se detecta.(Figura 4.3.1.3)

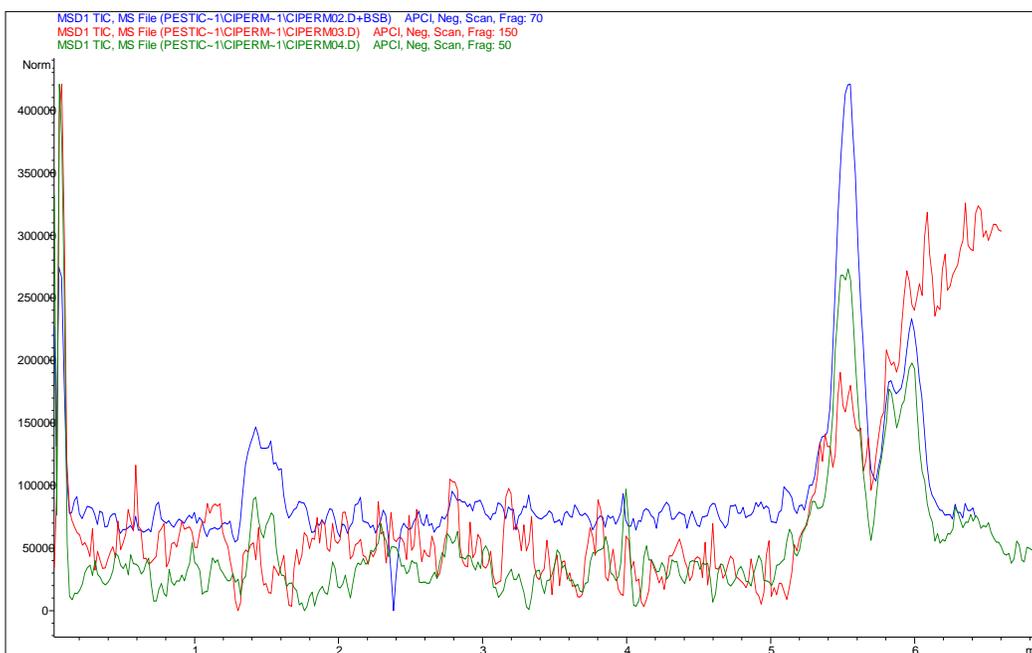


Figura 4.3.1.2: comparación de cromatogramas de cipermetrina, en función de las distintas energías de fragmentación para fuente APCI. En rojo 150ev, verde 50eV y azul 70ev.

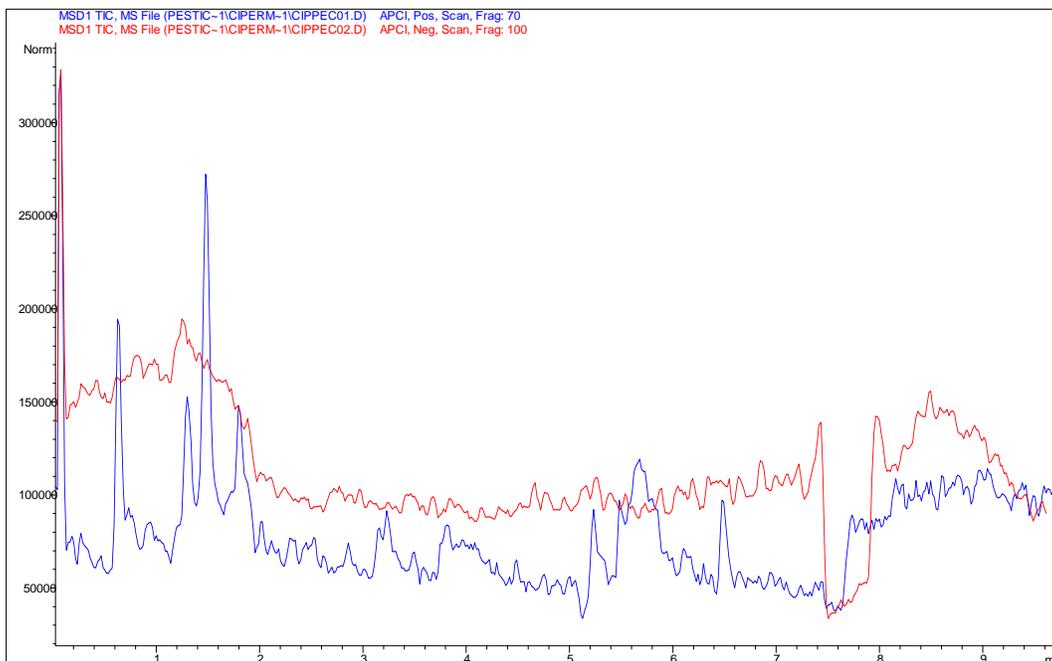


Figura 4.3.1.3: cromatogramas de cipermetrina obtenidos con fuente APCI en modo positivo a distintas energías de fragmentación.

La utilización de la fuente ESI, en el modo negativo de detección, comparado con el positivo, produce resultados menos favorables. A 70eV; en el modo positivo se detecta la cipermetrina mientras que en modo negativo no se observa la aparición de picos cromatográficos (Figura 4.3.1.4), esto se corresponde con la atmósfera iónica de la molécula y las características de la fuente. La ESI tiene menos posibilidades de fragmentación, a

diferencia de la APCI, donde la molécula llega a la cámara en estado gaseoso, en un ambiente químico, similar al que se da en un espectrómetro de masas acoplado a un cromatógrafo gaseoso (Niessen et al., 1999). Mayormente la detección de iones asociados a la ESI se da por las asociaciones moleculares relacionadas con la fase móvil, tal como se observó para el caso de los esteroides. En comparación con las fuentes también se produce un desplazamiento de los tiempos de retención producto de los volúmenes muertos de cada una.

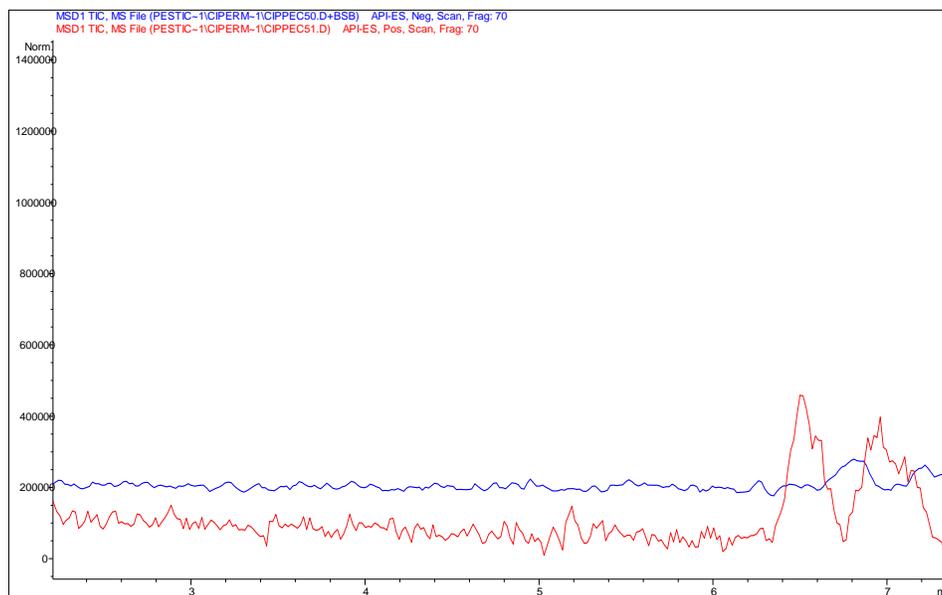


Figura 4.3.1.4: cromatogramas obtenidos con fuente ESI a 70 eV, en modo negativo (azul) y positivo (rojo).

Cuando se analiza el espectro de masas, mostrado en la figura 4.3.1.5, de la fuente ESI positivo, se tienen los iones 433 y 435, los mismos corresponden a $[M+NH_4]^+$, ya que los isótopos de menor masa de cada especie química ^{12}C , 1H , ^{14}N y ^{35}Cl , tienen una masa de 415 umas, al sumarle 18 umas del ion $[NH_4]^+$, da el valor de 433 umas. Si se consideran los isótopos de ^{37}Cl se obtiene el ión 435 umas, además aparece la adición de Na, $[M+Na]^+$, que se corresponde con una masa de 438 y 440 umas, para las distintas abundancias isotópicas del cloro, y de K con masa 454 y 456 umas, todos ellos con la abundancia de ^{13}C , consecuentemente se tienen los pares isotópicos ^{12}C y ^{35}Cl ; ^{13}C y ^{35}Cl , ^{12}C y ^{37}Cl , ^{13}C y ^{37}Cl .

Dadas las relaciones *componente orgánica:componente acuosa* de la fase móvil, donde existe un bajo contenido de agua, las condiciones de nebulización no son tan determinantes, como en el caso de los esteroides con una componente acuosa del 50%, los valores óptimos de análisis fueron logrados para 10 l/min, 40 psig como presión de nebulización y 330°C, como temperatura del gas de secado.

En función de los distintos parámetros evaluados, las condiciones analíticas fueron seteadas con los parámetros que se muestran en la Tabla 4.3.1.1.

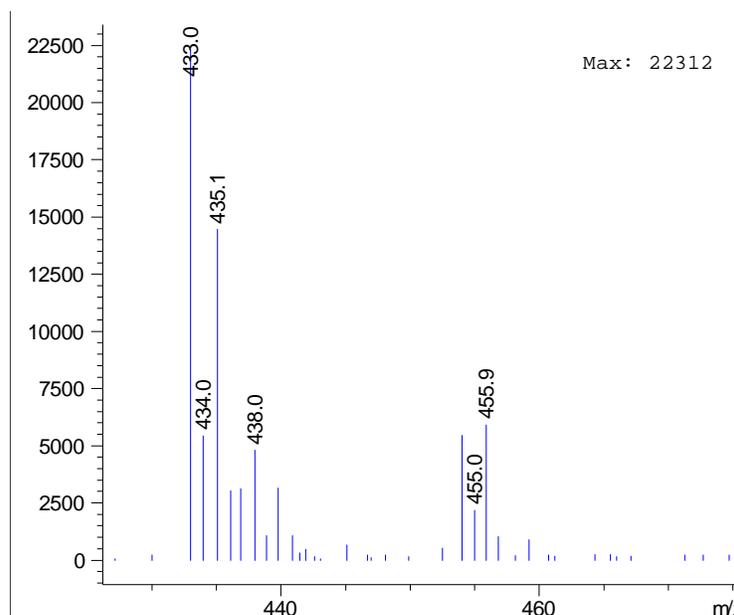


Figura 4.3.1.5: espectro de masas con la fuente ESI, en modo positivo.

Tabla 4.3.1.1: condiciones de análisis de cipermetrina por HPLC, detección Masa.

Equipamiento	Condiciones
	<i>Separación</i>
Columna separativa	C ₁₈ de 15 cm×4,6 mm de Ø
Fase móvil	ACN : H ₂ O (1 ml de NH ₄ OH _{concentrado} , ajustado a pH=4 con HAc _{concentrado}) 85:15, isocrático.
Flujo	0,8 ml/min
Inyección-Loop	20µL
	<i>Detección</i>
Fuente de ionización	ESI-modo SIM-positivo, ION 433.
Flujo gas nebulizante	7 l/min (40 Psi)
Temperatura	330°C
Energía de fuente	150 eV

Un cromatograma característico se muestra en la Figura 4.3.1.6. En la separación cromatográfica no se ha podido lograr unificar los estereoisómeros en un mismo pico cromatográfico, ni tampoco separar los cuatro diastereómeros, en las composiciones de fase móvil estudiadas se han obtenido tres picos cromatográficos. Esto hace que la masa del analito no sea contenida en una sola área, sino que se distribuya en tres picos cromatográficos, por lo que se espera que los límites de detección estén por debajo de los usualmente medidos para un compuesto por espectrometría de masas en modo SIM, tal como fuera el caso de los esteroides presentados en el Capítulo III. La simetría de los picos fue de 0,984, 1,263 y 0,701

y los ancho de picos respectivos resultaron 0,1826; 0,1345 y 0,1549 respectivamente, según muestra el reporte cromatográfico.

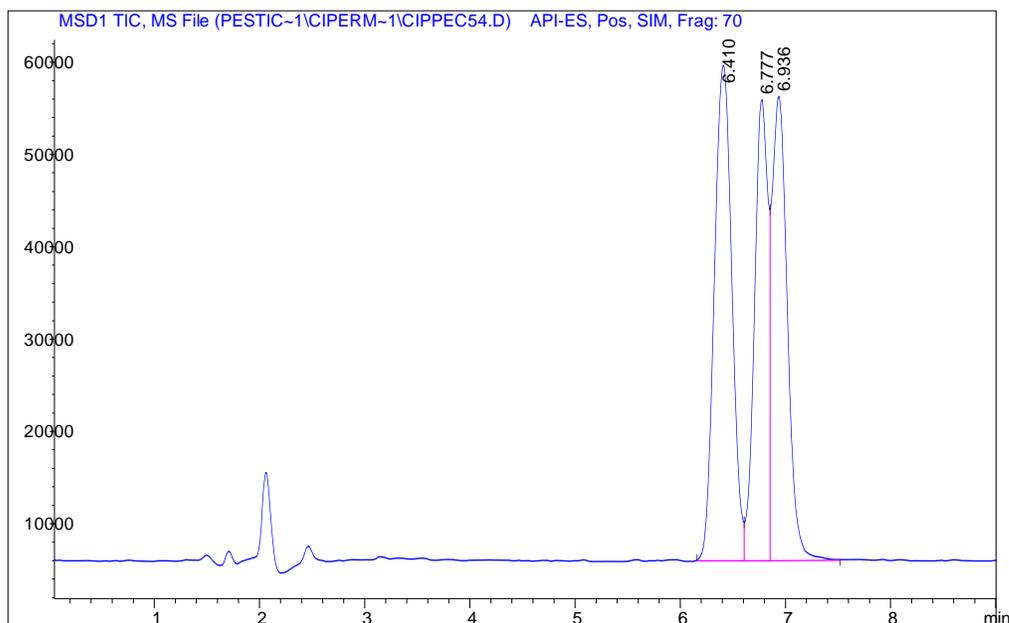


Figura 4.3.1.6: cromatograma característico de cipermetrina en las condiciones separativas y de detección de la Tabla 4.3.1.1, para la mezcla racémica.

4.3.2-Validación de la técnica analítica de cuantificación.

La linealidad de cipermetrina se evalúa hasta una concentración instrumental de 0,45 µg/ml. Para la construcción de la curva de linealidad se toma el área suma del grupo de picos de la Figura 4.3.1.6. Las áreas correspondientes a las soluciones ensayadas se muestran en la Tabla 4.3.2.1 y la curva resultante en la Figura 4.3.2.1

Tabla 4.3.1.6: relaciones de respuestas cromatográficas en función de la concentración.

Concentración (µg/ml)	Área (cuentas)
0	0
0,045	2649
0,09	4954
0,4525	24416

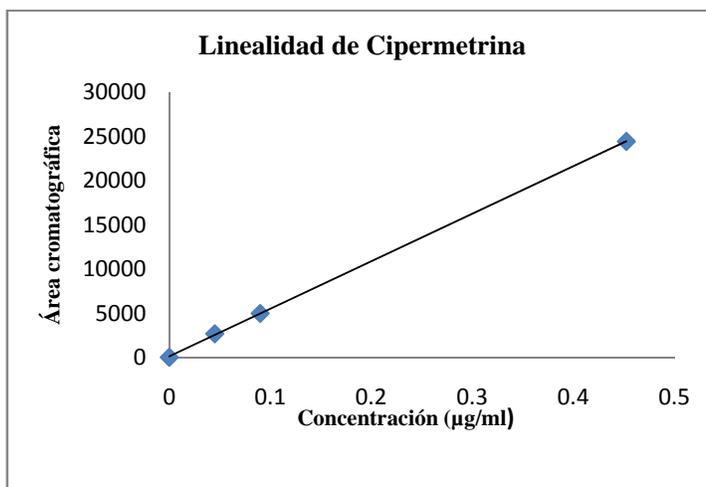


Figura 4.3.1.6: curva de linealidad de cipermetrina en las condiciones instrumentales de análisis.

La curva de linealidad resulta:

$$\text{Área} = (53520,6 \pm 232,7) \times \text{Concentración} + 191,9 \pm 62,3$$

$$r=0,99999 \quad F=52921,1$$

Los LD y LC, calculados según las ecuaciones 3.2.1.4.3 y 3.2.1.4.4, respectivamente son:

$$\text{LD}=0,004 \mu\text{g/ml}$$

$$\text{LC}=0,012 \mu\text{g/ml}$$

Una valoración exhaustiva de la técnica no es desarrollada, ya que la misma se utiliza a fines comparativos en los ítems siguientes, sin objetivos analíticos cuantitativos, aún así es necesario conocer la respuesta lineal del instrumento y los límites de detección.

4.3.3-Seguimiento de la cipermetrina en los distintos órganos de los peces.

Los distintos extractos orgánicos obtenidos a partir del procedimiento de pretratamiento detallado en el ítem 4.2.2.1, son analizados en modo SIM, en las condiciones instrumentales detalladas en la Tabla 4.3.1.1, para la detección de cipermetrina en cada una de ellas.

En la Figura 4.3.3.1 se muestran los cromatogramas de los hígados expuestos y no expuestos a las 6 horas y en la figura 4.3.3.2 son comparados con el perfil de un patrón de cipermetrina corrido en las mismas condiciones instrumentales. En ella puede observarse, en los órganos expuestos, un claro perfil del piretriode, ya que los tres picos del mismo y sus relaciones de área, hacen las veces de perfil característico.

Entre las bilis, expuestas y no expuestas, no se observan diferencias en cuanto a la presencia o no de cipermetrina (Figura 4.3.3.3) en este lapso de tiempo, por lo tanto esta por debajo del límite instrumental del equipo (sin factores de concentración, ya que el volumen final es el mismo que el volumen inicial de trabajo, ya que los volúmenes de bilis aportados por los peces no superaron los 0,8 ml). Para el caso de las branquias (Figura 4.3.3.4) no se detecta cipermetrina para los límites instrumentales, el cerebro expuesto muestra un comportamiento similar (Figura 4.3.3.5)

Los resultados para los peces expuestos durante 6 horas, muestran que la mayor cantidad de cipermetrina es detectada en el hígado, en acuerdo con lo reportado por Edwards et al. (1987), respecto a otros tejidos como el cerebro o las branquias, estas últimas resultan de interés para el estudio de pejerreyes a la exposición a metales como Cd, Cr y Cu (Carrquiriborde y Ronco, 2002), mientras que el cerebro contiene un alto contenido de materia grasa que puede interactuar con los compuestos lipofílicos (Katharios et al., 2004) aunque este no sea el caso de la cipermetrina. Los ensayos de recuperación de cipermetrina en los tejidos biológicos fue de $94,5 \pm 4\%$ ($n=3$) y en los fluidos de $96,1 \pm 5\%$ ($n=3$).

La cipermetrina como tal, luego de 24 horas de exposición, no es detectada en ninguno de los tejidos biológicos citados anteriormente ni en la bilis como tal.

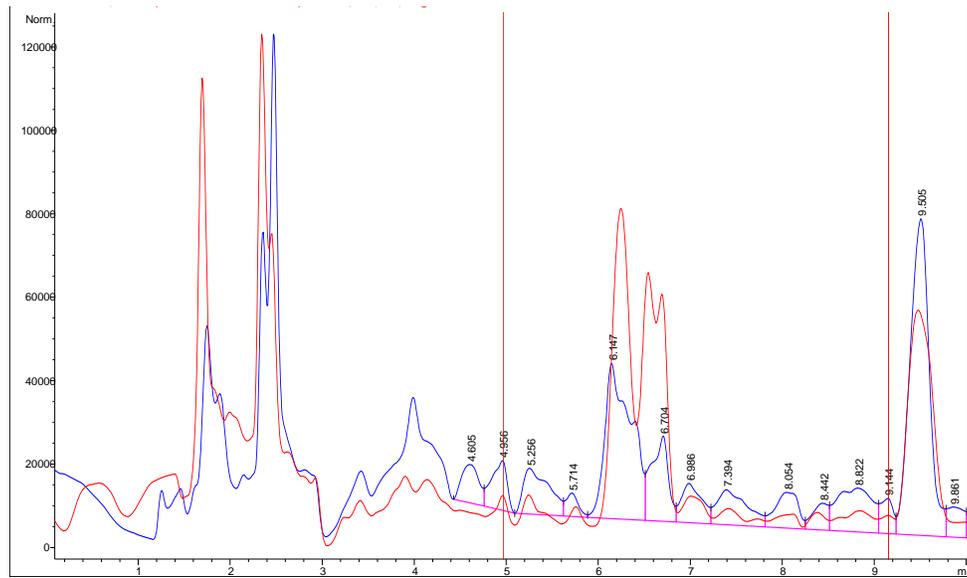


Figura 4.3.3.1: Hígados expuestos y no expuestos (Blanco) durante 6 horas.

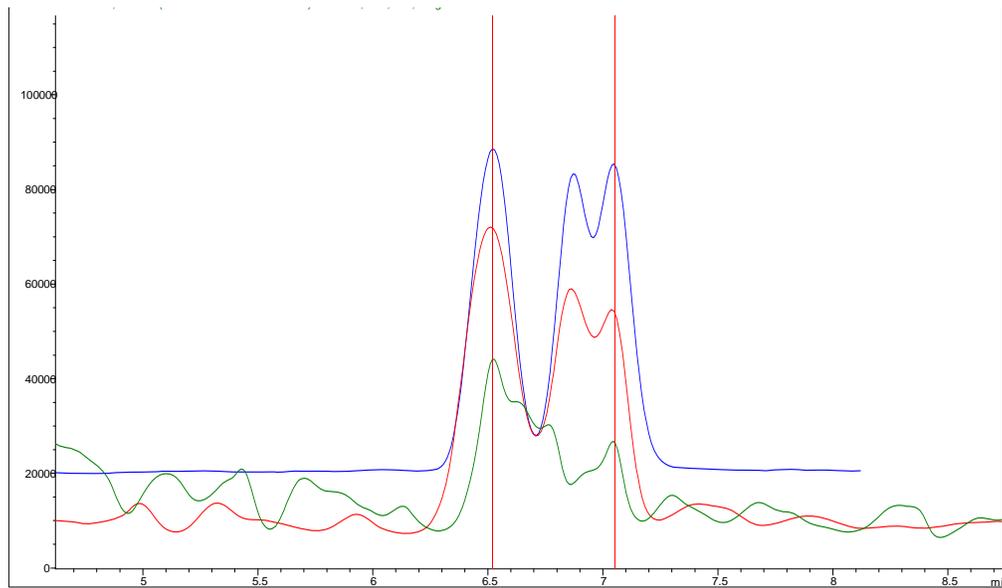


Figura 4.3.3.2: Hígados expuestos y no expuestos (Blanco) durante 6 horas, comparados con un patrón de cipermetrina (STD de ciper.)

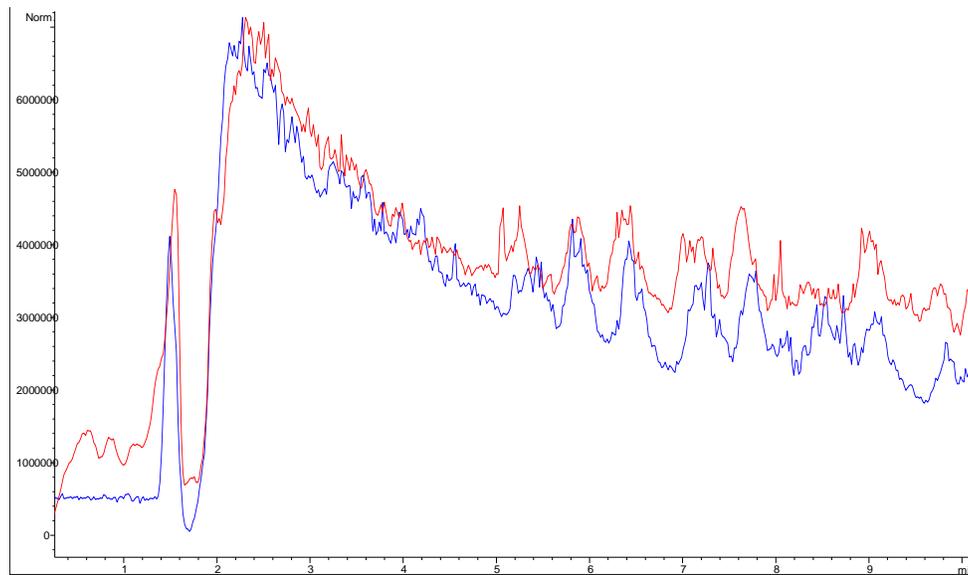


Figura 4.3.3.3: Bilis expuestas y no expuestas (Blanco) durante 6 horas.

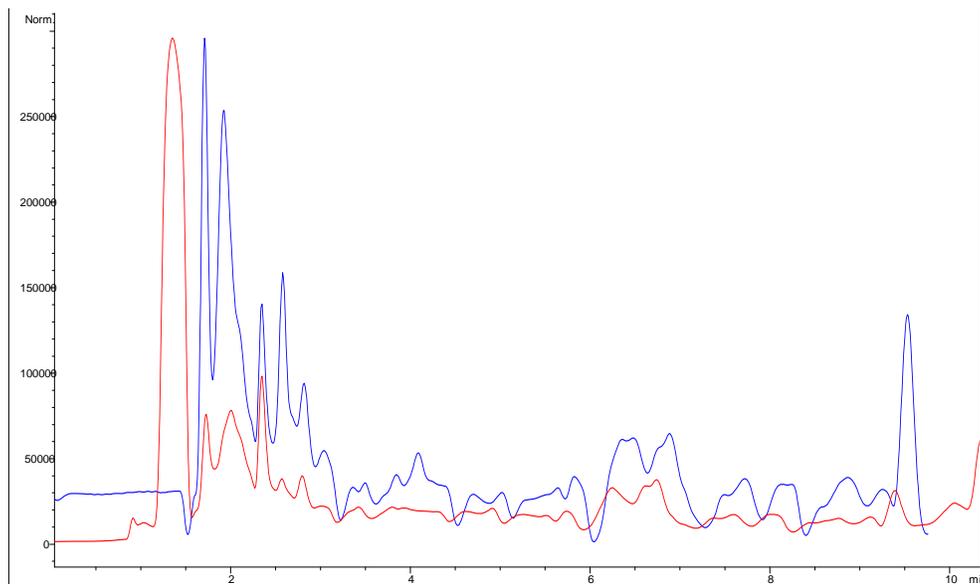


Figura 4.3.3.4: Branquias expuestas y no expuestas (Blanco) durante 6 horas.

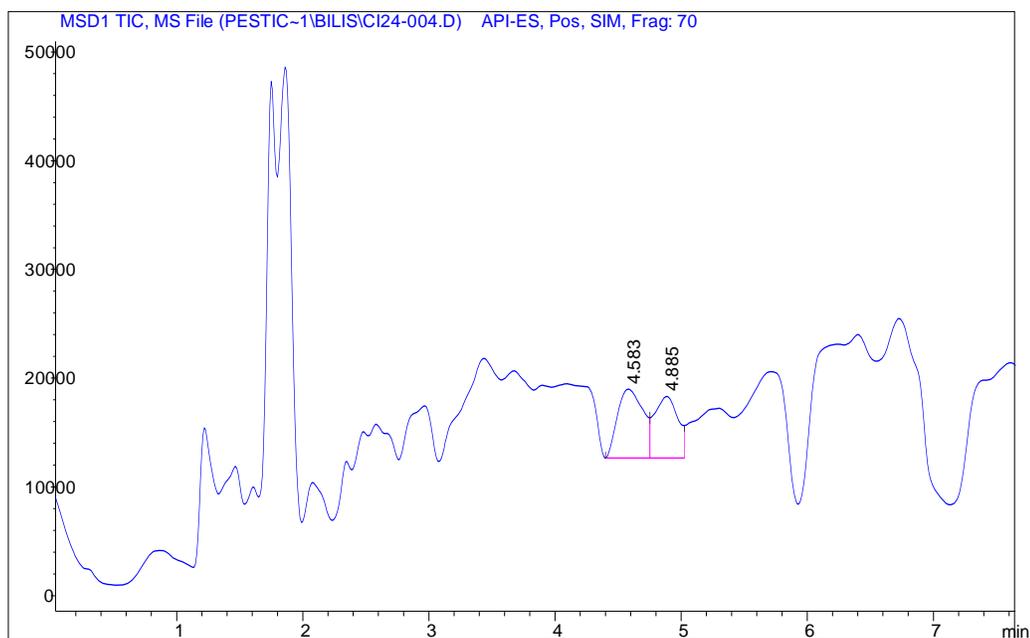


Figura 4.3.3.5: Cerebros expuestos y no expuestos (Blanco) durante 6 horas.

4.2.4- Caracterización de metabolitos de cipermetrina en bilis de pejerreyes.

En un primer paso se repiten las condiciones de extracción de bilis (de peces expuestos por 24 horas) propuestas por Edwards et al. (1987), donde la misma es diluida en medio ácido y extraída con éter etílico. Las inyecciones de estos extractos resuspendidos en fase móvil, en las condiciones instrumentales detalladas en la Tabla 4.2.2.2.1, para la fuente ESI en modo negativo, mostraron la aparición de 531 iones, en la Tabla 4.2.4.1 se muestran las mayores diferencias entre expuestos y no expuestos.

Tabla 4.2.4.1: iones que mayor diferencia de intensidades representan entre expuesto/no expuesto, para fuente ESI, modo negativo según XCMS.

Ion	t_r (segundos)	relación exp/no exp.
606	559	387,6
607	559	37,3
608	559	285,3
609	559	47,4

El hecho que los iones correspondan a un mismo tiempo de retención indica que son relacionados a una misma molécula, más aun en este caso dadas las diferencias de 2 unidades de masas entre ellas y la relevancia de los iones, indican que la molécula tiene cloro. Una comparación entre dos cromatogramas de uno de los peces expuestos y uno no expuesto se muestra en la Figura 4.2.4.1.

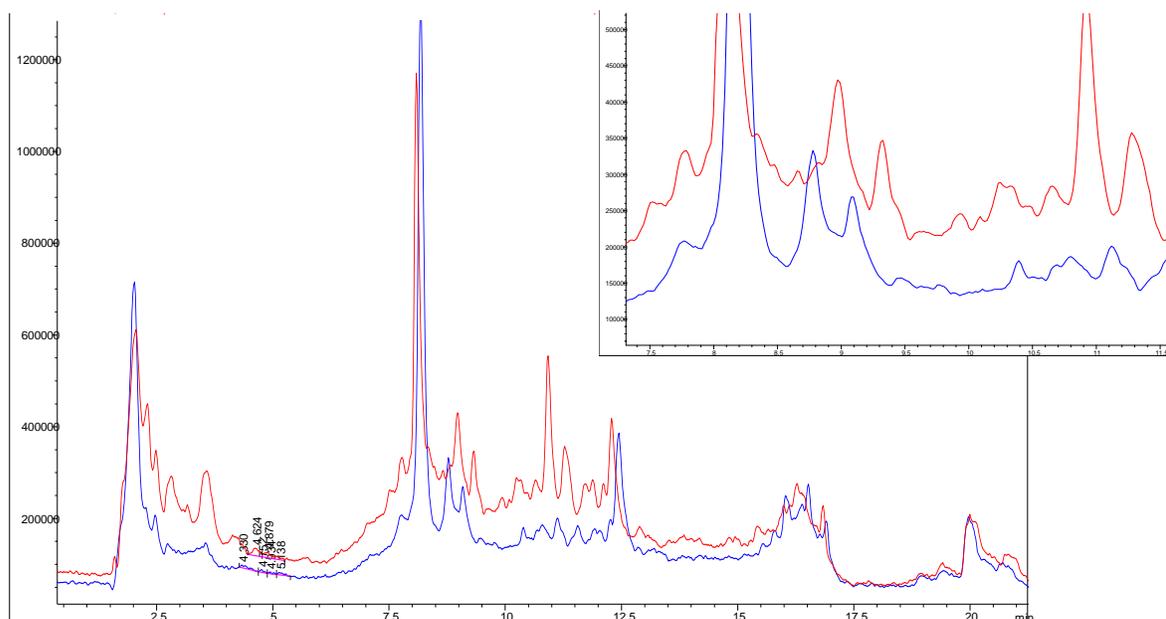


Figura 4.2.4.1: cromatograma de extractos de bilis de uno de los peces expuestos comparado con uno no expuesto, en modo SCAN negativo. En zoom se muestra el pico de intensidad relevante obtenido por exploración de la terna de datos.

Si sobre el mismo conjunto de datos se realiza un ACP, eliminando aquellos iones cuyo cociente de intensidades promedio esta en el rango 0,1-10, que corresponde a aquellos iones que se han deprimido más de diez veces o que se han exaltado más de diez veces, conforme a los criterios de la metabolómica (Smith et al., 2006; Benton et al., 2008). Estos resultados se muestran en la Tabla 4.2.4.2.

Tabla 4.2.4.2: análisis de componentes principales sobre el conjunto de datos con iones exaltados o deprimidos 10 veces entre las bilis provenientes de peces expuestos y no expuestos

Rótulo ión/tiempo	F1	F2
M959T657	0,885	-0,449
M699T600	0,145	0,976
M648T598	0,308	0,817
M704T558	0,991	0,081
M368T754	0,127	0,874
M171T203	0,206	0,966
M447T459	0,456	0,887
M609T560	0,987	-0,141
M722T560	0,962	-0,270
M607T559	0,998	-0,054
M720T559	0,999	-0,042
M606T559	0,996	-0,087
M608T559	0,996	-0,088

El ACP, a través de los pesos de los distintos iones, en el primer factor indica que los iones prevalentes están para el tiempo de retención de 558-600 segundos, es decir que corresponden a un espectro de masas de un pico en ese entorno de tiempo de retención cromatográfico, en acuerdo a lo obtenido con el programa *XCMS*. Incluso el ACP detecta iones que no son destacados por el *XCMS*, pero sobre los cuales no se pueden asignar estructuras definidas.

Una exploración manual del espectro punto a punto resultaría, no solo tediosa, sino también poco objetiva a la hora de comparar los espectros de masas, tal como muestran los cromatogramas de la figura 4.2.4.1, incluso aparecen picos, en la bilis de pejerreyes expuestos, que en realidad no corresponden a compuestos generados, sino mas bien a una depresión de metabolitos endógenos tal como muestra la figura 4.2.4.4, más aún si se tiene en cuenta que los iones obtenidos corresponden al promedio de muestras por triplicado, de alguna manera se esta contemplando la variabilidad de respuestas biológicas de los sistemas vivos, tanto de los expuestos como de los blancos. En la Figura 4.2.4.2 se muestra un espectro de masas del pico de tiempo de retención 599 segundos, explorado a partir de la información de la tabla 4.2.4.1.

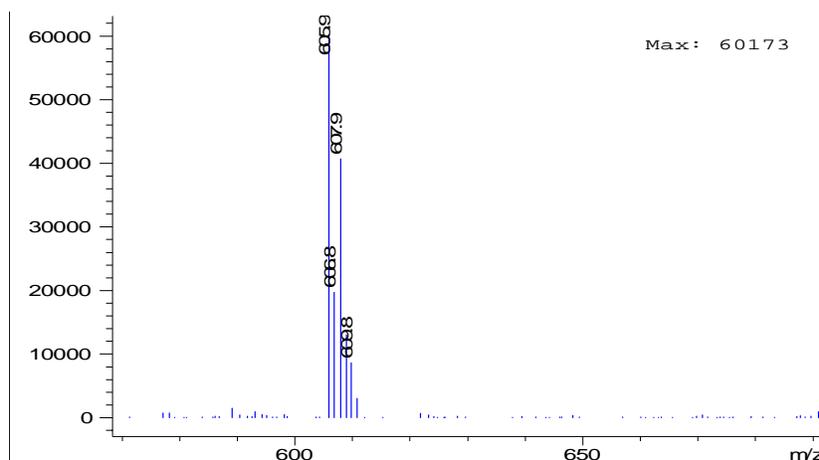


Figura 4.2.4.2: espectro de masas para el pico cromatográfico de mayor cambio, en el promedio de respuestas en las bilis de peces expuestos/no expuestos.

El programa *R* interpreta estas diferencias en una serie de gráficas, en función de los distintos tiempos de retención, tal como pueden verse en las figuras 4.2.4.3 y 4.4.4.

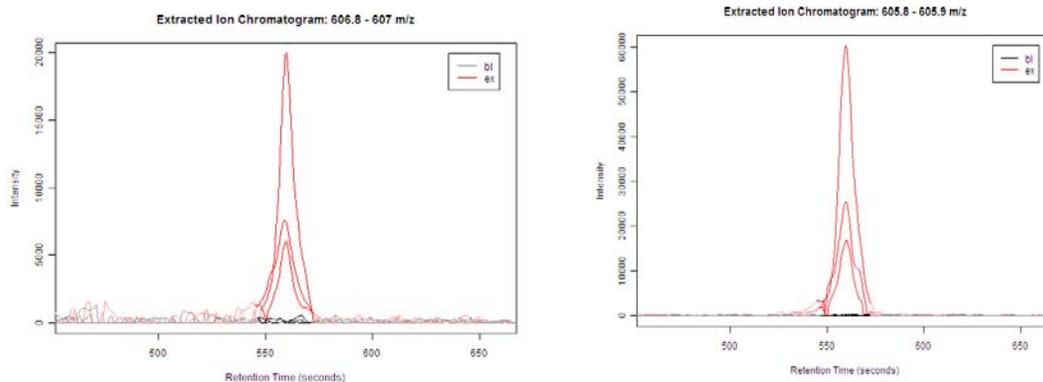


Figura 4.2.4.3: Iones m/z 607 y 606, identificados por análisis de la terna de datos, por exaltación en los peces expuestos.

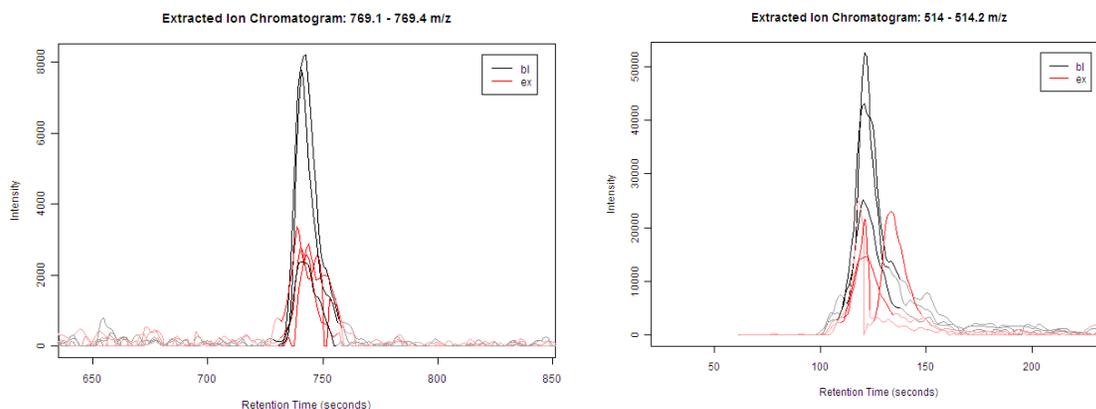


Figura 4.2.4.4: Iones m/z 769 y 524, identificados por análisis de la terna de datos, por depresión en los peces expuestos.

El manejo de los datos espectrométricos en forma estadístico matemática permite, además de identificar las exaltaciones, relacionadas con metabolitos propios de la molécula de exposición, la depresión por parte de metabolitos endógenos, como una respuesta fisiológica interna ante la acción de un agente xenobiótico.

Este conjunto de iones exaltados, que según las figuras 4.2.4.3, en el caso de los blancos (no expuestos) su nivel es nulo, corresponde a la molécula de cipermetrina oxidada y esterificada por una molécula de ácido glucurónico (Figura 4.2.4.5). La misma al ser detectada en modo negativo se detecta como $[M-H]^-$, de masa 606, para los isótopos más livianos de ^{35}Cl y de ^{12}C , para ^{37}Cl y ^{12}C , 608, como más intensos por la abundancia isotópica de ^{12}C respecto a ^{13}C , los otros iones 607/609 corresponden a las combinaciones del ^{13}C con los distintos isótopos del Cl.

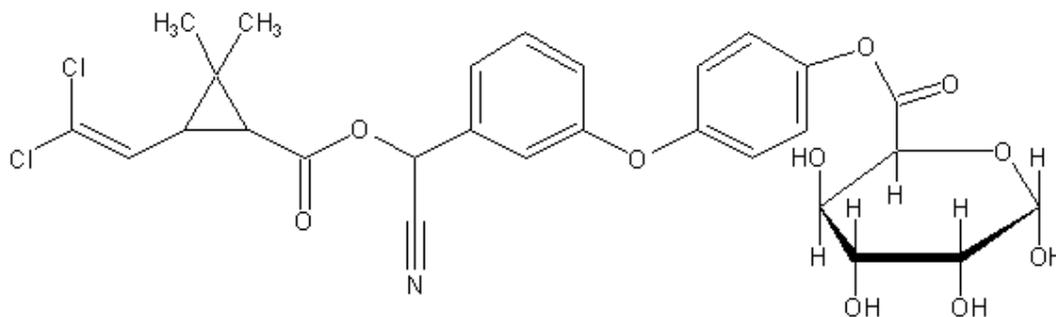


Figura 4.2.4.5: molécula de metabolito biotransformado de cipermetrina, solubilizado en la bilis de peces expuestos. El ión molecular medido en fuente ESI (negativo) corresponde a la pérdida de un átomo de hidrógeno como H^+ .

Un análisis, del mismo tipo, realizado sobre los extractos de la bilis en modo positivo de la fuente ESI, sobre un total de 488 iones formados, se muestra en la Tabla 4.2.4.3.

Tabla 4.2.4.3: iones que mayor diferencia de intensidades representan entre expuesto/no expuesto, para fuente ESI, modo negativo.

Ion	t_r (segundos)	relación exp/no exp.
625	559	55
626	559	37
627	559	49
628	559	18

Los mismos se corresponden con la especie molecular presentada en la figura 4.2.4.5, sobre la cual se ha adherido una molécula de amonio, para dar el ion $[M+18]^+$. Los cromatogramas superpuestos se muestran en la figura 4.2.4.6.

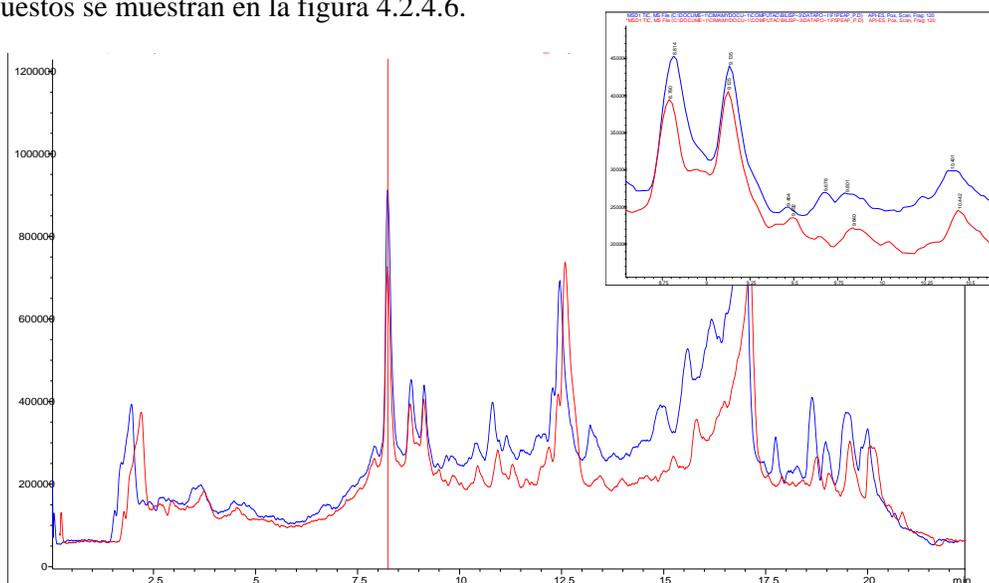


Figura 4.2.4.6: cromatograma de extractos de bilis de uno de los peces expuestos comparado con uno no expuesto, en modo SCAN positivo. En zoom se muestra el pico de intensidad relevante obtenido por exploración de la terna de datos

Como se observa de la comparación, en este caso la exploración manual resultaría extremadamente dificultosa. A partir del tiempo de retención establecido, como aquel que contiene los iones caracterizados, se explora dicho entorno cromatográfico y el espectro de masas obtenido es compatible con la especie química esperada. (Figura 4.2.4.7)

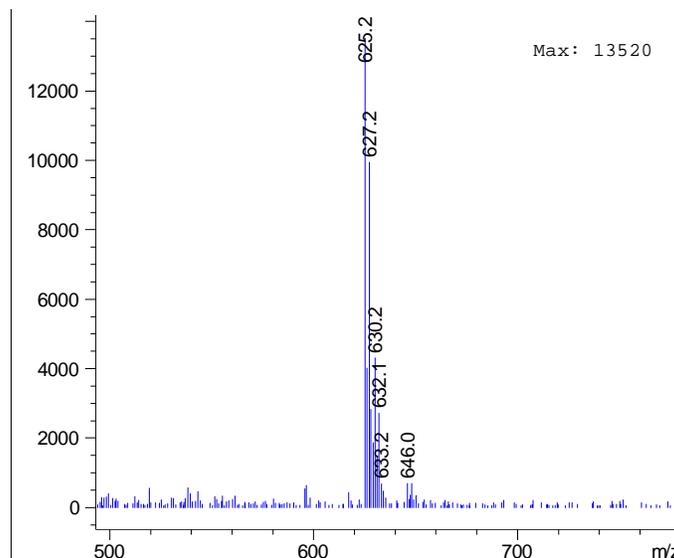


Figura 4.2.4.7: Espectro de masas para el tiempo de retención de 559 segundos, en función de los resultados de la Tabla 4.2.4.3.

El mismo procedimiento es aplicado sobre las muestras de bilis sin pre-tratamiento de extracción, las cuales son acidificadas con HCl al 10% e inyectadas en el cromatógrafo. En estas condiciones, además de los iones detectados aplicando la metodología de Edwards et al. (1987), por extracción con éter etílico, se observa la aparición de un grupo de iones de tiempo de retención de 681 segundos, en modo negativo con m/z de 510 y 512 para la detección negativa de la fuente ESI, tal como lo muestra la Figura 4.2.4.8.

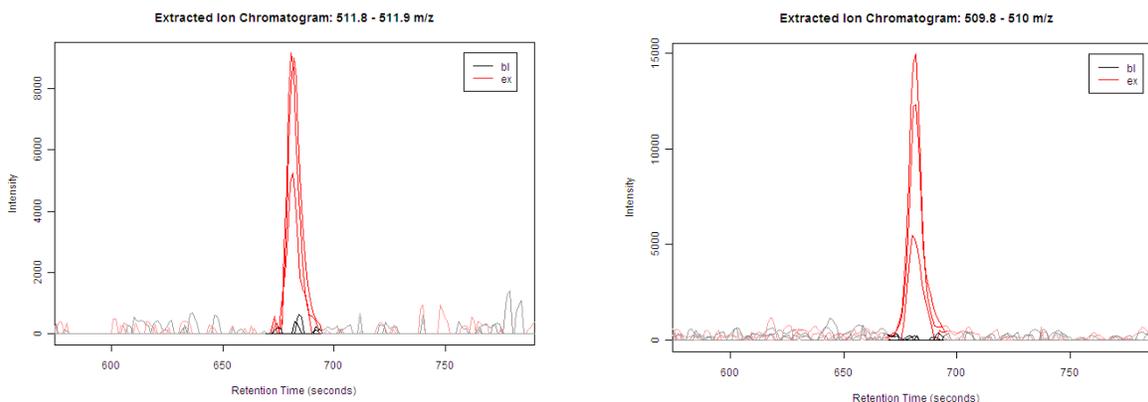


Figura 4.2.4.8: salidas del programa R, a partir de la terna de datos generados en modo SCAN, en fuente ESI modo negativo, para bilis acidificadas e inyección directa.

Un ACP realizado, sobre los iones ± 10 veces intensos, es mostrado en la Tabla 4.2.4.4. En ella se distinguen tanto el grupo de iones encontrados a partir de los extractos etéreos y también aparecen como significantes los iones de m/z de 510 y 512.

Tabla 4.2.4.4: análisis de componentes principales sobre la tena de datos intensidad/tiempo/ión, para aquellos iones que superen o depriman la intensidad promedio entre los ejemplares expuestos/no expuestos.

	F1	F2
M509T349	0,561	0,404
M690T445	0,619	0,369
M258T314	0,553	0,420
M257T320	0,633	0,343
M275T437	0,714	0,267
M303T427	0,631	0,358
M183T380	0,723	0,248
M943T574	0,853	0,146
M939T573	0,819	0,169
M609T560	0,858	0,136
M608T559	0,927	0,066
M512T681	0,898	0,000
M510T681	0,879	0,003
M607T559	0,906	0,086
M606T560	0,919	0,078
M977T573	0,818	0,161

Estas iones son relacionados con el metabolito sulfatado de la cipermetrina oxidada en la posición 4' del anillo aromático (Figura 4.2.4.9), el mismo, para los átomos de ^{35}Cl y de ^{12}C , tiene una masa molecular de 511, que en modo negativo pierde un protón para dar el valor de 510 umas, para la combinación ^{37}Cl y ^{12}C , se tiene masa 513, que en modo negativo es medida como m/z 512.

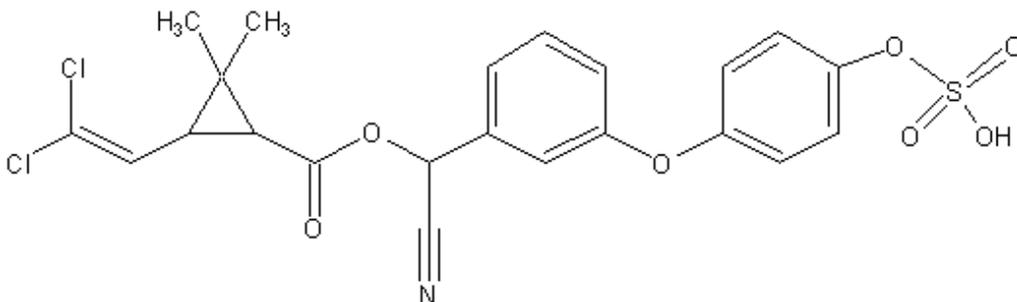


Figura 4.2.4.9: metabolito biotransformado de cipermetrina por adición de sulfato, solubilizado en la bilis de peces expuestos, detectados en modo negativo de ESI, en la bilis inyectada directamente en el equipo.

Una comparación cromatográfica de una bilis expuesta y una no expuesta se exhibe en la figura 4.2.4.10.

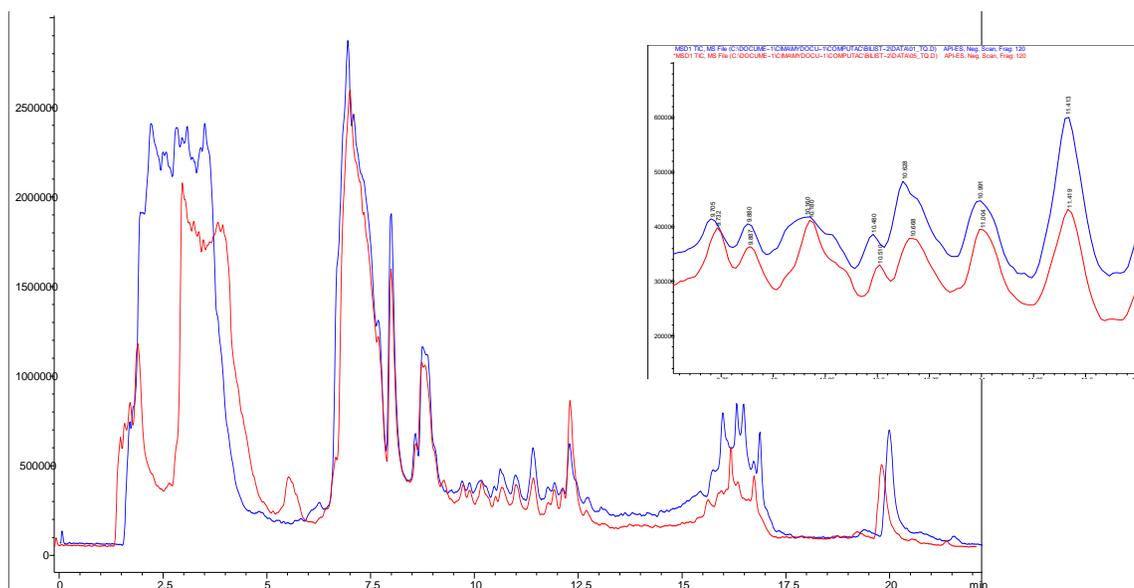


Figura 4.2.4.10: cromatograma de bilis proveniente de un pejerrey expuesto y no expuesto, inyectadas tal cual, en modo de detección SCAN negativo de la fuente ESI. Con la flecha se marca el lugar del metabolito sulfatado por tiempo de retención.

En ella queda demostrado que sería muy difícil encontrar el ión por simple inspección del cromatograma. Los mismos extractos son inyectados en modo positivo de detección, pero ni el ACP ni el programa XCMS muestran iones relacionados con este metabolito, lo cual indica que la condición óptima de detección es en modo negativo. En función de los resultados obtenidos puede decirse que el metabolito glucuronado esta en mayor proporción respecto al sulfatado. En las condiciones de corrida y detección utilizadas en el presente trabajo, y para los pejerreyes, no se detectan los demás metabolitos reportados por Edwards et al. (1987), para *Salmo gairdneri*.

4.2.5-Propuesta analítica de los metabolitos detectados.

En la figura 4.2.5.1 se presenta un ACP realizado con los iones que “aparecen” en los pejerreyes expuestos respecto a los no expuestos, para los cromatogramas producto de la inyección directa de bilis en modo negativo. En este gráfico se observa cómo el primer factor es determinante en la clasificación, conteniendo mas del 94% de la varianza total, además los no expuestos presentan una baja dispersión entre ellos, a la izquierda del F1, mientras que los expuestos, si bien están todos situados a la derecha de este factor, presentan una mayor dispersión, lo que puede relacionarse con la respuesta variable de cada organismo frente a la exposición de un agente químico externo, si bien la tendencia es la misma, lo que cambia es la intensidad de respuesta.

En la figura 4.2.5.2 se presenta un cromatograma de una corrida en modo SIM negativo programado con los iones de los metabolitos m/z de 606, para el glucurónido, y 510 para el sulfato.

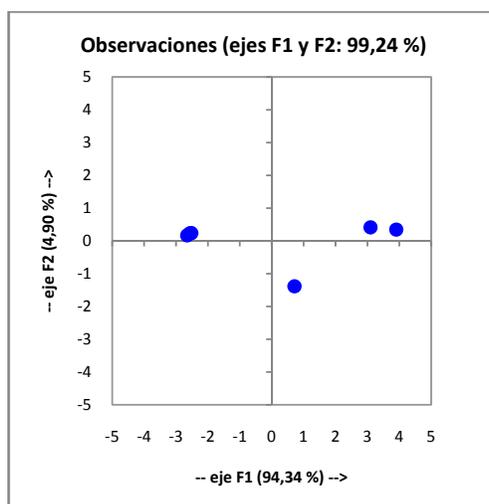


Figura 4.2.5.1: ACP, sobre terna de datos de pejerreyes expuestos y no expuestos, en modo SCAN negativo. A la izquierda del F1, no expuestos, a la derecha de F1, expuestos.

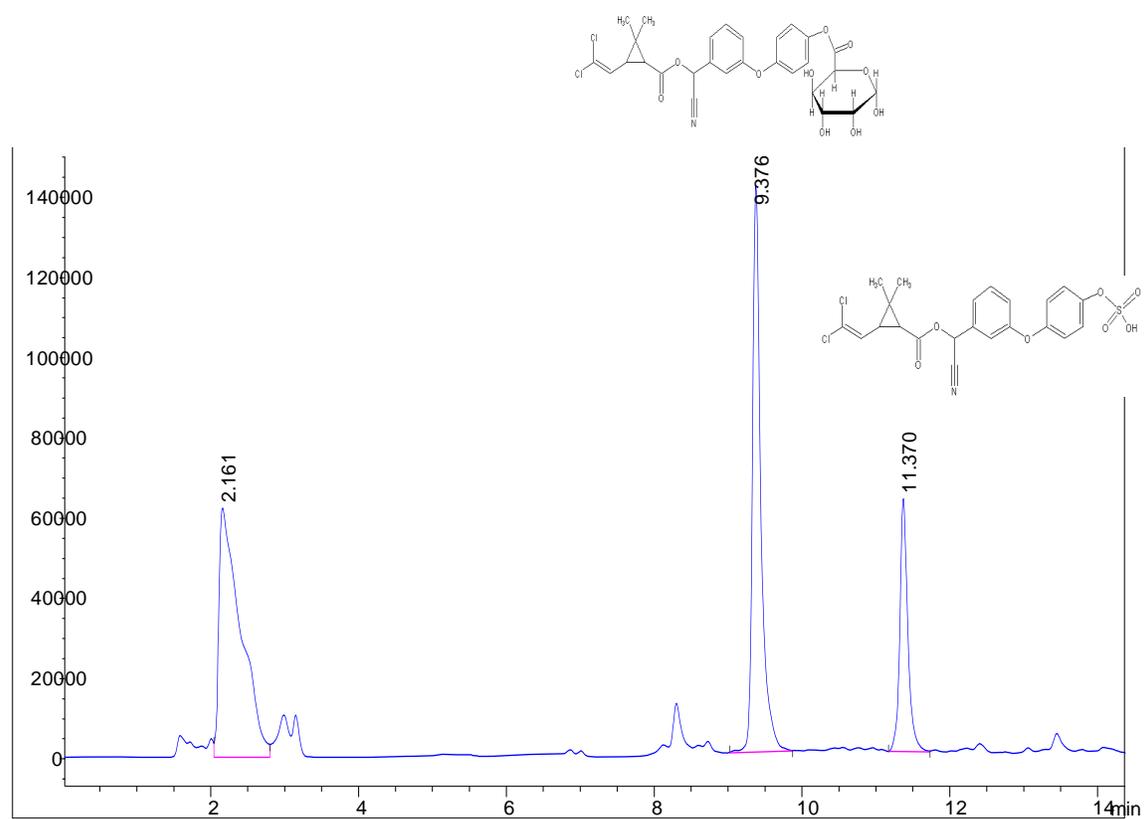


Figura 4.2.5.2: detección SIM, negativa, programada de los metabolitos detectados e identificados.

4.3-CONCLUSIONES

La cipermetrima es mayormente transportada hacia el hígado de los pejerreyes, para su biotransformación y consiguiente excreción, por lo tanto la bilis es de especial interés en el estudio de los procesos de metabolización de este compuesto.

La utilización del conjunto completo de datos tiempo/intensidad/ion, provenientes del espectrómetro de masas, aporta mucha mas información que los pares cartesianos por separado, tan utilizados en análisis cuantitativos de rutina. Para este procesamiento numérico, el programa *XCMS* de *R*, es una herramienta de mucha practicidad, que al trabajar sobre réplicas de un mismo ensayo, produce resultados confiables y representativos, además el uso complementario de los análisis multivariados, ayuda en la identificación de los iones con mayor variación en la intensidad espectrométrica, ponderados a través del peso de los coeficientes de los distintos factores del ACP.

La aplicación de estas metodologías integradas ha permitido identificar los metabolitos mayoritarios de cipermetrina en pejerreyes, siendo ellos los derivados hidroxilados en el carbono aromático 4' de la molécula parental, los cuales se encuentran bajo la forma de ésteres glucurónicos y sulfatos, solubilizados en la bilis para su posterior excreción. Desde el punto de vista operativo, la presencia de átomos de cloro en la molécula, aporta al momento de su identificación.

A partir de estos biomarcadores de exposición, determinados vía HPLC-MS en las condiciones de programación SIM, pueden determinarse la toxicodinamia y la toxicocinética de la cipermetrina. Con esta información puede estudiarse, ante un evento ambiental que involucre a este piretroide, si el mismo ha llegado a los cuerpos de aguas superficiales, ya sea por la medición de estos metabolitos en peces propios del lugar o por exposición de pejerreyes de laboratorio en jaulas, en los medios acuáticos de interés, comparando los perfiles iónicos obtenidos con iguales especies sin exponer. Es muy importante considerar los metabolitos endógenos que varían su distribución, ante la acción de un xenobiótico, ya que los mismos pueden ser considerados como agentes de respuesta *no específica*. Si se elaboran bases de datos de los iones que regularmente se detectan en ejemplares no expuestos con sus intensidades respectivas, al exponer peces de la misma especie, a condiciones ambientales desfavorables, estos perfiles metabólicos verán modificada su distribución y el grado de esta alteración puede considerarse como una respuesta a contaminación, siempre y cuando se trabaje sobre el conjunto completo de resultados espectrométricos.

La herramienta de búsqueda de metabolitos puede extenderse a otro tipo de sustancias químicas, siempre y cuando pueda conocerse el sitio de mayor actividad biotransformadora o de bioacumulación del compuesto en estudio.