



UNIVERSIDAD NACIONAL DE ASUNCIÓN
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Departamento de Química
Maestría en Físicoquímica

**ESTUDIO TEÓRICO-EXPERIMENTAL DE
MOLÉCULAS DE INTERÉS AMBIENTAL, POR
ESPECTROMETRÍA DE MASAS. SU APLICACIÓN
A LA CUANTIFICACIÓN EN AGUAS Y SUELOS
Y EN ESTUDIOS TOXICOLÓGICOS**

CALIXTA VIVIANA LÓPEZ ACA

Tesis presentada a la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales,
Universidad Nacional de Asunción, como requisito para la obtención
del Grado de Máster en Físicoquímica con énfasis en Físicoquímica Ambiental

SAN LORENZO - PARAGUAY
JUNIO - 2013



UNIVERSIDAD NACIONAL DE ASUNCIÓN
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Departamento de Química
Maestría en Físicoquímica

ESTUDIO TEÓRICO-EXPERIMENTAL DE
MOLÉCULAS DE INTERÉS AMBIENTAL, POR
ESPECTROMETRÍA DE MASAS. SU APLICACIÓN
A LA CUANTIFICACIÓN EN AGUAS Y SUELOS
Y EN ESTUDIOS TOXICOLÓGICOS

CALIXTA VIVIANA LÓPEZ ACA

Orientador: **Prof. Dr. ALBERTO LUIS CAPPARELLI**
Co Orientadora: **Dra. NORMA BEATRIZ CABALLERO**
Co Orientador: **Dr. DAMIÁN JOSÉ G. MARINO**

Tesis presentada a la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales,
Universidad Nacional de Asunción, como requisito para la obtención
del Grado de Máster en Físicoquímica con énfasis en Físicoquímica Ambiental

SAN LORENZO - PARAGUAY
JUNIO - 2013

Datos Internacionales de Catalogación en la Publicación (CIP)

DE LA BIBLIOTECA E INTERNET DE LA FACEN - UNA

López Aca, Calixta Viviana

Estudio teórico-experimental de moléculas de interés ambiental, por espectrometría de masas, su aplicación a la cuantificación en aguas y suelos y en estudios toxicológicos / Calixta Viviana López Aca.-- San Lorenzo: FACEN, 2013.

i-xvi, 160 h.; 30 cm.

Incluye bibliografías.

Tesis (Máster en Físicoquímica con énfasis en Físicoquímica Ambiental). -- UNA. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, 2013.

1. Espectrometría de masas 2. Química computacional 3. Piretroides 4. Teoría QSAR-QSPR 5. Tesis y disertaciones académicas
I. Título.

544.6/L881e

**ESTUDIO TEÓRICO-EXPERIMENTAL DE MOLÉCULAS
DE INTERÉS AMBIENTAL, POR ESPECTROMETRÍA DE
MASAS. SU APLICACIÓN A LA CUANTIFICACIÓN EN
AGUAS Y SUELOS Y EN ESTUDIOS TOXICOLÓGICOS**

CALIXTA VIVIANA LÓPEZ ACA

Tesis presentada a la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad Nacional de Asunción, como requisito para la obtención del Grado de Máster en Fisicoquímica con énfasis en Fisicoquímica Ambiental.

Fecha de aprobación: 27 de Junio de 2013

MESA EXAMINADORA

MIEMBROS:

Prof. Dr. Alberto Luis Capparelli

Universidad Nacional de La Plata, Argentina

Prof. Dr. Luis Alfredo Kieffer

Universidad Nacional del Litoral, Argentina

Prof. Dr. Javier Alcides Galeano Sánchez

Universidad Nacional de Asunción, Paraguay

Prof. Dr. Ricardo Garay Argüello

Universidad Nacional de Asunción, Paraguay

Prof. MSc. Hugo Arnulfo Rojas Rojas

Universidad Nacional de Asunción, Paraguay

Aprobado y catalogado por la Dirección de Postgrado de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad Nacional de Asunción, en fecha 27 de agosto de 2013.

Prof. Dr. Javier Alcides Galeano Sánchez

Director de Postgrado, FACEN – UNA

A mi familia....
Por el tiempo...

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Alberto Luis Capparelli, por su orientación, tiempo y predisposición durante todo lo que duró el estudio, hasta finalmente culminarlo.

A la Dra. Norma Beatriz Caballero, por el constante estímulo, tiempo, aporte y paciencia recibidos de parte de ella, durante todo el transcurso de la Maestría.

Al Dr. Damián José Marino, por su aporte invaluable en el desarrollo de la parte experimental de esta tesis.

A la Coordinación de la Maestría, por todo el esfuerzo realizado, y por el constante apoyo recibido.

A la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad Nacional de Asunción, y a sus directivos, por hacer posible la realización de este curso de Maestría, de incalculable aporte para el avance de la Ciencia en el País.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, de la Presidencia de la República del Paraguay, por el valioso aporte financiero en el desarrollo de todo el programa de Maestría, y en particular, por la concesión de las becas de los Programas, de Fortalecimiento de Postgrados de Universidades Nacionales y de Becas Complementarias, respectivamente.

Al Centro de Investigaciones del Medio Ambiente (CIMA) de la Universidad Nacional de La Plata – Argentina, por abrirme las puertas para realizar este trabajo, a su Directora, y al maravilloso equipo de Investigadores y estudiantes.

Al Instituto de Investigaciones Fisicoquímicas Teóricas y Aplicadas (INIFTA) de la Universidad Nacional de La Plata – Argentina, al Dr. Carlos Cobos y la Dra. Ma. Eugenia Tucceri, por el aporte para la realización de los cálculos computacionales.

Al Centro Nacional de Toxicología, por el apoyo recibido para la realización de este emprendimiento; a la Dirección, a la Administración, y muy especialmente a la Jefatura del Laboratorio, en la persona del Dr. Narciso Fleitas, por su confianza y respaldo durante todo este tiempo.

A la Dra. Fátima Yubero, por haberme encaminado a este fascinante mundo de la Fisicoquímica, por su confianza y apoyo de siempre.

Muy especialmente al Msc. Danilo Fernández Ríos, por toda su contribución a lo largo de la Maestría.

A todos mis compañeros de trabajo, con los que he contado durante todo este periodo, sin el apoyo de ellos hubiera sido muy difícil concretar este proyecto.

A mis compañeros del curso de Maestría, en especial a Lourdes, Cynthia, Nadia, Liz, y Elizabeth, por el camino recorrido de manera conjunta, y que me permitieron crecer tanto académica como personalmente.

A todas las demás personas que colaboraron de alguna manera para la realización del trabajo.

A mi familia, por estar siempre...

ESTUDIO TEÓRICO-EXPERIMENTAL DE MOLÉCULAS DE INTERÉS AMBIENTAL, POR ESPECTROMETRÍA DE MASAS. SU APLICACIÓN A LA CUANTIFICACIÓN EN AGUAS Y SUELOS Y EN ESTUDIOS TOXICOLÓGICOS

Autor: CALIXTA VIVIANA LÓPEZ ACA

Orientador: PROF. DR. ALBERTO LUIS CAPPARELLI

Co Orientadora: DRA. NORMA BEATRIZ CABALLERO

Co Orientador: DR. DAMIÁN JOSÉ G. MARINO

RESUMEN

Los compuestos conocidos como piretroides, derivados de la familia de las piretrinas, son empleados normalmente como constituyentes de los insecticidas. Su alta lipofilidad, tiempo de vida relativamente corto en el medio ambiente y con bajo impacto sobre los vertebrados terrestres han contribuido a su amplia aceptación para su empleo como insecticidas. Los piretroides están constituidos por dos unidades estructurales, una ácida y la otra un alcohol. Se llevó a cabo un estudio computacional de las características estructurales y energéticas de ciertas moléculas constituyentes de la familia de los piretroides: Cipermetrina, Permetrina, Tetrametrina, Fenotrina, Alletrina y Lambda Cialotrina. Los cálculos se realizaron empleando la teoría del funcional de la densidad con los funcionales híbridos B3LYP, B3PW91, B98 y B97-2, utilizando en todos los casos el conjunto de bases 6-31G (d,p) para el análisis de las formas neutras de las moléculas consideradas. Los diferentes iones, las formas protonadas, desprotonadas, los aductos y fragmentos considerados se estudiaron con el funcional híbrido B3LYP considerado por la literatura como el de mejor desempeño para el estudio de moléculas orgánicas en fase gaseosa. Los resultados del análisis computacional de la Cipermetrina, como longitudes de enlace y ángulos de la estructura optimizada con los diferentes funcionales teóricos, fueron comparados con valores experimentales resultantes del estudio de la estructura cristalina de la Cipermetrina por difracción de Rayos X. Para las demás moléculas de piretroides no se encontraron datos experimentales en la bibliografía consultada. Se desarrolló también una técnica experimental de identificación y cuantificación de una mezcla de 6 piretroides por HPLC con detector de espectrómetro de masas. El cálculo de las distintas propiedades fisicoquímicas y energéticas de estas moléculas, permite la predicción de los procesos primarios de fragmentación asociados a la técnica experimental de espectrometría de masa, verificado por el estudio de modelado tipo QSAR propuesto en este trabajo.

Palabras claves: Piretroides, espectrometría de masas, química computacional, teoría QSAR / QSPR

THEORETICAL AND EXPERIMENTAL STUDY OF ENVIRONMENTAL INTEREST MOLECULES BY MASS SPECTROMETRY. ITS APPLICATION TO THE QUANTIFICATION IN WATERS AND SOILS AND IN TOXICOLOGICAL STUDIES

Author: CALIXTA VIVIANA LÓPEZ ACA
Advisor: PROF. DR. ALBERTO LUIS CAPPARELLI
Co Advisor: DRA. NORMA BEATRIZ CABALLERO
Co Advisor: DR. DAMIÁN JOSÉ G. MARINO

SUMMARY

Compounds known as pyrethroids, derived from the family of pyrethrins, are typically employed as constituents of insecticides. Its high lipophilicity, relatively short lifetime in the environment and with low impact on terrestrial vertebrates have led to their wide acceptance for use as insecticides. Pyrethroids are formed by two structural units, one acidic and one alcohol. We were carried out a computational study of the structural and energetic properties of some molecules of the pyrethroids family: Cypermethrin, Permethrin, Tetramethrin, Allethrin, phenothrin and Lambda Cyhalothrin. The calculations were made using the density functional theory with B3LYP functional hybrid, B3PW91, B98 and B97-2, using in all cases the basis set 6-31G (d, p) for analysis of neutral forms of the molecules concerned. The different ions, protonated forms, deprotonated, adducts and fragments considered were studied with the B3LYP hybrid functional considered by the literature as the top performer for the study of gas-phase organic molecules. The results of computational analysis of cypermethrin, as bond lengths and angles of the optimized structure to different functional theory were compared with experimental values resulting from the X-ray diffraction study of the crystal structure of cypermethrin. For other pyrethroid molecules no found experimental data in the literature. In addition was developed an experimental technique for identification and quantification of a mixture of 6 pyrethroids by HPLC with mass spectrometer detector. Calculation of various physicochemical and energetic properties of these molecules allows the prediction of the primary processes of fragmentation associated with the experimental technique of mass spectrometry, verified by QSAR study proposed in this work.

Keywords: Pyrethroids, mass spectrometry, computational chemistry, QSAR / QSPR theory.

ÍNDICE

	Página
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Justificación	2
1.2 Objetivos	3
1.2.1 Objetivo General	3
1.2.2 Objetivos específicos	3
1.3 Hipótesis	3
2. MARCO TEÓRICO	5
2.1 Antecedentes	5
2.2 Química Computacional	6
2.2.1 Introducción a la Química Computacional	6
2.2.2 Mecánica Molecular.....	7
2.2.3 Métodos de estructura electrónica.....	13
2.2.3.1 Métodos semiempíricos	14
2.2.3.2 Métodos ab initio	18
2.2.3.3 Métodos de la Teoría Funcional de la Densidad (DFT)	24
2.2.4 Modelos Químicos	27
2.2.4.1 Terminología.....	28
2.2.4.2 Conjunto de Bases.....	29
2.2.5 Relaciones tipo QSAR – QSPR	30
2.3 Espectrometría de Masas	35
2.3.1 El espectrómetro de masas	36
2.3.2 El espectro de masas	37
2.3.3 Teoría del Cuasi Equilibrio	38
2.3.3.1 Ionización.....	38
2.3.3.2 Energía de Ionización.....	39
2.3.3.3 Relación de la energía de ionización y funciones de velocidad.....	41
2.3.3.4 Efectos de la termodinámica vs. la cinética	43
2.3.3.5 Eficiencia de la Ionización Electrónica.....	44
2.3.3.6 Consecuencias prácticas de la energía interna	45
2.3.4 Instrumentación.....	45
2.3.4.1 Generación del haz de iones – Fuentes de iones.....	45
2.3.4.2 Principio del sector magnético.....	45
2.4. Piretroides	47
2.4.1 Introducción a los piretroides.....	47
2.4.2 Química y estructura de los Piretroides	48
2.4.3 Propiedades Físicas	50
2.4.4 Modo de acción de los piretroides y las piretrinas.....	51
2.4.5 Metabolismo	53
2.4.6 Sinergistas	53
2.4.7 Destino ambiental	54
2.4.8 Ecotoxicología	55

2.4.9	Reevaluación de la EPA de los Piretroides, piretrinas y sinergistas	57
3.	METODOLOGÍA	59
3.1	Materiales.....	59
3.1.1	Estudio teórico computacional.....	59
3.1.2	Caracterización espectrométrica de las moléculas de los piretroides ..	59
3.1.2.1	Reactivos utilizados	59
3.1.2.2	Equipos utilizados	60
3.2	Métodos.....	61
3.2.1	Estudio computacional de las estructuras optimizadas de compuestos de la familia de piretroides.....	61
3.2.2	Caracterización espectrométrica de las moléculas de piretroides. Aplicación a la cuantificación en matrices ambientales	62
3.2.3	Optimización del método de detección.....	62
3.2.4	Modelado de propiedades fisicoquímicas y actividades biológicas.....	64
4.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	66
4.1	Estudio Computacional de las estructuras de los piretroides considerados ..	66
4.1.1	Cipermetrina	67
4.1.2	Permetrina	84
4.1.3	Tetrametrina.....	88
4.1.4	Fenotrina	99
4.1.5	Alletrina	108
4.2	Estudio experimental por espectrometría de masas de las estructuras de los piretroides considerados	116
4.2.1	Cipermetrina	117
4.2.2	Permetrina	124
4.2.3	Tetrametrina.....	128
4.2.4	Fenotrina	132
4.2.5	Alletrina	135
4.2.6	Lambda -Cialotrina	138
4.2.7	Optimización del método analítico	142
4.3	Estudio QSAR – QSPR de moléculas de la familia de los piretroides	144
4.3.1	Energía y estabilidad molecular.....	144
4.3.2	Relación entre la energética molecular y resultados experimentales de espectrometría de masas.....	147
4.3.3	Lipofilicidad (log P) y factor de Bioconcentración	151
5.	CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	155
5.1	Conclusiones	155
5.2	Recomendaciones	157
	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	158

LISTA DE FIGURAS

	Página
1. Esquematización de los principales términos de la energía de un campo de fuerza.....	9
2. Energía de torsión debido a la conformación alrededor de un enlace simple según una función coseno.....	10
3. Etapas de un estudio QSAR – QSPR.....	34
4. Esquema general de un espectrómetro de masas.....	37
5. Diagrama de Wahaftig. Relación de P(E) y k(E) para la descomposición unimolecular del ión ABCD ⁺	43
6. Posibles estados de transición del ion ABCD ⁺	44
7. Geometría optimizada de la Cipermetrina al nivel de teoría B3LYP / 6-31G (d,p).....	67
8. Geometría optimizada de la Cipermetrina en su formas iónicas A)[M+H] ⁺ y B)[M] ⁺ al nivel de teoría B3LYP/6-31G (d,p).....	70
9. Estructura optimizada de [M+Na] ⁺ al nivel de teoría B3LYP / 6-31G (d,p).....	74
10. Estructura optimizada de [M+NH ₄] ⁺ al nivel de teoría B3LYP / 6-31G (d,p).....	75
11. Estructura optimizada de [M+H+32] ⁺ al nivel de teoría B3LYP / 6-31 G(d,p).....	75
12. Estructura optimizada del ión [181] ⁺ correspondiente al ión tipo tropilio benzofurano.....	81
13. Estructura optimizada del ión [240] ⁺ correspondiente al ión ciano 3-fenoxi bencil formando el aducto con la molécula del metanol.....	81
14. Geometría optimizada de la Permetrina al nivel de teoría B3LYP / 6-31G (d,p).....	84
15. Geometría optimizada de la Tetrametrina al nivel de teoría B3LYP / 6-31G (d,p).....	88
16. Geometría optimizada de la forma iónica protonada [M+H] ⁺ al nivel de teoría B3LYP/6-31G (d,p).....	92
17. Estructura optimizada de [M+Na] ⁺ al nivel de teoría B3LYP / 6/31G (d,p).....	94
18. Estructura optimizada de [M+NH ₄] ⁺ al nivel de teoría B3LYP / 6-31G (d,p).....	95
19. Estructura optimizada del ión [164] ⁺ con el nivel de teoría B3LYP / 6-31G (d,p).....	98
20. Geometría optimizada de la Fenotrina al nivel de teoría B3LYP / 6-31G (d,p).....	99
21. Geometría optimizada de la forma iónica protonada [M+H] ⁺ de la Fenotrina al nivel de teoría B3LYP/6-31G (d,p).....	103
22. Estructura optimizada de [M+Na] ⁺ al nivel de teoría B3LYP / 6-31G (d,p).....	104
23. Estructura optimizada del fragmento [183] ⁺ (ión fenoxi tropilio) al nivel de teoría B3LYP/6-31G (d,p).....	107

24. Geometría optimizada de la Alletrina al nivel de teoría B3LYP/6-31 G (d,p)....	108
25. Geometría optimizada de la forma iónica protonada $[M+H]^+$ de la Alletrina al nivel de teoría B3LYP/6-31G (d,p).....	112
26. Estructura optimizada de $[M+Na]^+$ al nivel de teoría B3LYP / 6-31G (d,p).....	113
27. Estructura optimizada de $[M+NH_4]^+$ al nivel de teoría B3LYP / 6-31G (d,p).....	114
28. Cromatograma y espectro de masas de la Cipermetrina utilizando ACN en la fase móvil, con temperatura del gas de secado de 300°C y energía de impacto electrónico: 150 eV.....	120
29. Cromatograma y Espectro de masas de la Cipermetrina en ausencia de metanol utilizando ACN en la fase móvil, con temperatura del gas de secado de 350°C y energía de impacto electrónico: 110 eV.....	120
30. Espectro de masas de la Cipermetrina utilizando MeOH en la fase móvil, con temperatura del gas de secado de 300°C y energía de impacto electrónico de 150 eV.....	121
31. Espectro de masas de la Cipermetrina en ausencia de metanol, utilizando ACN en la fase móvil, con temperatura del gas de secado de 350°C y energía de impacto electrónico: 230 eV.....	121
32. Comportamiento de la relación de la abundancia de iones de la Cipermetrina frente a distintas variables analíticas.....	122
33. Comparación de la relación de la abundancia de iones de la Cipermetrina con la energía de impacto electrónico, variando la composición de la fase móvil utilizada y la temperatura del sistema.....	123
34. Cromatograma y Espectro de masas de la Permetrina, utilizando ACN en la fase móvil, con temperatura del gas de secado de 300°C y energía de impacto electrónico: 110 eV.....	125
35. Cromatograma y Espectro de masas de la Permetrina, utilizando MeOH en la fase móvil, con temperatura del gas de secado de 300°C y Energía de impacto electrónico: 110 eV.....	125
36. Cromatograma y Espectro de masas de la Permetrina, en ausencia de MeOH utilizando ACN en la fase móvil, con temperatura del gas de secado de 300°C y Energía de impacto electrónico: 130 eV.....	126
37. Dependencia de la población iónica de la Permetrina frente a la energía de impacto electrónico, en ausencia y en presencia de MeOH.....	6 126
38. Comparación de la relación de la abundancia de iones de la Permetrina con la energía de impacto electrónico, variando la composición de la fase móvil utilizada y la temperatura del sistema.....	127
39. Cromatograma y Espectro de masas de la Tetrametrina, utilizando ACN en la fase móvil, con temperatura del gas de secado de 300°C y energía de impacto electrónico: 150 eV.....	129
40. Cromatograma y Espectro de masas de la Tetrametrina, en ausencia de MeOH utilizando ACN en la fase móvil, con temperatura del gas de secado de 300°C y energía de impacto electrónico: 130 eV.....	129

41. Cromatograma y Espectro de masas de la Tetrametrina, utilizando MeOH en la fase móvil, con temperatura del gas de secado de 350°C y Energía de impacto electrónico: 150 eV.....	130
42. Dependencia de la población iónica de la Tetrametrina frente a la energía de impacto electrónico, en ausencia y en presencia de MeOH.....	130
43. Comparación de la relación de la abundancia de iones con respecto a la fase móvil utilizada y la temperatura del sistema.....	131
44. Cromatograma y Espectro de masas de la Fenotrina, utilizando ACN en la fase móvil, con temperatura del gas de secado de 300°C y energía de impacto electrónico: 110 eV.....	133
45. Cromatograma y Espectro de masas de la Fenotrina utilizando MeOH en la fase móvil, con temperatura del gas de secado de 300°C y energía de impacto electrónico: 130 eV.....	133
46. Comparación de la relación de la abundancia de iones de la Fenotrina con la energía de impacto electrónico, variando la composición de la fase móvil utilizada y la temperatura del sistema.....	134
47. Cromatograma y Espectro de masas de la Alletrina, utilizando ACN en la fase móvil, con temperatura del gas de secado de 300°C y energía de impacto electrónico: 130 eV.....	136
48. Cromatograma y Espectro de masas de la Alletrina utilizando MeOH en la fase móvil, con temperatura del gas de secado de 300°C y energía de impacto electrónico: 130 eV.....	136
49. Comparación de la relación de la abundancia de iones de la Alletrina con la energía de impacto electrónico, variando la composición de la fase móvil utilizada y la temperatura del sistema.....	137
50. Cromatograma y Espectro de masas de la Lambda Cialotrina, utilizando ACN en la fase móvil, con temperatura del gas de secado de 300°C y energía de impacto electrónico: 110 eV.....	139
51. Cromatograma y Espectro de masas de la Lambda Cialotrina, en ausencia de MeOH, utilizando ACN en la fase móvil, con temperatura del gas de secado de 300°C y energía de impacto electrónico: 150 eV.....	140
52. Dependencia de la población iónica de la Lambda Cialotrina frente a la energía de impacto electrónico, en presencia y en ausencia de MeOH.....	140
53. Comparación de la relación de la abundancia de iones con la energía de impacto electrónico, variando la composición de la fase móvil utilizada y la temperatura del sistema.....	141
54. Cromatograma característico de la mezcla de los 6 piretroides considerados en el estudio.....	144

LISTA DE TABLAS

	Página
1. Términos energéticos de campos de fuerza comúnmente utilizados.....	11
2. Principales descriptores utilizados en estudios QSAR – QSPR.....	33
3. Gradiente de concentraciones de los solventes utilizados en la fase móvil para la elución de la mezcla de piretroides.....	64
4. Distribución de los piretroides para su elución en diferentes intervalos de tiempo.....	64
5. Comparación de las longitudes de enlace de la Cipermetrina obtenidas con los distintos niveles de teoría.....	68
6. Comparación de los ángulos de enlace obtenidos con los distintos niveles de teoría para la forma neutra de la Cipermetrina.....	68
7. Comparación de los ángulos diedros (en grados) obtenidos con los distintos niveles de teoría para la forma neutra de la Cipermetrina.....	69
8. Comparación de los parámetros termoquímicos obtenidos con los distintos niveles de teoría para la forma neutra de la Cipermetrina.....	69
9. Parámetros geométricos optimizados obtenidos para la forma iónica $[M+H]^+$ de la Cipermetrina con el nivel de teoría B3LYP / 6-31 G(d,p).....	71
10. Parámetros geométricos optimizados para la forma iónica $[M]^+$ de la Cipermetrina con el nivel de teoría B3LYP / 6-31 G(d,p).....	72
11. Comparación de los parámetros termoquímicos obtenidos con el nivel de teoría B3LYP/6-31 G (d,p) para las formas iónicas $[M+H]^+$ y $[M]^+$ de la Cipermetrina.....	73
12. Parámetros geométricos optimizados para los aductos formados con la Cipermetrina con el nivel de teoría B3LYP / 6-31 G (d,p).....	76
13. Parámetros geométricos optimizados de los aductos formados con la Cipermetrina con el nivel de teoría B3LYP / 6-31 G (d,p). Relación entre los cationes Na^+ y NH_4^+ y el solvente MeOH con los átomos de la Cipermetrina.....	77
14. Parámetros geométricos optimizados de los aductos formados con la Cipermetrina con el nivel de teoría B3LYP / 6-31 G (d,p). Ángulos de enlace y ángulos diedros.....	78
15. Comparación de los parámetros termoquímicos obtenidos con el nivel de teoría B3LYP/6-31G (d,p) para los aductos $[M+Na]^+$, $[M+NH_4]^+$ y $[M+H+32]^+$ de la Cipermetrina.....	79
16. Parámetros geométricos optimizados del fragmento $[181]^+$ de la Cipermetrina con el nivel de teoría B3LYP / 6-31 G (d,p).....	82
17. Parámetros geométricos optimizados del fragmento $[208+32]^+$ de la Cipermetrina con el nivel de teoría B3LYP / 6-31 G (d,p).....	82
18. Comparación de los parámetros termoquímicos obtenidos con el nivel de teoría B3LYP/6-31G (d,p) para los fragmentos $[181]^+$ y $[208+32]^+$ de la Cipermetrina.....	83
19. Comparación de las longitudes de enlace obtenidas con los distintos niveles de teoría y el conjunto de bases 6-31 G (d,p) para la Permetrina.....	85

20. Comparación de los ángulos de enlace obtenidos con los distintos niveles de teoría y el conjunto de bases 6-31 G (d,p) para la Permetrina.....	85
21. Comparación de los ángulos diedros obtenidos con los distintos niveles de teoría y el conjunto de bases 6-31 G (d,p) para la Permetrina.....	86
22. Comparación de los parámetros termoquímicos obtenidos con los distintos niveles de teoría y el conjunto de bases 6-31 G (d,p) para la Permetrina.....	86
23. Comparación de las longitudes de enlace obtenidas con los distintos niveles de teoría y el conjunto de bases 6-31 G (d,p) para la Tetrametrina.....	89
24. Comparación de los ángulos de enlace obtenidos con los distintos niveles de teoría y el conjunto de bases 6-31 G (d,p) para la Tetrametrina.....	90
25. Comparación de los ángulos diedros (en grados) obtenidos con los distintos niveles de teoría y el conjunto de bases 6-31 G (d,p) para la Tetrametrina....	90
26. Comparación de los parámetros termoquímicos obtenidos con los distintos niveles de teoría y el conjunto de bases 6-31 G (d,p) para la Tetrametrina....	91
27. Parámetros geométricos optimizados para la formas iónicas $[M^*]^+$ y $[M+H]^+$ de la Tetrametrina con el nivel de teoría B3LYP / 6-31 G (d,p).....	93
28. Parámetros geométricos optimizados de los aductos formados con la Tetrametrina con el nivel de teoría B3LYP / 6-31 G (d,p).....	96
29. Parámetros termoquímicos obtenidos con el nivel de teoría B3LYP / 6-31 G (d,p) para cada una de las formas iónicas de la Tetrametrina.....	97
30. Parámetros geométricos y termoquímicos obtenidos con el nivel de teoría B3LYP/6-31G (d,p) para el fragmento $[164]^+$ de la Tetrametrina.....	98
31. Comparación de las longitudes de enlace obtenidas con los distintos niveles de teoría y el conjunto de bases 6-31 G (d,p) para la Fenotrina.....	100
32. Comparación de los ángulos de enlace obtenidos con los distintos niveles de teoría y el conjunto de bases 6-31 G (d,p) para la Fenotrina.....	100
33. Comparación de los ángulos diedros (en grados) obtenidos con los distintos niveles de teoría y el conjunto de bases 6-31 G (d,p) para la Fenotrina.....	101
34. Comparación de los parámetros termoquímicos obtenidos con los distintos niveles de teoría y el conjunto de bases 6-31 G (d,p) para la Fenotrina.....	102
35. Parámetros geométricos optimizados para las formas iónicas $[M^*]^+$ y $[M+H]^+$ con el nivel de teoría B3LYP / 6-31 G (d,p) de la Fenotrina.....	103
36. Parámetros geométricos optimizados para el aducto $[M+Na]^+$ de la Fenotrina con el nivel de teoría B3LYP / 6-31 G (d,p).....	105
37. Parámetros termoquímicos obtenidos con el nivel de teoría B3LYP / 6-31 G (d,p) para cada una de las formas iónicas de la Fenotrina: $[M^*]^+$, $[M+H]^+$ y $[M+Na]^+$	106
38. Parámetros geométricos y termoquímicos obtenidos con el nivel de teoría B3LYP/6-31G (d,p) para el fragmento $[183]^+$ de la Fenotrina.....	107
39. Comparación de las longitudes de enlace obtenidas con los distintos niveles de teoría el conjunto de bases 6-31 G (d,p) para la Alletrina.....	109
40. Comparación de los ángulos de enlace obtenidos con los distintos niveles de teoría y el conjunto de bases 6-31 G (d,p) para la Alletrina.....	110
41. Comparación de los ángulos diedros obtenidos con los distintos niveles de teoría y el conjunto de bases 6-31 G (d,p) para la Alletrina.....	110

42. Comparación de los parámetros termoquímicos obtenidos con los distintos niveles de teoría y el conjunto de bases 6-31 G (d,p) para la Alletrina.....	111
43. Parámetros geométricos optimizados para las formas iónicas $[M^*]^+$ y $[M+H]^+$ de la Alletrina con el nivel de teoría B3LYP / 6-31 G (d,p).....	112
44. Parámetros geométricos optimizados de los aductos formados con la Alletrina con el nivel de teoría B3LYP / 6-31 G (d,p)	114
45. Longitudes de enlace del aducto $[M+NH_4]^+$ de la Alletrina al nivel de teoría B3LYP/6-31G (d,p).....	115
46. Parámetros termoquímicos obtenidos con el nivel de teoría B3LYP / 6-31 G (d,p) para cada una de las formas iónicas de la Alletrina.....	115
47. Energías HOMO, LUMO y E_{H-L} de las estructuras de los piretroides en sus formas neutras, optimizadas con un nivel de teoría B3LYP /6-31G (d,p).....	145
48. Energías electrónicas de las estructuras de los piretroides, optimizadas con el nivel de teoría B3LYP/6-31G (d,p), en sus formas neutras y de catión radical, y potencial de ionización resultante para cada molécula.....	146
49. Energías electrónicas de las estructuras de los piretroides, optimizadas con el nivel de teoría B3LYP/6-31G (d,p), en sus formas neutras y protonadas, y potencial de ionización resultante para cada molécula.....	147
50. Probables iones a ser detectados en el espectrómetro de masas.....	148
51. Distribución iónica en porcentaje (%) con respecto al total de iones formados en el espectrómetro de masas.....	149
52. Residuos de los parámetros energéticos obtenidos por predicción a partir del modelado tipo QSAR – QSPR.....	151
53. Error relativo porcentual de los parámetros energéticos obtenidos por predicción a partir del modelado tipo QSAR – QSPR.....	151
54. Estimación del valor de log P según el modelo propuesto y su error relativo porcentual.....	154
55. Estimación del valor de log BCF según el modelo propuesto y su error relativo porcentual.....	154

LISTA DE SIGLAS, ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

Å	Ångström (Unidad de medida)
ACN	Acetonitrilo
AcNH₄⁺	Acetato de Amonio
AM1	Austin Model 1
AMBER	Assisted Model Building With Energy Refinement
AP	Afinidad Protónica
APCI	Atmospheric Pressure Chemical Ionization
CC	Cluster Acoplados
CHARMM	Chemistry at Harvard Macromolecular Mechanics
CI	Interacción de la Configuraciones
CID	Collision Induced Dissociation
CYP	Citocromo P450
EI	Energía de Ionización
EPA	Environmental Protection Agency
ESI	Electrospray Ionization
FMO	Frontier molecular orbitals
GC – MS	Cromatógrafo de Gases acoplado a Espectrómetro de masas
GVB	Enlace de Valencia generalizada
HF	Aproximación de Hartree Fock
HOMO	Highest Occupied Molecular Orbital
HPLC	High-performance liquid chromatography
IE	Impacto Electronico
LC – MS	Cromatógrafo de Líquidos acoplado a Espectrómetro de masas
log BCF	Logaritmo del Factor de Bioconcentración
log P	Logaritmo del Coeficiente de Partición Octanol – Agua
LUMO	Lowest Unoccupied Molecular Orbital
MALDI	Matrix-assisted laser desorption - ionization
MCSCF	Campo Auto Consistente Multiconfiguracional
MeOH	Metanol
MINDO	Modified Intermediate Neglect of Differential Overlap
MNDO	Modified Neglect of Diatomic Overlap
MP	Moller Plesset
OM	Orbitales Moleculares
PBO	Butóxido de Piperonilo
PI	Potencial de Ionización
PM	Peso Molecular
PM3	Parameterizacion method 3
ppm	partes por millón
QM/MM	Quantum Mechanics/Molecular Mechanics
QSAR	Quantitative Structure – Activity Relationship

QSPR	Quantitative Structure – Property Relationship
QSTR	Quantitative Structure Toxicology Relationship
RHF	Hartree Fock Restricto
RMS	Root Mean Square (Valor Cadrático medio)
ROHF	Hartree Fock de Capa Abierta Restricta
SARs	Relación Estructura Actividad
SCF	Self-Consistent Field
SIM	Monitoreo Ion Selectivo
STO	Orbitales Tipo Slater
UHF	Hartree Fock no Restricta
ZPE	Energía del Punto Cero
E_{H-L}	Diferencia de Energía HOMO – LUMO

1. INTRODUCCIÓN

La espectrometría de masas se ha destacado de entre otras técnicas analíticas por características como su sensibilidad, detección límite, velocidad y diversidad de sus aplicaciones (Hoffmann y Stroobant, 2007). Constituye una técnica muy potente para el estudio de compuestos de interés en ciencias químicas y química ambiental como en otros campos entre los cuales podemos incluir la farmacología, biología, bioquímica, etc. (Takáts et al., 2005).

La importancia de esta herramienta es su capacidad para proveer información estructural con muy poca cantidad de muestra. Los esquemas de fragmentación dependen de las energías internas de los mismos, y en este punto, la asociación con herramientas de la química computacional provee información sobre los esquemas más probables de la fragmentación de los compuestos en estudio (Fleet et al., 1993).

La espectrometría de masas se basa en el movimiento de iones en un campo eléctrico/magnético: Las relaciones masa/carga de dichos iones condicionan su desplazamiento en los espectrómetros y esta condición es la que permite su detección y consiguiente asignación de masas. Las formas de ionizar a las moléculas neutras son fuertemente dependientes de la naturaleza del analito y del dispositivo experimental con la que se realice, desde un impacto de electrones hasta la técnica MALDI, existen diversas metodologías que apuntan a sustraer/introducir un electrón por colisión o a transferir/extraer protones u otros iones simples como Na^+ , K^+ . Todos estos procesos son dependientes, además de la naturaleza química de la sustancia y la estabilidad de los iones formados, de factores externos como la temperatura, el tipo de agente de colisión y la energía cinética que se les aplica a los mismos (McLafferty y Turecek, 1993).

Para una familia química dada, con una variación de sustituyentes en un entorno químico común puede estudiarse, vía espectrometría de masas, una dependencia entre cada molécula y un valor de energía de impacto crítico (IE-Impacto electrónico o CID-Collision Induced Dissociation) donde comienzan los procesos de fragmentación. Existen estudios que reportan y comparan conjuntamente la estabilidad relativa de familias químicas frente a la ionización/fragmentación vía espectrométrica y vía modelado energético con herramientas de la química teórica tanto para la molécula precursora como sus iones.

Asimismo estos resultados se aplican de manera práctica al análisis químico ambiental, para seleccionar condiciones instrumentales que apunten a la detección de contaminantes en matrices como aguas y suelos, logrando la mayor población de iones posible ya sea en su estado primario o de sus fragmentos, en procesos de identificación y cuantificación (Richardson, 2000).

1.1 Justificación

La espectrometría de masas constituye una potente herramienta para el estudio de compuestos de interés en química y fisicoquímica ambiental, por su capacidad para proveer información estructural con muy poca cantidad de muestra.

Los esquemas de fragmentación dependen de las energías internas de los mismos, y en este punto, la asociación con herramientas de la química computacional provee información sobre los esquemas más probables de la fragmentación de los compuestos en estudio. La aplicación práctica resultante de la combinación de estas dos valiosas herramientas en el análisis químico ambiental se da para seleccionar condiciones instrumentales que apunten a la detección de contaminantes en matrices como aguas y suelos, logrando la mayor población de iones posible ya sea en su estado primario o de sus fragmentos, en procesos de identificación y cuantificación, así como proveer información fisicoquímica en el estudio de estos contaminantes.

1.2 Objetivos

1.2.1 Objetivo General

Integrar metodologías experimentales de espectrometría de masas con herramientas teórico-computacionales en el análisis de una familia de compuestos de interés ambiental para lograr optimizar técnicas analíticas de cuantificación de estos compuestos en aguas y suelos y en estudios toxicológicos.

1.2.2 Objetivos Específicos

- a) Estudiar computacionalmente las distintas estructuras de los piretroides para lograr obtener las estructuras geométricas optimizadas, tanto de las moléculas en su estado fundamental, de los iones protonados/desprotonados y de las potenciales especies resultantes del impacto electrónico en el espectrómetro de masas.
- b) Determinar experimentalmente las energías de ionización críticas resultantes de las fragmentaciones por LC-MS, utilizando las fuentes de ionización ESI y APCI.
- c) Determinar la dependencia de las poblaciones iónicas frente a distintas energías de fragmentación y el efecto de la temperatura en el sistema LC-MS estudiado.
- d) Seleccionar las mejores condiciones instrumentales para el análisis químico-instrumental de muestras mediante la determinación de la facilidad de ionización por una u otra técnica
- e) Realizar estudios de correlación estructura – reactividad y obtener un modelo que relacione las propiedades fisicoquímicas y actividades biológicas, utilizando los parámetros energéticos de las estructuras moleculares optimizadas.

1.3 Hipótesis

Los compuestos de interés ambiental como los pertenecientes a la familia de los piretroides pueden ser cuantificados en matrices ambientales como agua y suelo utilizando metodologías analíticas cromatográficas-detección masa, previamente

optimizadas mediante la combinación de herramientas experimentales de espectrometría de masas y de química teórica computacional.

Las respuestas observadas en la aparición de los distintos iones en la espectrometría de masas guardan estrecha relación con la energía de las moléculas en estudio como de sus características estructurales.

2. MARCO TEÓRICO

2.1 Antecedentes

Se ha establecido una fructífera interacción entre la química teórica y la experimental, de tal manera que hoy día la química cuántica se ha convertido en una técnica complementaria muy útil para el área de la química iónica en fase gaseosa, que corresponde al campo explorado por la espectrometría de masas (Alcamí et al., 2002). Combinados, los métodos teórico y experimental, permiten comprender como durante la formación de los iones moleculares en fase gaseosa va acompañada de una reorganización drástica de la densidad de carga del sistema, manifestada por el debilitamiento o fortalecimiento de enlaces, lo que da lugar a la ruptura de enlaces en sitios específicos de la molécula durante la fragmentación, y a la formación de iones fragmentos más estables que otros, dando una idea del esquema de fragmentación más probable que tendrá lugar en la cámara de ionización (Gross, 2011).

En un estudio se ha observado un estrecho relacionamiento entre la energía molecular y la espectrometría de masas (Marino, 2009), estableciéndose que la energía de una molécula puede interpretarse en términos de las distribuciones iónicas del espectrómetro de masas, es decir, se establece un comportamiento en la ionización como consecuencia de las propiedades intrínsecas de las moléculas, tanto energéticas como estructurales.

Existen numerosos estudios que hacen referencia a las vías de fragmentación más probables de los compuestos relativos a la familia de los piretroides (Pattenden et al., 1973; Fleet y Monaghan, 1997; Fleet et al., 1993) y que tienen lugar en el espectrómetro de masas. En estos trabajos se exponen posibles mecanismos y vías de

fragmentación, lo que da lugar a una mejor interpretación de los espectros de masas de los compuestos considerados y constituyen una útil referencia, ya que al asociar estos datos con herramientas de la química computacional, se respalda la idea de la estabilidad de los iones moleculares y de los fragmentos iónicos que se forman.

Los piretroides son un grupo de compuestos, derivados sintéticos de las piretrinas, que conservan la estructura base de estos, es decir un ácido crisantémico unido por unión éster a un alcohol, pero que han incorporado ciertas modificaciones de tal manera a mejorar su estabilidad y actividad biológica, manteniendo su baja toxicidad a vertebrados terrestres (Schleier y Peterson, 2011). En los últimos años, el uso de los piretroides, tanto en la agricultura como en áreas urbanas, se ha incrementado en remplazo de otros compuestos como los organofosforados que exhiben características que hacen que su utilización sea mayormente regulada. Sin embargo, es conocida la alta toxicidad de los piretroides para con los animales acuáticos (Mauck et al., 1976) y además también se ha demostrado su bioacumulación en mamíferos marinos (Alonso et al., 2012). Por su alta hidrofobicidad, los piretroides tienden a ser adsorbidos en el material particulado presente en los cursos de agua. Como el uso de este tipo de compuestos está en constante aumento, es necesario contar con métodos lo suficientemente sensibles para su medición a concentraciones relevantes ambientalmente en muestras como agua, suelo y sedimentos (Hladik et al., 2009). La espectrometría de masas constituye una técnica muy potente en el estudio de este tipo de moléculas.

2.2 Química Computacional

2.2.1 Introducción a la Química Computacional

La química computacional simula estructuras o reacciones químicas de forma numérica, basadas total o parcialmente en las leyes de la física. Esto permite el estudio de fenómenos químicos a través de cálculos en computadoras, en lugar de examinar reacciones y compuestos experimentalmente. De esta manera es posible modelar no solo moléculas estables, sino también estructuras de vida media muy corta, intermediarios de reacción inestables y estados de transición, lo que permitiría obtener información sobre este tipo de estructuras como también de reacciones en las

que participan, considerando que muchas veces esto es imposible a través de observaciones directas. La química computacional por lo tanto, constituye un área independiente de investigación, como también un importante complemento a la química experimental (Foresman et al., 1996).

Los cálculos básicos que pueden llevarse a cabo son:

- El cálculo de la energía de una estructura molecular particular, dada por la disposición de los átomos o de los núcleos y los electrones.
- La optimización de las geometrías moleculares, que requiere hallar la estructura molecular de menor energía. Este proceso depende primariamente del gradiente de la energía total, es decir, la primera derivada de la energía respecto a las posiciones atómicas.
- El cálculo de las frecuencias vibracionales de moléculas, resultante del movimiento interatómico dentro de la molécula. Las frecuencias dependen de la segunda derivada de la energía respecto a la estructura atómica en el entorno del mínimo de energía potencial.

Existen dos grandes áreas dentro de la química computacional para el estudio de la estructura de las moléculas y su reactividad: la mecánica molecular y los métodos de estructura electrónica.

2.2.2 Mecánica Molecular

La mecánica molecular utiliza las leyes de la física clásica para predecir estructuras y propiedades de las moléculas. Cada uno de los diferentes métodos de mecánica molecular está caracterizado por un particular campo de fuerza, que posee los siguientes componentes (Foresman et al., 1996):

- Un conjunto de ecuaciones que define como la energía potencial de una molécula varía con la localización de sus componentes atómicos.
- Una serie de átomos tipo, que definen las características de un elemento dentro de un contexto químico específico.

- Uno o más conjuntos de parámetros que ajustan las ecuaciones y los tipos atómicos a datos experimentales, definidos por las constantes de fuerza, que son valores usados en las ecuaciones para relacionar las características atómicas a los componentes energéticos y datos estructurales tales como la longitud de los enlaces y los ángulos.

La presunción fundamental del método de Mecánica Molecular es la transferibilidad de los parámetros, y para que estos sean buenos descriptores de la molécula, los campos de fuerza describen tipos atómicos, y en algunos casos se describen parámetros para los átomos dentro de los distintos grupos funcionales.

La expresión de la energía consiste en la suma de ecuaciones clásicas simples, que describen varios aspectos de la molécula, tales como la extensión de los enlaces, flexión de los enlaces, torsiones, interacciones electrostáticas, fuerzas de Van Der Waals y enlaces de Hidrógeno. Los campos de fuerza difieren en el número de términos en la expresión de la energía, la complejidad de estos términos y la manera en la cual las constantes son obtenidas.

De forma general, la energía del campo de fuerza (E_{FF}) resulta de la suma de varios términos, cada uno describiendo la energía requerida para la distorsión de la molécula en una forma específica:

$$E_{FF} = E_{str} + E_{bend} + E_{tors} + E_{vdw} + E_{el} + E_{cross} \quad (2.1)$$

donde:

E_{str} es la función de la energía para el estiramiento de un enlace entre dos átomos; E_{bend} representa la energía requerida para la flexión de un ángulo;

E_{tors} es la energía de torsión para la rotación en torno a un enlace;

E_{vdw} y E_{el} describen las interacciones átomo – átomo no enlazantes, y

E_{cross} describe el acoplamiento entre los tres primeros términos.

En la Figura 2.1 se esquematizan los términos fundamentales de un campo de fuerza.

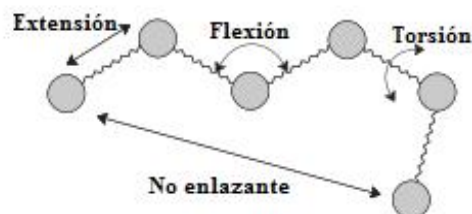


Figura 2.1: Esquematación de los principales términos de la energía de un campo de fuerza (Jensen, 2007).

Los términos en la expresión de la energía que describen el aspecto concerniente a la forma de la molécula, tales como la extensión del enlace, la flexión angular, la inversión del anillo o el movimiento torsional, son llamados términos de valencia. Todos los campos de fuerza tienen por lo menos un término de valencia y la mayoría tiene tres o más.

Los términos, en la expresión de la energía, referidos a como un movimiento de la molécula afecta a otra se llaman términos de entrecruzamientos. Un término de entrecruzamiento comúnmente utilizado es el llamado término de flexión – extensión, que describe como las longitudes de enlace en el equilibrio tienden a cambiar, cuando los ángulos de enlace son cambiados (Young, 2001).

Los campos de fuerza pueden o no incluir términos electrostáticos. Los términos electrostáticos mayormente utilizan el término de la ley de Coulomb para la energía de atracción o repulsión entre centros cargados. El modelado de moléculas con una carga neta es mejor descrito mediante el uso de tipos atómicos parametrizados para la descripción de centros cargados. A veces, una constante dieléctrica es incorporada para modelar los efectos de solvatación.

La extensión de los enlaces está principalmente descrita a través de la ecuación del oscilador armónico o por potenciales tales como el de Morse, y con menor frecuencia por el potencial de Leonard Jones o un potencial cuántico resultante de resolver la componente electrónica de la función de onda en la ecuación de Schrödinger.

La flexión del enlace es descrita a través de una ecuación armónica. La rotación de enlace se describe generalmente a través de una expresión coseno, debido a que la función de la energía de torsión debe ser periódica en el ángulo considerado, de tal manera a que si el ángulo es rotado 360° la energía retorna al mismo valor (Jensen, 2007). En la Figura 2.2 se observa el comportamiento de la energía debido a la conformación en torno a un enlace simple representado por una función coseno.

Las fuerzas intermoleculares como las fuerzas de Van Der Waals y los enlaces de hidrógeno, son a menudo descritas por la ecuación de Leonard Jones. Algunos campos de fuerza usan también un término combinado de flexión – extensión.

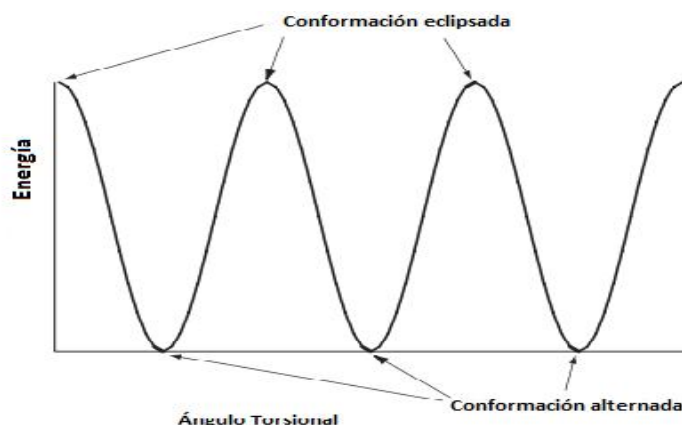


Figura 2.2: Energía de torsión debido a la conformación alrededor de una enlace simple según una función coseno (Young, 2001).

Las constantes de la expresión de la energía en los diferentes campos de fuerza varían según la elección del sistema de unidades, el cero de la energía y los procedimientos de ajuste numéricos.

Algunas formas matemáticas del término energético utilizado en los campos de fuerza más populares están dadas en la Tabla 2.1.

Tabla 2.1: Términos energéticos de campos de fuerza comúnmente utilizados (Young, 2001).

Nombre	Uso	Término energético
Armónico	Extensión de enlace	$k(l - l_0)^2$
Armónico	Flexión angular	$k(\theta - \theta_0)^2$
Coseno	Torsión	$k[1 + \cos(n\theta)]$
Leonard – Jones 6 – 12	Van der Waals	$4k \left(\frac{A}{r} \right)^{12} - \left(\frac{B}{r} \right)^6$
Leonard – Jones 10 – 12	Van der Waals	$4k \left(\frac{A}{r} \right)^{12} - \left(\frac{B}{r} \right)^{10}$
Coulomb	Electrostático	$\frac{q_1 q_2}{4\pi\epsilon_0 r}$
Taylor	Extensión – Flexión	$k(\theta - \theta_0)[(l_1 - l_{1_0})(l_2 - l_{2_0})]$
Morse	Extensión de enlace	$D_e [1 - e^{-\gamma(l - l_0)}]^2$

l : longitud de enlace; θ : ángulo de enlace; k , A , B : constantes particulares al elemento en un cierto estado de hibridación; n : un número entero; r : distancia de átomos no enlazados; q : carga; D_e : energía de disociación.

Todas las constantes en las distintas expresiones de energía deberían de obtenerse a partir de datos experimentales o de cálculos de primeros principios (Ab initio). Un método de mecánica molecular puede ser parametrizado para una clase específica de molécula como para una proteína o un nucleótido, para los que se espera que no den resultados relevantes para otras proteínas o nucleótidos. Otros campos de fuerza están parametrizados para dar una razonable descripción de una amplia gama de compuestos orgánicos.

Existen también unos pocos campos de fuerza que han sido parametrizados para todos los elementos. Algunos campos de fuerza simplifican los cálculos omitiendo la mayoría de los átomos de hidrógeno y son los llamados campos de fuerza de átomos unidos o métodos de hidrógenos intrínsecos. Algunos campos de fuerzas tienen tipos atómicos para ser usados tanto con hidrógenos implícitos como con hidrógenos explícitos.

La elección de los procedimientos de ajuste es importante porque determina que contribución tiene cada proceso en la expresión de la energía, así un campo de

fuerza puede ser mejor en la predicción de los movimientos vibracionales o en las fuerzas intermoleculares (Young, 2001).

Los cálculos de mecánica molecular no tratan los electrones de una manera explícita dentro de un sistema molecular, sino que los cálculos se realizan en base a las interacciones entre los núcleos. Los efectos electrónicos están implícitamente incluidos en los campos de fuerza a través de la parametrización que se emplee (Foresman et al., 1996).

Esta aproximación de la mecánica molecular presenta la ventaja de que los cálculos son computacionalmente de bajo costo, lo que permite su utilización en sistemas moleculares muy grandes en número de átomos. Sin embargo, también presenta limitaciones, como que cada campo de fuerza está limitado para ciertas clases de moléculas, relacionadas con aquellas que han sido parametrizadas. Además, con este método no pueden ser tratados problemas donde los efectos electrónicos son los predominantes, tales como aquellos que involucran la formación o escisión de enlaces, así como las propiedades moleculares que presentan dependencia con los detalles electrónicos (Foresman et al., 1996).

Los métodos de mecánica molecular no son generalmente aplicables a estructuras lejos del equilibrio como los estados de transición. Los cálculos que usan expresiones algebraicas para describir los caminos de reacción y estructuras de transición son usualmente algoritmos semiclásicos. Estos cálculos usan un ajuste de la expresión de la energía a una superficie de energía potencial *ab initio* para la reacción exacta, en lugar de usar los mismos parámetros para cada molécula (Young, 2001).

Algunos campos de fuerzas de la mecánica molecular utilizados comúnmente son:

- AMBER (*assisted model building with energy refinement*): parametrizado específicamente para proteínas y ácido nucleicos. Utiliza cinco términos de enlace y no enlazantes, junto con un sofisticado tratamiento electrostático. Los términos de entrecruzamiento no están incluidos.

- CHARMM (*Chemistry at Harvard macromolecular mechanics*): inicialmente disponible para proteínas y ácidos nucleicos, actualmente son aplicados a un gran rango de biomoléculas, dinámica molecular, solvatación, empaques cristalinos, análisis vibracional y estudios QM/MM. CHARMM utiliza cinco términos de valencia, uno de los cuales es un término electrostático.
- CFF (*Consistent force field*): desarrollado para obtener con precisión consistente los resultados de conformaciones, espectros vibracionales, energía de deformación y entalpía vibracional de proteínas. Estos campos de fuerza utilizan cinco o seis términos de valencia, uno de los cuales es un término electrostático, y cuatro a seis términos de entrecruzamiento.
- CHEAT (*Carbohydrate hydroxyls represented by external atoms*): es un campo de fuerza diseñado específicamente para el modelado de carbohidratos.
- MM1, MM2, MM3, MM4: son campos de fuerza usados en general para moléculas orgánicas. Existen muchas variantes de los métodos originales, particularmente del MM2. El método MM3 es probablemente uno de los métodos de mayor exactitud para el modelado de carbohidratos. MMX y MM+ son variaciones del MM2. Estos campos de fuerza utilizan cinco a seis términos de valencia, uno de los cuales es un término electrostático, y de uno a nueve términos de entrecruzamiento.

2.2.3 Métodos de estructura electrónica

Los cálculos se basan en las leyes de la mecánica cuántica en lugar de las de la física clásica. La mecánica cuántica establece que la energía y otras propiedades relacionadas de la molécula pueden ser obtenidas mediante la solución de la ecuación de Schrödinger: $H\Psi = E\Psi$. Sin embargo, excepto para los sistemas más pequeños, la solución exacta de la ecuación de Schrödinger no es viable, siendo este problema común a sistemas de muchos cuerpos. Por este motivo los métodos de estructura electrónica son caracterizados por la utilización de aproximaciones matemáticas para tratar la ecuación de Schrödinger.

Los principales tipos de métodos para tratar la estructura electrónica son las técnicas Semi empíricas, Ab Initio y los métodos de la Teoría Funcional de la Densidad (Foresman et al., 1996).

A continuación se describen los principales métodos o técnicas que se pueden emplear en este tipo de estudio.

2.2.3.1 Métodos semiempíricos

Utilizan parámetros derivados de datos experimentales o de cálculos *ab initio*, para simplificar los cálculos, con lo que se da una solución aproximada a la ecuación de Schrödinger, lo que depende de la disponibilidad de los parámetros apropiados para el tipo de sistema químico estudiado.

Estos métodos tienen un costo computacional relativamente bajo y provee una descripción cualitativa razonable de los sistemas moleculares y predicciones bastante exactas de las energías y estructuras para los sistemas para los que existan un conjunto adecuado de parámetros. Además pueden ser mucho más rápidos que los métodos *ab initio* (Foresman et al., 1996). Sin embargo, si la molécula en estudio es significativamente diferente de las que están incluidas en la parametrización, los resultados obtenidos pueden ser muy pobres.

Generalmente los electrones internos no están incluidos explícitamente en los cálculos y solo se utiliza un conjunto mínimo de bases. También se omiten algunas de las integrales de dos electrones. Para corregir los errores introducidos por la omisión de ciertas partes en los cálculos, se introducen distintos parámetros en función de qué tipo de propiedades se desean calcular.

Los cálculos semiempíricos se han utilizado de forma exitosa para la descripción de moléculas orgánicas, que tienen solo unos pocos átomos repetidos en la estructura y de moderado tamaño.

Los métodos semiempíricos utilizados más comúnmente son los siguientes:

- **Método de Hückel:** es uno de los primeros y más simples de los métodos semiempíricos. Modela sólo los electrones de valencia en polienos conjugados

planares o moléculas aromáticas planas, o moléculas en los que haya presente heteroátomos distintos a los de carbono. Los OM se aproximan mediante la combinación lineal de los orbitales atómicos del tipo 2p perpendiculares al plano molecular y los coeficientes de la combinación lineal se obtienen a partir del teorema variacional, generándose un sistema de ecuaciones lineales con tantos sumandos como orbitales se combinen. Hay tantas ecuaciones como OM y cada suma es igual a cero. La solución de este sistema de ecuaciones es posible sólo si el determinante de los coeficientes es cero. A este determinante se le llama determinante secular. Para resolver el determinante secular sólo se tienen en cuenta las integrales monocéntricas (integrales coulombicas) o entre núcleos vecinos en la molécula (integrales de resonancia) y se desprecian las integrales de solapamiento entre las densidades electrónicas de átomos vecinos.

Los cálculos de Hückel reflejan la simetría orbital y predicen cualitativamente los coeficientes orbitales, pudiendo dar de esta manera, información cualitativa. Raramente es utilizado hoy en día en cálculos teóricos, pero se mantiene su enseñanza en los ciclos de fisicoquímica básica de grado.

- **Método de Hückel extendido:** es un medio para modelar los orbitales de valencia basado en el solapamiento orbital, la afinidad electrónica experimental y los potenciales de ionización. Al igual que en el método de Hückel sencillo, los OM se aproximan mediante la combinación lineal de los orbitales atómicos de valencia de los átomos y se calculan los coeficientes mediante el teorema variacional. La ventaja con respecto al método de Hückel es que se puede modelar todos los orbitales de valencia. Sin embargo es un método pobre para predecir las geometrías moleculares.
- **CNDO (*complete neglect of differential overlap*):** modela los orbitales de valencia utilizando un conjunto de bases mínimo de orbitales tipo Slater (STO). Los métodos CNDO son utilizados a veces para generar estimaciones iniciales para los cálculos ab initio de carbohidratos.
- **MINDO (*modified intermediate neglect of differential overlap*):** con sus tres modificaciones MINDO/1, MINDO/2 y MINDO/3. Se han obtenido resultados

cualitativos para moléculas orgánicas con este método y a veces se lo utiliza para obtener una estimación inicial para los cálculos *ab initio*. El MINDO fue parametrizado para reproducir las entalpías de formación de compuestos orgánicos.

- **MNDO (*modified neglect of diatomic overlap*)**: da resultados cualitativos razonables para muchos sistemas orgánicos. Una variación del MNDO es el MNDO/d, que es una formulación equivalente que incluye los orbitales *d*. Esto mejora la predicción de la geometría de moléculas hipervalentes. Este método es a veces utilizado para modelar sistemas que incluyen metales de transición, sin embargo la exactitud es altamente dependiente del sistema individual estudiado. Otra variación, el MNDOC incluye la correlación electrónica.
- **AM1 (*Austin Model I*)**: utilizado popularmente para el modelado de compuestos orgánicos. El AM1 predice los calores de formación (H_f) de manera más exacta que el método MNDO. Dependiendo de la naturaleza del sistema y la información deseada, tanto el método AM1 como el PM3 dan los resultados de mayor exactitud para compuestos orgánicos, mediante la utilización de métodos semiempíricos.

Existen ventajas y limitaciones conocidas en los resultados obtenidos con los métodos AM1. Las energías de activación son mejoradas con respecto a las obtenidas con los métodos MNDO, se predicen enlaces de hidrógeno con una correcta aproximación de la extensión, pero generalmente de orientación incorrecta; la predicción obtenida de moléculas hipervalentes es mejorada con respecto a resultados con MNDO, pero aún con errores significativamente grandes con respecto a otros tipos de compuestos.

La predicción de barreras rotacionales es muy pequeña con respecto a los valores reales, mientras que se predice una alta estabilidad para anillos de cinco miembros. Las geometrías que involucran átomos de fósforo se predicen pobremente. Los enlaces peróxidos son muy cortos, de aproximadamente 0,17 Å.

Existen errores sistemáticos en la predicción de las energías de grupos alquilo, asumiéndose una alta estabilidad de los mismos. Los nitrocompuestos son sistemáticamente muy inestables. En general, el método AM1 predice energías y

geometrías mejoradas respecto a los resultados obtenidos con los métodos MNDO, sin embargo, no muy buenos como los obtenidos con el método PM3. Las entalpías de enlace calculadas son considerablemente bajas (Young, 2001; Jensen, 2007).

- **PM3 (*Parameterization method 3*)**: o método paramétrico 3 (los métodos 1 y 2 corresponden al MNDO y al AM1), utiliza ecuaciones muy cercanas a las utilizadas en el método AM1, como resultado de la reparametrización de este último. La diferencia entre el AM1 y el PM3 es que las integrales de repulsión electrónica monocéntricas se tornan como parámetros a optimizar (en lugar de obtenerlas a partir de datos espectrales atómicos).

La función de repulsión de core contiene solamente dos términos gaussianos por átomo. Estos parámetros gaussianos fueron incluidos como una parte integral del modelo, por lo que se permitió su libre variación. Por lo que el método así resultante es esencialmente el AM1 con todos los parámetros totalmente optimizados.

De cierta manera es el mejor conjunto de parámetros para un conjunto dado de datos experimentales. Es también muy popular para sistemas orgánicos, presentando varias ventajas como que los calores de formación obtenidos son más exactos que aquellos obtenidos con MNDO o AM1. La predicción de moléculas hipervalentes es también realizada con mayor exactitud.

Algunas limitaciones conocidas del modelo PM3 son que los enlaces de hidrógeno resultantes son muy cortos, de aproximadamente 0,1 Å, al igual que los enlaces de Si con átomos de haluros, que también resultan subestimados. El PM3 tiende a predecir los compuestos de nitrógeno sp^3 como piramidales, contrariamente a lo observado experimentalmente, además la carga en los átomos de nitrógeno es a menudo de signo incorrecto, mientras que su magnitud resulta ser irreal.

La afinidad protónica no es exacta y las distancias no enlazantes son muy cortas. En general, el PM3 predice energías y longitudes de enlace más exactamente que los métodos AM1 y MNDO. Junto con el método AM1, son los

más populares dentro de los métodos semi empíricos debido a la disponibilidad de algoritmos que incluyen efectos de solvatación en los cálculos (Levine, 2001; Young, 2001; Jensen, 2007).

2.2.3.2 Métodos *ab initio*

Para el cálculo de la solución de la ecuación de Schrödinger utilizan una serie de aproximaciones matemáticas rigurosas. No utilizan parámetros derivados de datos experimentales, sino que están basados solamente en las leyes de de la mecánica cuántica y en los valores de un pequeño número de constantes físicas, como la velocidad de la luz, los valores de masa y carga del electrón y del protón y la constante de Plank.

Con los métodos *ab initio* es posible obtener predicciones cuantitativas de alta calidad para un amplio rango de sistemas. Los primeros programas desarrollados con el método *ab initio* tenían una alta limitación por el tamaño del sistema tratado, sin embargo, con los actuales programas *ab initio* modernos es posible el tratamiento de moléculas de mayor tamaño con un costo computacional razonable (Foresman et al., 1996).

a) Aproximación de Hartree – Fock (HF)

La dinámica de sistemas de muchos electrones es muy compleja, por lo que requiere métodos computacionales elaborados. Una significativa simplificación, tanto conceptualmente como computacionalmente, puede ser obtenido por la introducción de modelos partícula – independientes, donde el movimiento de un electrón es considerado independiente de la dinámica de otros electrones (Cramer, 2005).

La solución exacta para la ecuación de Schrödinger no es posible para la mayoría de los sistemas moleculares triviales. Sin embargo, pueden ser hechas una serie de suposiciones y procedimientos para obtener una solución aproximada para la mayor cantidad posible de moléculas.

- **Orbitales moleculares:** la primera aproximación a ser considerada resulta de la interpretación de $|\Psi|^2$ como la densidad de probabilidad para los electrones dentro de un sistema. La teoría de orbitales moleculares descompone Ψ en una combinación de orbitales moleculares (OM) w_1, w_2, \dots . Para cumplir con las condiciones de función de onda, deben ser elegidos conjuntos de OM normalizados y ortogonales, para lo cual se obtiene el producto de Hartree:

$$\Psi(\mathbf{r}) = w_1(r_1) w_2(r_2) \dots w_n(r_n) \quad (2.2)$$

sin embargo, esta función no es antisimétrica.

- **Spin electrón:** la función antisimétrica más simple resultante de la combinación de OM es un determinante. Debe ser introducido un factor, no tenido en cuenta anteriormente, que es el spin electrón. Los electrones pueden tener un spin para arriba (+1/2) o para abajo (-1/2). Se define la función spin \uparrow y \downarrow como sigue:

$$\begin{array}{ll} r(\uparrow) = 1 & r(\downarrow) = 0 \\ s(\uparrow) = 0 & s(\downarrow) = 1 \end{array}$$

Multiplicando una función OM por \uparrow ó \downarrow , se incluye el spin electrón como parte de la función de onda electrónica total Ψ . Este producto se define como orbital spin, una función que incluye tanto la localización del electrón como su spin.

El orbital spin también es ortonormal cuando sus componentes orbitales moleculares lo son. Se construye una función de onda de capa cerrada definiendo $n/2$ OM para un sistema de n electrones y asignando los electrones a estos orbitales en pares de spines opuestos, de tal manera a que se represente en forma de un determinante. Cada fila del determinante está representada por todas las posibles asignaciones del electrón i en todas las combinaciones de orbital spin. De esta manera, el determinante mezcla todos los posibles orbitales de todos los electrones en el sistema molecular para formar la función de onda, cumpliéndose que la

localización de un electrón no está determinada sino que consiste en una densidad de probabilidad, por lo que podría estar en cualquier lugar.

- **Conjunto de bases:** la siguiente aproximación involucra la expresión de los OM como combinaciones lineales de un conjunto predefinido de funciones de un electrón conocido como funciones de base. Las funciones de base normalmente están centradas en el núcleo atómico, lo que recuerda a los orbitales atómicos.

Un OM individual puede ser definido como: $\psi_j = \sum_{i=1}^N c_{ji} \phi_i$ donde los coeficientes c_{ji} son conocidos como coeficientes de expansión del OM.

El programa *Gaussian* y otros programas de estructura electrónica *ab initio* utilizan funciones atómicas tipo gaussianas como funciones de base. Las funciones gaussianas tienen la forma general:

$$g(\vec{r}, \vec{r}_0) = c x^n y^m z^l e^{-\alpha r^2} \quad (2.3)$$

donde:

\vec{r} está compuesto por los componentes x, y, z ,

α es una constante que determina el tamaño de la función,

$e^{-\alpha r^2}$ es multiplicada por las potencias de x, y, z y una constante de normalización, de tal manera que $\int_{\text{todo el espacio}} g^2 = 1$, por lo tanto c depende de α, l, m y n .

La combinación lineal de las gaussianas primitivas son usadas para formar las funciones de base, denominadas gaussianas contraídas, y tienen la siguiente forma:

$$\phi_i = \sum_p d_{ip} g_p \quad (2.4)$$

donde:

d_{ip} son constantes fijas dentro del conjunto de bases.

Al incluir esta expresión en la de los OM, resulta en la siguiente expansión:

$$w_i = \sum_{\tilde{c}_i} c_{\tilde{c}_i} \tilde{t}_{\tilde{c}_i} = \sum_{\tilde{c}_i} c_{\tilde{c}_i} \left(\sum_p d_{\tilde{c}_i p} g_p \right) \quad (2.5)$$

- **El principio variacional:** establece que para el estado fundamental de cualquier función normalizada antisimétrica de coordenadas electrónicas, denotado por Ξ , el valor de la energía esperado será siempre mayor al valor de la energía de la función de onda exacta, de tal manera que: $E(\Xi) > E(\Psi); \Xi \neq \Psi$.

De esta manera, la energía de la función de onda exacta sirve como límite inferior para el valor de la energía calculada por cualquier otra función antisimétrica normalizada. El problema radica en encontrar los coeficientes que minimizan la energía de la función de onda resultante.

- **Las ecuaciones de Roothaan – Hall:** el principio variacional da la siguiente ecuación que describe los coeficientes de expansión orbital, c_{vi} , derivado por Roothaan y Hall.

$$\sum_{v=1}^N (F_{\tilde{c}_i} - v_i S_{\tilde{c}_i}) c_{\tilde{c}_i} = 0 \rightarrow \tilde{c}_i = 1, 2, \dots, N \quad (2.6)$$

Esta ecuación re escrita en forma de matriz da $FC=SC$, donde cada elemento es una matriz. S es una matriz diagonal de las energías de los orbitales; y cada uno de sus elementos v_i es la energía de un electrón del OM \tilde{t}_i .

F es llamado matriz de Fock, y representa el efecto promedio del campo de todos los electrones en cada orbital. Para un sistema de capa cerrada, sus elementos son:

$$F_{\tilde{c}_i} = H_{\tilde{c}_i}^{core} + \sum_{j=1}^N \sum_{\dagger=1}^N P_{j\dagger} \left[\left(\frac{\tilde{c}_i \dagger}{j} \right) - \frac{1}{2} \left(\frac{\tilde{c}_i}{j \dagger} \right) \right] \quad (2.7)$$

donde:

$H_{\tilde{c}_i}^{core}$ es otra matriz que representa la energía de un solo electrón en el campo del núcleo desnudo y

P es la matriz densidad, definida como $P_{j\uparrow} = 2 \sum_{i=1}^{\text{ocupado}} c_{ji}^* c_{\uparrow i}$.

Los coeficientes son sumados sobre los orbitales ocupados solamente, y el factor 2 viene del hecho de que cada orbital contiene dos electrones.

El término $\left(\frac{-\epsilon}{j\uparrow} \right)$ significa la integral de repulsión de dos electrones. Bajo el tratamiento de HF cada electrón mira a todos los demás electrones como a una distribución promedio, no está incluida la interacción electrón – electrón instantánea. Los métodos de mayor nivel intentan remediar esta falencia de correlación electrónica de distintas maneras.

La matriz S es la matriz de solapamiento, que indica el solapamiento entre los orbitales.

Tanto la matriz de Fock como los orbitales dependen de los coeficientes de expansión. Por tanto, la ecuación $FC=SC$ no es lineal y debería ser solucionada iterativamente, por el procedimiento llamado método de Campo Auto Consistente (SCF, del Inglés *Self-Consistent Field*). En la convergencia, la energía es un mínimo.

La solución produce un conjunto de orbitales, tanto ocupados ($W_{i,j,\dots}$) y virtuales (desocupados, convencionalmente denotado como $W_{a,b,\dots}$). El número total de orbitales es igual al número de funciones de base usados (Foresman et al., 1996).

Los pasos en los cálculos de HF comienzan con una estimación inicial de los coeficientes de la combinación lineal de los orbitales, generalmente empleando como punto de partida un método semiempírico. Esta primera función es utilizada para calcular una energía y un nuevo conjunto de coeficientes, que pueden luego ser utilizados para obtener un nuevo conjunto de soluciones, y así sucesivamente. Este procedimiento continúa iterativamente hasta que la energía y los coeficientes de las combinaciones lineales permanezcan constantes de una iteración a la siguiente. Este procedimiento iterativo es llamado procedimiento de campo auto consistente (SCF).

Una variación en el procedimiento de HF es la manera en que los orbitales son construidos para reflejar los electrones apareados o desapareados. Si la molécula

tiene un spin singlete, una misma función orbital espacial puede ser utilizada tanto para los electrones de spin \uparrow y \downarrow en cada par, esto es llamado método de Hartree – Fock restringido (RHF).

Para moléculas con electrones desapareados existen dos técnicas para construir las funciones de onda HF. Una de ellas es usar conjuntos de orbitales completamente separados para los electrones \uparrow y \downarrow , lo que se llama función de onda Hartree - Fock no restringida (UHF). Esto introduce un error en el cálculo llamado contaminación de spin, que podría ser insignificante o suficientemente grande como para invalidar los resultados dependiendo del sistema químico involucrado.

La otra forma de construir las funciones de onda para moléculas de capa abierta es el método de Hartree – Fock de capa abierta restringida (ROHF), en donde los electrones apareados comparten el mismo espacio orbital por lo que no hay contaminación de spin (Young, 2001).

b) Métodos de Correlación Electrónica

Una de las limitaciones de los cálculos de HF es que no consideran la correlación electrónica debido a que el método tiene en cuenta el efecto promedio de la repulsión electrónica pero no considera la interacción electrón – electrón explícita.

Existe un gran número de métodos iniciados como cálculos de HF, y luego son corregidos por correlación. Algunos de estos métodos son la teoría de perturbación de Moller – Plesset (MP_n, donde n es el orden de la corrección), el método de enlace de valencia generalizada (GVB), el campo auto consistente multiconfiguracional (MCSCF), la interacción de configuraciones (CI) y la teoría de los cluster acoplados (CC). Todos estos métodos son referidos como cálculos de correlación. Incluyendo la corrección de la correlación generalmente se obtiene una mejora en la precisión de las energías calculadas y de las geometrías moleculares. En la bibliografía más reciente puede encontrarse información detallada sobre cada uno de estos métodos (Young, 2001; Foresman et al., 1996; Szabó y Ostlund, 1989; Jensen, 2007).

2.2.3.3. Métodos de la Teoría Funcional de la Densidad (DFT)

Los métodos basados en la Teoría Funcional de la Densidad derivan de las investigaciones de la mecánica cuántica realizadas en la década de 1920, resultantes especialmente del modelo de Thomas-Fermi-Dirac y del trabajo de Slater sobre química cuántica realizado en 1950 (Foresman et al., 1996).

Hohenberg y Kohn establecieron las bases modernas de la Teoría Funcional de la Densidad, enunciando en 1964 el teorema que afirma que la energía electrónica del estado fundamental está determinada completamente por la densidad electrónica ρ . Este teorema establece que existe una correspondencia entre la densidad electrónica de un sistema y su energía (Jensen, 2007).

El enfoque central de la Teoría Funcional de la Densidad, es la densidad electrónica ρ , en lugar de la función de onda Ψ . El termino Funcional viene del hecho de que la energía de la molécula es una función de la densidad electrónica $E(\rho)$, y la densidad electrónica, por sí misma es función de la posición $\rho(r)$ (Paula y Paula, 2007).

Estableciendo una comparación del teorema de Hohenberg y Kohn y la aproximación de la función de onda, en esta última, para un sistema de N electrones existen $4N$ variables, dados por las tres variables espaciales y una de la coordenada de spin para cada electrón. La densidad electrónica, sin embargo, es el cuadrado de la función de onda, integrada sobre $N - 1$ coordenadas electrónicas, y cada densidad de spin solo depende de tres coordenadas espaciales, independientemente del número de electrones. Es decir, mientras que la complejidad de una función de onda se incrementa exponencialmente con el número de electrones, la densidad electrónica tiene el mismo número de variables, independientemente del tamaño del sistema (Jensen, 2007).

La principal ventaja del uso de la densidad electrónica es que las integrales para la repulsión de Coulomb requieren ser hechas solo sobre la densidad electrónica, la que como ya se mencionó es una función tridimensional. Además, el método permite introducir correlaciones entre electrones. Estas características, finalmente

resultan en una mayor rapidez en los cálculos que los hechos por el método de Hartree Fock (HF), y en que los resultados son algo más exactos que los obtenidos por HF (Young, 2001).

El inconveniente con el empleo de la densidad electrónica radica en que si bien se ha probado que cada diferente densidad corresponde a una energía del estado fundamental, la función que conecta las dos cantidades es desconocida. Por tanto, el objetivo de los métodos DFT es el diseño de funcionales que conecten la densidad electrónica con la energía (Jensen, 2007).

La aproximación de los funcionales empleados por el método de la DFT, utiliza la partición de la energía electrónica en varios términos:

$$E = E^T + E^V + E^J + E^{XC} \quad (2.8)$$

donde:

E^T es el término correspondiente a la energía cinética (derivado del movimiento de los electrones),

E^V describe la energía potencial del sistema, resultante de la atracción núcleo – electrón y la repulsión entre pares de núcleos,

E^J es el término dado por la repulsión entre electrón – electrón (auto interacción de Coulomb de la densidad electrónica), y

E^{XC} corresponde al término de correlación – intercambio e incluye la parte remanente de las interacciones electrón – electrón.

Todos los términos, excepto el correspondiente a la repulsión núcleo – núcleo, son funciones de la densidad electrónica ρ . Los términos $E^T + E^V + E^J$ corresponden a la energía clásica de distribución de carga. El término E^{XC} tiene en cuenta los términos remanentes de la energía, es decir el intercambio de energía derivada de la anti simetría de la función de onda de la mecánica cuántica y la correlación dinámica en el movimiento de los electrones individuales. Hohenberg y Kohn demostraron que E^{XC} está determinado enteramente por la densidad electrónica y en la práctica es usualmente aproximada como una integral que involucra solo las densidades de spin y sus posibles gradientes.

$$E^{XC}(\dots) = \int f(\dots_r(\mathbf{r}), \dots_s(\mathbf{r}), \bar{V}_{\dots_r}(\mathbf{r}), \bar{V}_{\dots_s}(\mathbf{r})) d^3\mathbf{r} \quad (2.9)$$

donde:

\dots_r se refiere a la densidad del spin \uparrow ,

\dots_s a la densidad del spin \downarrow , y

ρ a la densidad electrónica total ($\dots_r + \dots_s$).

El término E^{XC} se divide generalmente en dos partes, referidas a la parte de *intercambio* y a la parte de *correlación*, que realmente corresponden a las interacciones del mismo spin y de la mezcla de spines respectivamente.

$$E^{XC}(\dots) = E^X(\rho) + E^C(\rho) \quad (2.10)$$

Los tres términos son funcionales de la densidad electrónica, siendo las funcionales que definen los términos del lado derecho de la ecuación, llamados *funcionales de intercambio* y *funcionales de correlación*, respectivamente. Los dos componentes pueden ser de dos tipos posibles: funcionales locales que dependen solo de la densidad electrónica ρ , y funcionales corregidos por gradiente, que dependen tanto de ρ como de su gradiente $\bar{V}\dots$ (Foresman et al., 1996).

Los funcionales de densidad pueden ser divididos en varias clases. El método más simple, es el llamado método X, en donde se incluye el funcional de intercambio electrónico, pero no el de correlación. La aproximación más simple a un problema completo, está basado solo en la densidad electrónica, llamado aproximación a la densidad local. Un conjunto más complejo de funcionales utiliza la densidad electrónica y su gradiente, estos métodos son los llamados corregidos por gradiente.

Los métodos DFT puros son definidos por la vinculación de un funcional de intercambio con un funcional de correlación. Por ejemplo, el funcional BLYP, resulta del par, funcional de intercambio corregido por gradiente de Becke por una parte, y por otra, del funcional de correlación corregido por gradiente de Lee, Yang y Parr.

Los métodos DFT híbridos resultan de la combinación lineal de otros funcionales con el método de HF, usualmente con integrales de intercambio. Son ejemplos, el método B3LYP, en donde el número 3 indica un funcional de tres parámetros de Becke, que son determinados por el ajuste a datos experimentales. Las versiones siguientes, llamadas B97 y B98 emplean 10 parámetros de ajuste, sin embargo las mejoras son muy pequeñas con respecto a la versión de tres parámetros (Jensen, 2007).

2.2.4 Modelos químicos

Un modelo teórico debería ser uniformemente aplicable a sistemas moleculares de cualquier tamaño y tipo, donde el tamaño máximo alcanzable debería ser determinado solo por la disponibilidad práctica de los recursos computacionales. Este principio, bajo el cual se fundamenta la filosofía teórica del *GAUSSIAN* tiene ciertas implicancias, como que el modelo teórico debe ser imparcial y unívocamente definido para cualquier configuración dada de núcleos y electrones.

En primer lugar al ser imparcial un modelo químico teórico, no debería basarse en presuposiciones acerca de estructuras moleculares o procesos químicos, lo que excluiría su aplicación a sistemas o fenómenos donde estas presunciones no se aplican. En segundo término, al estar unívocamente definido un modelo teórico, especificando la estructura molecular sin necesidad de dar otros parámetros, es posible obtener una solución aproximada de la ecuación de Schrödinger.

La implementación de un modelo teórico es lo que se denomina un modelo químico – teórico o simplemente modelo químico.

Una vez que el modelo teórico ha sido definido e implementado, debería ser sistemáticamente probado en una variedad de sistemas químicos, y los resultados obtenidos deberían ser comparados con valores experimentales. Cuando el modelo demuestre la reproducción de los resultados experimentales en el conjunto de sistemas químicos de prueba, el modelo podrá ser utilizado para la predicción de propiedades de sistemas para los cuales no existen datos disponibles.

Los modelos químicos se caracterizan por la combinación de un procedimiento teórico y un conjunto de bases. Cada par de combinación, el método teórico con el conjunto de bases, representa una diferente aproximación a la ecuación de Schrödinger.

El programa GAUSSIAN (Frisch et al., 2009), del que existen varias versiones, es un paquete de programas versátil, ampliamente usado, que incluye todos los métodos *ab initio* comunes como el HF, CI, funcional de la densidad, MP, o CC, y también incluye muchos métodos semiempíricos (Levine, 2001). De esta manera, el GAUSSIAN incluye muchos diferentes modelos químicos. Cada cálculo realizado con el GAUSSIAN, que es el programa utilizado en este trabajo, debe tener especificado el modelo químico teórico deseado, además de especificar el sistema molecular a considerar, y el cálculo a ser realizado. El programa contiene una jerarquía de procedimientos correspondiente a diferentes métodos de aproximación, que son referidos normalmente como niveles de teoría. Los métodos más exactos requieren, correspondientemente recursos computacionales más caros (Foresman et al., 1996).

2.2.4.1 Terminología

Los modelos químicos se describen mediante una nomenclatura convencional:

Método _ energía / conjunto de bases _ energía / /método _ geometría /conjunto de bases _ geometría

donde el modelo de la izquierda de la doble barra equivale al utilizado para el cálculo de la energía del sistema en estudio y el de la derecha corresponde al modelo utilizado para la optimización de la geometría.

Ejemplo: RHF/6-31+G(d,p) // RHF/6-31G(d), en donde el cálculo de la energía se ha realizado utilizando el nivel de teoría de Hartree-Fock y el conjunto de bases 6-31G(d,p), a una estructura previamente optimizada con el método de Hartree-Fock y el conjunto de bases de 6-31G(d).

2.2.4.2 Conjuntos de base

Un conjunto de base es una representación matemática del orbital molecular dentro de la molécula. Puede ser interpretado como restringido a cada electrón o a una región particular del espacio. Los conjuntos de base más grandes imponen menores restricciones a la ubicación de los electrones en el espacio, por tanto resultan ser aproximaciones más exactas a los orbitales moleculares. Ellos, sin embargo requieren correspondientemente mayores recursos computacionales.

Los conjuntos de base estándares para cálculos de estructura electrónica usan una combinación lineal de funciones gaussianas para formar los orbitales. Los conjuntos de bases asignan un grupo de funciones de bases a cada átomo dentro de la molécula para aproximarse a su orbital. Estas funciones de base, referidas como funciones contraídas, por sí mismas están constituidas de una combinación lineal de funciones gaussianas, y las componentes gaussianas de las funciones están referidas como primitivas. Una función de base consistente en una función gaussiana simple se llama no contraída.

- Conjuntos de base mínimos

Contienen el mínimo número de funciones de base necesarios para cada átomo. Ejemplo:

H: 1s

C: 1s, 2s, 2p_x, 2p_y, 2p_z

Los conjuntos de bases mínimos usan orbitales tipo atómicos ajustados al tamaño. El conjunto de bases STO-3G es un conjunto de bases mínimo que utiliza tres gaussianas primitivas por función de base y se aproxima a los orbitales tipo Slater (STO) con funciones gaussianas.

- Conjuntos de Bases de Valencia Desdoblada

Un conjunto de bases mínimo puede incrementarse en tamaño aumentando el número de funciones de base por átomo.

El conjunto de bases de doble zeta, forma todos los orbitales moleculares de combinaciones lineales de dos tamaños de funciones, por cada orbital atómico.

Ejemplo:

H: $1s$ $1s'$

C: $1s$, $2s$, $2s'$, $2p_x$, $2p_y$, $2p_z$, $2p_x'$, $2p_y'$, $2p_z'$

De forma similar, los conjuntos de base de triple zeta, tal como el 6-311G, utiliza tres tamaños de funciones contraídas por cada orbital tipo.

- Conjuntos de bases polarizadas

Permite el cambio de forma de cada orbital atómico, mediante el agregado de orbitales con momento angular además de los que son requeridos para la descripción del estado fundamental de cada átomo. Por ejemplo, un conjunto de bases polarizado agrega funciones d a átomos de Carbono y funciones f a metales de transición, y algunos de ellos agregan funciones p a átomos de Hidrógeno.

- Funciones difusas

Son funciones del tipo de las funciones s y p , pero de tamaños más grandes, lo que permite que los orbitales ocupen una región más grande en el espacio. Son importantes para sistemas donde los electrones están relativamente lejos del núcleo., como en moléculas con pares libres, aniones y otros sistemas con cargas negativas significativas, sistemas y sus estados excitados, sistemas con bajos potenciales de ionización, etc.

2.2.5 Relaciones tipo QSAR – QSPR

Uno de los dogmas más importantes de la química es que la formula estructural de cualquier compuesto contiene codificado dentro de sí, todas las propiedades químicas, físicas y biológicas de ese compuesto (St y Katritzky, 1997). Se supone que para un conjunto de estructuras moleculares, se puede establecer algún tipo de regularidad con las respectivas propiedades experimentales medidas, de tal manera a transformar en números y sistematizar la relación existente entre la estructura y la propiedad de las sustancias, es decir se puede dar una relación cuantitativa. La teoría QSAR – QSPR corresponde justamente a una hipótesis

matemática, fundamentada en el hecho de que la estructura de una molécula es responsable de sus propiedades químicas, fisicoquímicas, biológicas o farmacológicas (Duchowicz, 2005).

Una de las alternativas para lograr definir las propiedades de un compuesto químico a partir de su fórmula estructural, es, estableciendo una relación matemática entre una propiedad o actividad (LD_{50} , pK_a , etc.) del compuesto en estudio con uno o más parámetros descriptivos (descriptores) relacionados a la estructura de la molécula. De alguna manera estas funciones matemáticas pueden medir las relaciones propiedad – estructura, estableciéndose un tipo de sistematización del estudio, englobados dentro de lo que se denomina técnicas QSPR (*Quantitative Structure Property Relationships*) (St y Katritzky, 1997).

En las áreas biológicas, como en el campo de la farmacología y la toxicología, la relación estructura - actividad (SARs), constituye alguna relación matemática entre actividades biológicas medibles (por ejemplo toxicidad o respuesta terapéutica) y alguna característica estructural del compuesto en estudio, como puede ser alguna propiedad fisicoquímica (coeficiente de partición octanol – agua, electronegatividad, etc.). Esto es debido a que los cambios estructurales de las moléculas definen su acción (actividad) en el organismo vivo (McKim et al., 1987).

Si los modelos derivados de este tipo de correlaciones resultan ser aceptables, son utilizados como guías para la síntesis de compuestos entre un número considerable de alternativas hipotéticas, o incluso son utilizados para la elucidación de mecanismos por los cuales la propiedad o actividad en cuestión son relacionadas a la estructura química (Katritzky et al., 1995). Por lo que desde el punto de vista económico se encontró un gran potencial de estas metodologías, al incluir un paso adicional previo a la síntesis de nuevos compuestos, de tal manera a que según la predicción de las propiedades/actividades por medio computacional, la siguiente etapa experimental sea aplicada solo a aquellas moléculas que tiene más probabilidad de éxito. Además, con la metodología QSTR (*Quantitative Structure Toxicology Relationships*) son obtenidos bancos de datos toxicológicos sobre un gran número de moléculas que son utilizados para el registro de nuevos compuestos (Marino, 2009).

Los descriptores podrían ser propiedades de la molécula obtenidas experimentalmente, o propiedades derivadas matemáticamente a partir de estructuras moleculares 2D o 3D, resultando estas últimas más útiles por permitir la obtención de correlaciones que pueden ser extendidas a la predicción de propiedades o actividades de compuestos no disponibles, ya sea por tratarse de sustancias inestables o tóxicas, o por ser poco accesibles económicamente o por demandar mucho tiempo de síntesis. Ejemplos simples de descriptores pueden ser el número de átomos, el tipo de enlaces presentes en la molécula, entre otros.

Las propiedades pueden describirse empleando descriptores globales, que representan a la molécula como a un todo, como son el volumen y el área molecular, la energía electrónica total, etc. También pueden describirse de una manera no globalizada, empleando una aproximación de subestructura o atómica, por medio de descriptores atómicos para describir los fragmentos presentes en las estructuras, como por ejemplo, el número de átomos y enlaces.

Katritzky et al. (1995) han clasificado a los distintos descriptores en grupos dentro de los cuales se tratan de incluir las peculiaridades moleculares asociadas a cada tipo de descriptor. Sin embargo, muchos descriptores pueden ser sensibles a varias características moleculares de manera simultánea, por lo que esta clasificación es más bien aproximada y provisional.

Las distintas categorías de descriptores son: constitucionales, topológicos, geométricos, electrostáticos, químico-cuánticos, termodinámicos y de solvatación. Los descriptores constitucionales dependen fundamentalmente de la composición de la molécula, como son el número de átomos de los diferentes elementos y el peso molecular. El número de anillos y de dobles enlaces reflejan también la topología molecular. Los descriptores topológicos, son probablemente los más ampliamente utilizados, e incluyen los parámetros moleculares clásicos, que resultan ser más sensibles a la topología molecular y particularmente a la ramificación de la molécula.

Los descriptores electrostáticos reflejan la distribución parcial de las cargas o la electronegatividad de los átomos, aunque también pueden reflejar la topología molecular y la composición.

Los descriptores geométricos representan las características tridimensionales de la estructura molecular, por ejemplo el tamaño y la forma molecular.

Los cálculos químico-cuánticos pueden proveer una extensa cantidad de información variada acerca de la estructura química, incluyendo datos geométricos y electrostáticos. Además, estos cálculos pueden proveer información acerca de las propiedades electrónicas internas de las moléculas, que de otra manera no podrían ser obtenidas.

En la Tabla 2.2 (Katritzky et al., 1995) se dan ejemplos de los descriptores más comúnmente utilizados según cada categoría:

Tabla 2.2: Principales descriptores utilizados en estudios QSAR - QSPR

Descriptores constitucionales	Descriptores topológicos	Descriptores electrostáticos	Descriptores geométricos	Descriptores químico-cuánticos
- Peso molecular.	- Índice de Weiner.	- Cargas parciales.	- Momento principal de inercia.	- Carga atómica neta.
- Numero de átomos y de enlaces.	- Índices de Randic.	- Índices de polaridad.	- Volumen molecular.	- Momento dipolar.
- Número de anillos.	- Índices de Kier y Hall.	- Áreas superficiales parciales cargadas	- Superficie molecular accesible al solvente.	- Polarizabilidad.
				- Ordenes de enlace ρ y σ .
				- Energías HOMO y LUMO.
				- Índices de Reactividad FMO (<i>Frontier molecular orbitals</i>)

Por la complejidad de la estructura molecular no se ha podido hasta el presente, obtener un único descriptor, que englobe toda la información estructural de la molécula en una única variable y que sea aplicable a cualquier propiedad – actividad bajo estudio. Actualmente se cuenta con una gran variedad de descriptores disponibles, por lo que en el diseño de un modelo debe ser realizada la mejor selección de las variables a ser utilizadas, definiendo con cuales y cuantas se contará durante el proceso (Duchowicz, 2005).

Las etapas para la realización de un estudio QSAR –QSPR se puede resumir de la siguiente manera: Una vez que se ha seleccionado el conjunto de moléculas que exhiben alguna propiedad de interés, la función matemática estructural (lineal o no lineal), y los descriptores óptimos, se realiza la calibración del modelo, estableciendo de esa manera las relaciones QSAR – QSPR. En un siguiente paso se analiza la capacidad predictiva del modelo, realizando la validación del mismo.

En la Figura 2.3 se esquematizan las etapas del estudio QSAR - QSPR

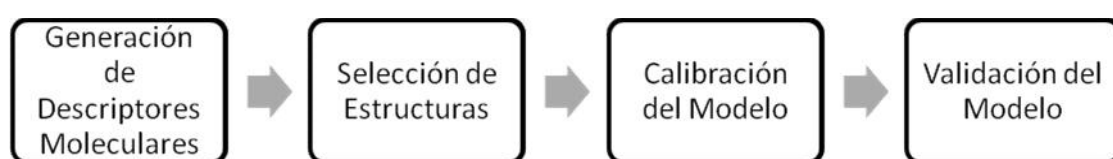


Figura 2.3: Etapas de un estudio QSAR – QSPR (Duchowicz, 2005)

La calibración del modelo implica el diseño de una representación matemática que permita analizar el comportamiento de los datos, generados por los distintos descriptores que hayan sido elegidos para reflejar los atributos estructurales de las moléculas en estudio. La calibración por lo tanto consiste en la obtención de una relación cuantitativa para la predicción de una propiedad o actividad determinada.

Finalmente, la validación indica si esa relación que ha sido planteada durante la calibración del modelo, es significativa para la predicción de la misma propiedad en otro conjunto de moléculas distintas a las utilizadas para la calibración, pero estructuralmente relacionadas.

El fundamento matemático de la Relación Cuantitativa Estructura – Actividad/Propiedad (QSAR – QSPR) recae en el principio de multilinealidad. De acuerdo a este principio se establece una dependencia continua y singular, entre una propiedad medible experimentalmente y algún factor estructural intrínseco de la molécula, asumiéndose la linealidad de esta dependencia.

La dependencia entre la propiedad experimental puede ser limitada a un sólo factor estructural X_1 , buscando construir un modelo lineal del tipo $P_1 = a_0 + a_1X_1$, y los parámetros evaluados mediante la regresión lineal.

Alternativamente, la propiedad experimental puede depender linealmente de varios factores estructurales X_j , y la correspondiente ecuación de correlación lineal multiparámetro es obtenida utilizando el método de mínimos cuadrados multilineal:

$$P_1 = a_0 + a_1X_1 + a_2X_2 + a_3X_3 + \dots \quad (2.11)$$

En el caso de que esta aproximación sea inválida, puede recurrirse a emplear métodos de regresión no lineal para la descripción de la dependencia entre la propiedad experimental y los factores estructurales. Sin embargo, al utilizar una transformación no lineal polinómica (X_j^n) logarítmica ($\ln X_j$, $\log X_j$), etc., la dependencia funcional formal de la propiedad experimental en estudio P_1 con respecto a los factores estructurales sigue siendo lineal, por lo que la ecuación de correlación correspondiente es obtenida utilizando el mismo método de mínimos cuadrados multilineal (Katritzky et al., 1995).

La validez del modelo de calibración QSPR – QSAR, representado en este paso por la función matemática, queda verificada por los valores de los parámetros de la estadística matemática: coeficiente de correlación R , desviación estándar S y parámetro de Fisher F . Si estos parámetros estadísticos clásicos son aceptables, debe cumplirse que las diferencias entre los valores predichos y los verdaderos estén dentro de un valor aceptable y al cumplirse estas condiciones se valida el modelo (Marino, 2009).

Existen otras técnicas más elaboradas desde el punto de vista de su metodología matemática estadística, que también son ampliamente utilizadas en los estudios QSAR – QSPR para el diseño del modelo óptimo, por ejemplo las redes Neuronales Artificiales (Claycamp et al., 1999) ó los análisis multivariados (Eriksson et al., 2006), entre otros y que han sido objeto de numerosos estudios en los últimos años.

2.3 Espectrometría de Masas

Una de las primeras definiciones de la espectrometría de masas puede ubicarse con sus primeras aplicaciones en la química orgánica, la que fuera enunciada en 1968, y que, a pesar del tiempo transcurrido continúa siendo válida

hasta la fecha. Esta definición es la siguiente: “el principio básico de la espectrometría de masas es generar iones desde compuestos orgánicos o inorgánicos por medio de algún método disponible, separar estos iones según su relación m/z (masa/carga), y detectarlos cualitativamente y cuantitativamente por sus respectivos m/z y su abundancia. Los analitos pueden ser ionizados térmicamente, por campos eléctricos, o por el impacto de electrones, iones o fotones. Los iones pueden ser átomos ionizados simples, grupos, moléculas o sus fragmentos o asociaciones. La separación iónica es efectuada a través de campos eléctricos estáticos o dinámicos, o en campos magnéticos”.

Actualmente habría que agregarse que, además de los electrones, iones o fotones, también pueden ser utilizados para la ionización del analito átomos neutros energéticos o grupos de iones pesados; también, que la separación de los iones por su relación m/z puede ser efectuado en regiones libre de campo, como sucede en el analizador de tiempo de vuelo (Gross, 2004).

2.3.1 El Espectrómetro de Masas

Consiste básicamente en una fuente de iones, un analizador de masas, y un detector, los cuales operan en condiciones de alto vacío. Separando los pasos de operación del instrumento, podrían ser los siguientes: introducción de la muestra, evaporación y la sucesiva ionización o desorción/ionización.

Aunque la muestra analizada en el espectrómetro de masas es consumida, prácticamente podría considerarse un método no destructivo, debido a que la cantidad del analito necesario para el análisis se encuentra por debajo del rango de los microgramos, e inclusive varios órdenes de magnitud menores.

En la Figura 2.4 puede observarse el esquema general de un espectrómetro de masas.

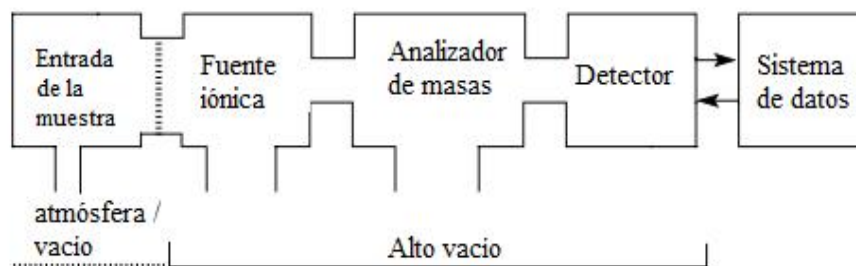


Figura 2.4: Esquema general de un espectrómetro de masas. La transferencia de la muestra, desde la presión atmosférica al alto vacío de la fuente iónica y el analizador de masas, es llevada a cabo mediante el uso de un interruptor de vacío (Gross, 2004).

2.3.2 El espectro de masas

Es la representación bidimensional de la intensidad de señal, en ordenadas, versus la relación m/z , en abscisas. La intensidad de un pico refleja la abundancia de las especies iónicas de los respectivos valores de relación m/z , que han sido formados a partir del analito dentro de la fuente iónica.

La relación *m sobre carga*, m/z , es adimensional por definición, ya que es calculada a partir de el número de masa, m , de un determinado ión, y el número de su carga elemental, z . Este último valor es a menudo igual a uno, sin embargo existen condiciones donde pueden ser formados iones con doble, triple o mas cargas, dependiendo del método de ionización empleado.

La distancia entre los picos en el eje corresponde a pérdidas neutras del ión con m/z de mayor valor para producir un ión fragmento de m/z menor. La masa del fragmento neutro es solamente determinado por esta diferencia entre los correspondientes m/z , debido a que el MS detecta solo las especies cargadas.

Ion molecular: corresponde al pico generalmente de mayor valor de m/z , pero no necesariamente, que resulta de la detección de la molécula ionizada intacta, M^+ . Los picos que corresponden a valores menores de m/z son causados por la fragmentación del ión molecular, y se denominan picos de los iones fragmento.

El pico más intenso en el espectro de masas es llamado **pico base**. Mayormente los datos de intensidad en el espectro de masas están normalizados con

respecto al pico base, al que le corresponde 100% de intensidad relativa, lo que ayuda a hacer el espectro más fácilmente comparable.

2.3.3 Teoría del Cuasi Equilibrio

Es una aproximación teórica para describir la descomposición unimolecular de los iones, y por lo tanto de su espectro de masas. En el espectrómetro de masas casi todos los procesos ocurren bajo condiciones de alto vacío, en fase gaseosa altamente diluida, por lo que las reacciones bimoleculares raramente ocurren.

Los iones aislados en fase gaseosa no se encuentran en equilibrio térmico con el entorno, en lugar de ello la única alternativa es la redistribución interna de la energía y por lo tanto estar solamente sometidos a reacciones unimoleculares como la isomerización o disociación.

2.3.3.1 Ionización

Todos los analizadores de masas de los espectrómetros de masas solo pueden tratar especies cargadas, por lo tanto la ionización es un paso imprescindible, y es llevado a cabo en la fuente iónica. Para ello, existen un amplio rango de métodos de ionización disponibles para también una amplia variedad de analitos.

El procedimiento clásico de ionización involucra el bombardeo de electrones energéticos a una especie neutra, lo que es llamado ionización electrónica (EI), o ionización de impacto electrónico o impacto electrónico (EI). En principio, las especies neutras deben ser transformadas a fase gaseosa altamente diluida, de tal manera a que las partículas estén lo suficientemente espaciadas unas de otras para hacer que las reacciones bimoleculares sean casi imposibles dentro de la vida media de las partículas, lo que es logrado en un rango de presión de 10^{-4} Pascal en la fuente iónica.

Cuando una especie neutra es colisionada por un electrón energético, parte de la energía del electrón es transferida al compuesto. Parte de esa energía contribuirá a la energía translacional o rotacional de la molécula como un todo, mientras que la mayor parte será almacenada en los modos internos. Los modos de excitación

rotacional internos no pueden almacenar significativas cantidades de energía, los modos de excitación vibracional y especialmente los electrónicos son capaces de captar varios electronvolts cada uno.

Si el electrón colisiona muy efectivamente con la especie neutra, la cantidad de energía transferida puede efectuar la ionización de la especie neutra por la expulsión de un electrón para la formación de un ión radical positivo:



La EI en general produce iones con carga simple, comúnmente iones con número de electrones impar (capa abierta). Dependiendo del analito y la energía de los electrones primarios, pueden generarse iones con doble o triple carga, pero son de menor abundancia.

2.3.3.2 Energía de Ionización (EI)

También llamada potencial de ionización, es la mínima cantidad de energía que debe ser absorbida por un átomo o molécula en su estado fundamental, electrónico y vibracional, para formar un ión también en su estado fundamental por la expulsión de un electrón.

La remoción de un electrón de una molécula puede ser considerada que ocurre en los enlaces σ , en los enlaces π o en los pares electrónicos libres, siendo el enlace π el menos favorable, y el par electrónico libre el más favorecido, para que se produzca la ionización, por la localización de la carga dentro de la molécula. Esto está reflejado en los valores de EI de las moléculas.

Moléculas con enlaces π tienen valores de EI más bajos que aquellas que no lo tienen, además los hidrocarburos aromáticos son capaces de estabilizar aún mejor una carga sencilla, y los sistemas π conjugados, por lo que estos sistemas facilitan la ionización. Los pares electrónicos libres constituyen una buena localización para la expulsión de un electrón durante la ionización. La introducción de un oxígeno disminuye la EI menos que la introducción de un átomo de nitrógeno, debido a que estos últimos al ser menos electronegativos son una mejor fuente de un electrón.

Los valores más bajos de EI se alcanzan en estructuras en donde sistemas y heteroátomos son combinados. Las energías de ionización de la mayoría de las moléculas se encuentran en el rango de 7 – 15 eV.

La ionización electrónica ocurre extremadamente rápida. La molécula que está siendo colisionada por el electrón puede ser vista como en reposo debido a que la velocidad térmica de unos pocos 100 m s^{-1} es despreciable comparado con la velocidad del electrón que pasa a través de ella que es del orden de $5 \times 10^6 \text{ m s}^{-1}$. El movimiento vibracional es más lento por lo menos en dos órdenes de magnitud.

De acuerdo con la aproximación de Born – Oppenheimer, el movimiento electrónico y el movimiento nuclear pueden ser separados, por lo que la posición de los átomos y por lo tanto, las longitudes de enlace no cambian mientras la ionización ocurre. Además el principio de Frank – Condon establece que la probabilidad para una transición electrónica es mayor cuando la función de onda electrónica, tanto del estado fundamental y del estado ionizado tienen su máximo, y esto es lo que da lugar a la llamada transición vertical.

La probabilidad de que una transición vertical particular desde una especie neutra a un cierto nivel vibracional del ión es expresada por su Factor de Frank - Condon.

La ionización adiabática ocurre cuando el proceso de ionización de la especie neutra en su estado vibracional fundamental, da lugar a un ión radical, también en su estado fundamental vibracional.

Independientemente del lugar de donde el electrón ha sido tomado, la ionización tiende a causar debilidad de los enlaces dentro del ión comparado con los del precursor neutro, lo que significa una mayor longitud de enlaces en promedio, lo que da lugar a una mayor tendencia hacia la disociación de un enlace. En la superficie de energía potencial esta situación es visualizada considerando un solo enlace dentro de la molécula o una molécula diatómica.

El mínimo de la curva de energía potencial de la molécula neutra, considerando que se encuentra en su estado vibracional fundamental, está localizada

a una longitud de enlace más corta, que el correspondiente al mínimo de la superficie de energía potencial del ión radical, también en su estado fundamental. Como la posición de los átomos permanecen fijos durante el corto periodo de tiempo de la ionización, la especie neutra y el ion resultante tienen el mismo estado vibracional, lo que en una curva de energía potencial es representada por una línea vertical en el diagrama, que va desde el correspondiente estado vibracional de la molécula neutra y llega hasta el mismo nivel vibracional excitado del ión.

El destino adicional de los iones dependerá de la forma de sus correspondientes superficies de energía potencial. Si existe un mínimo, y el nivel de excitación se encuentra por debajo de la barrera de energía para la disociación el ion puede existir por un largo tiempo. Pero si los iones tienen una energía interna por encima de la energía de disociación, producirán los llamados iones fragmentos como productos de su disociación visibles en el espectro de masas.

Si la superficie de energía potencial del ión formado en la ionización no tiene ningún mínimo, el ión se disociará espontáneamente, y por tanto en el espectro de masas no se observará el pico correspondiente al ión molecular.

2.3.3.3. Relación de la energía de ionización y funciones de velocidad

Solo reacciones unimoleculares son posibles para iones gaseosos formados por EI bajo las condiciones usuales de operación de un MS. La naturaleza y alcance de estas reacciones depende solo de la estructura y de la energía interna de estos iones, independientemente de los métodos de ionización utilizados. En el diagrama de Wahrhaftig (Figura 2.5) se describe la distribución de la energía interna de los iones resultantes de la ionización de las moléculas de muestra con electrones de 70 eV, como una función de probabilidad $P(E)$.

Los iones M^{+*} formados inicialmente se encuentran en la gama de “fríos” a “rojos calientes”, por lo que pueden mostrar un muy amplio rango de comportamiento de descomposición (McLafferty y Turecek, 1993).

Sin las colisiones, la energía inicialmente depositada en el ion del proceso de ionización, además de la pequeña cantidad de energía interna presente en la molécula

precursora, es la responsable de la descomposición o la isomerización del ion. La probabilidad que se dé cualquiera de las reacciones es expresada como constante de velocidad k , que cambia con relación a la energía interna del ion precursor.

La función $k(E)$ se muestra en la Figura 2.5 como el cambio del $\log k$ con E , lo que muestra que los iones de más baja energía interna no tendrán una apreciable velocidad de descomposición y por lo tanto aparecerán como $M^{+\bullet}$ en el espectro.

En la Figura 2.5, una constante de velocidad de aproximadamente 10^6 s^{-1} o mayor, es necesaria para la descomposición del ion precursor, lo que corresponde al $\log k=6$ en la curva para la reacción de $M^{+\bullet} \rightarrow AD^{+\bullet}$, por lo tanto esto define el mínimo de energía interna de $M^{+\bullet}$ para la formación de $AD^{+\bullet}$, lo que es algo más alta que la energía crítica de reacción $E_0(AD^{+\bullet})$, definida como la diferencia entre la energía del punto cero de $M^{+\bullet}$ y la del complejo activado para la reacción $M^{+\bullet} \rightarrow AD^{+\bullet}$.

Una energía interna más alta de $M^{+\bullet}$, da una $k(M^{+\bullet} \rightarrow AB^{+\bullet})$ más alta que la correspondiente $k(M^{+\bullet} \rightarrow AD^{+\bullet})$, por lo que la formación de $AB^{+\bullet}$ esta favorecida.

La abundancia real de los iones está determinada tanto por $P(E)$ y el relacionamiento con $k(E)$. La proporción relativa de los iones $M^{+\bullet}$ que permanecen no disociados está determinado por la energía más baja requerida para la disociación del ion precursor y la proporción relativa de los iones $M^{+\bullet}$ formados con energía interna por debajo de esta energía.

Si la energía de ionización electrónica es disminuida, se reducirá el número de iones $M^{+\bullet}$ formados, con alta energía, en mayor proporción del número de iones que se reducirá con menor energía, por lo que la proporción relativa de iones $M^{+\bullet}$ no disociados se incrementará.

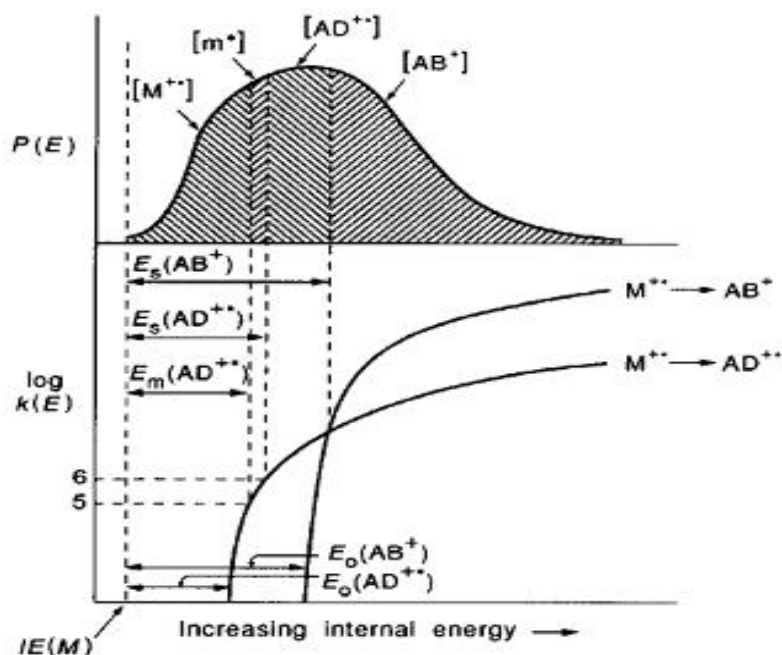


Figura 2.5: Diagrama de Wahrhaftig. Relación de $P(E)$ y $k(E)$ para la descomposición unimolecular del ión $ABCD^{+*}$. (Wahrhaftig, 1962, 1986; McLafferty y Turecek, 1993).

2.3.3.4 Efectos de la Termodinámica versus la Cinética

El sistema hipotético mostrado en la Figura 2.5 ilustra un aspecto importante de la descomposición unimolecular, que la reacción de energía crítica más baja no necesariamente es la que da el ión más abundante.

En la Figura 2.5, la reacción $ABCD^{+*} \rightarrow AD^{+*}$ tiene una entalpía más favorable, pero la reacción $ABCD^{+*} \rightarrow AB^{+*}$, está favorecida por la entropía. En el re arreglo que da lugar a la formación de AD^{+*} , se forman dos nuevos enlaces compensando la energía requerida para la ruptura de los enlaces A – B y C – D.

La energía crítica de formación para la formación de AB^{+*} es más alta, porque requiere la escisión del enlace B – C. sin embargo el requerimiento estérico para la formación de AD^{+*} es mucho más estricto que para la formación de AB^{+*} , formando los complejos activados “apretados” y “suelos” respectivamente.

Para los iones $ABCD^{+*}$ de mayor energía, la disociación del enlace puede tener lugar cuando la cantidad suficiente de energía se acumula en este enlace. Sin embargo, la formación de AD^{+*} , además de los requerimientos energéticos, se debe

cumplir al mismo tiempo que A y D estén a la distancia suficiente para la formación del enlace, lo que se cumple en una muy pequeña proporción de las posibles conformaciones de $ABCD^{+•}$.

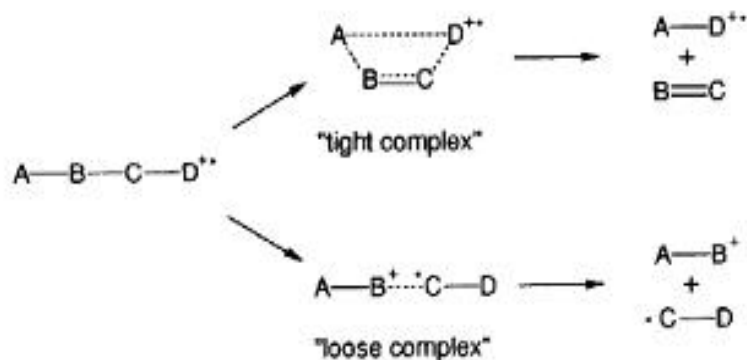


Figura 2.6: Posibles estados de transición del ion $ABCD^{+•}$ (McLafferty et al., 1993)

2.3.3.5 Eficiencia de la Ionización Electrónica

La energía de ionización (EI) se define como la mínima energía requerida para la ionización de la especie neutra en estudio. La mayoría de las moléculas tienen una EI en el rango de 7 – 15 eV. Si un electrón impactante lleva una cantidad de energía justo igual a la EI, debería cuantitativamente transferirla durante la colisión a la especie neutra y la ionización debería tener lugar. Este evento, sin embargo, tiene una muy baja probabilidad, por lo que la eficiencia de la ionización es cercana a cero.

La eficiencia de la energía de ionización de una especie molecular dada depende de las propiedades intrínsecas del proceso de ionización como también, de la sección transversal de ionización de esa especie en particular. La sección transversal de ionización describe un área a través del cual el electrón debe viajar para que efectivamente pueda interactuar con la especie neutra, por lo que tiene unidades de metros cuadrados. Los gráficos de sección transversal de ionización son del mismo tipo para todas las moléculas y alcanzan un máximo a una energía electrónica alrededor de 70 eV. Esta es la razón por la que los espectros de EI son medidos mayormente a 70 eV (Gross, 2004).

2.3.3.6 Consecuencias prácticas de la energía interna

Los iones moleculares pueden exhibir una gran cantidad de vías de fragmentación de primera, segunda o de mayor generación. La energía de activación para estas reacciones es obtenida del exceso de energía recibido bajo la IE. La disociación iónica generalmente es un proceso endotérmico, por lo que cada paso de fragmentación consume algo de la energía interna.

Los iones altamente excitados pueden tener suficiente energía interna como para permitir varias rupturas de enlace de forma simultánea, o en otros casos, dar lugar a una sola, o incluso a ninguna ruptura. Estos últimos llegan al detector como iones moleculares intactos. Las vías de fragmentación de una misma generación son competitivas unas con otras, y sus productos son precursores potenciales de próximas generaciones de procesos de fragmentación.

2.3.4 Instrumentación

2.3.4.1 Generación del haz de iones - Fuentes de Iones

Los iones son generados dentro de un campo eléctrico, como el que se origina entre dos placas de un capacitor con signos de carga opuesta. Luego el ion es acelerado hacia una de las placas con signo opuesto que contiene un orificio o una rendija, y de esa manera se genera el haz de iones.

Se asume que la difusión en energía cinética del ion es pequeña comparándola con la energía cinética total ($E_{\text{cin}} \ll E_{\text{cin}}$), por lo que el haz es considerado mono energético. La carga de un ion puede ser positiva o negativa dependiendo del método de ionización empleado. El electrodo atrayente es generalmente conectado a tierra, con lo que se contribuye significativamente a la seguridad de la operación.

2.3.4.2 Principio del sector magnético

La ley de fuerza de Lorentz es utilizada para describir los efectos ejercidos sobre una partícula cargada dentro de un campo magnético constante. La forma más simple de la fuerza de Lorentz está dada por la ecuación escalar: $F_L = qvB$, donde q es

la carga de un ión, v es la velocidad y B es el campo magnético. Esta ecuación es válida si v y B (vectores) son perpendiculares entre sí, y de esa forma la relación se convierte en: $F_L = qvB(\sin \theta)$, donde θ es el ángulo entre v y B . de esa manera los vectores v , B y la Fuerza de Lorentz resultante F_L son perpendiculares entre sí. Un ión de masa m y de carga q atravesando con una velocidad v con una dirección perpendicular al campo magnético, sigue un camino circular de radio r_m que cumple la condición de equilibrio de F_L y de la fuerza centrípeta F_C .

$$F_L = qvB = \frac{m_i v^2}{r_m} = F_C \quad (2.12)$$

De la ecuación (2.12), se obtiene el radio del movimiento circular:

$$r_m = \frac{m_i v}{q B} \quad (2.13)$$

Esto muestra que el principio de acción de un sector magnético de radio r_m depende del momento mv de un ión, y por lo tanto el momento depende de m/z . El sector magnético es un analizador de un momento en lugar de un analizador directo de masas como generalmente es asumido.

Para iones de carga simple ($z=1$, $q=e$), se obtiene:

$$\frac{m_i}{e} = \frac{r_m^2 B^2}{2U} \quad (2.14)$$

conocida como ecuación básica de la espectrometría de masas, donde U es el voltaje aplicado.

El enfoque de la energía se logra combinando un sector magnético y un sector eléctrico, de forma que la dispersión de la energía del campo magnético es compensada por la dispersión de la energía del campo eléctrico. El enfoque de dirección adicional es obtenida si el radio y los ángulos de estos campos y su respectivos alineamientos no disminuyen las propiedades de enfoque de cada uno de ellos.

Luego, con un sistema óptico iónico se logra enfocar los iones en un punto de una sola imagen, aunque los iones se formen en fuentes iónicas con direcciones y con energías cinéticas ligeramente diferentes. Esto es llamado doble enfoque (Gross, 2004).

2.4 Piretroides

2.4.1 Introducción a los piretroides

El *pyrethrum*, proveniente del género *Chrysanthemum*, es uno de los insecticidas botánicos más antiguos y más ampliamente difundido. Sus propiedades insecticidas son conocidas desde hace más de 150 años. En principio, alrededor de 1820 se empezaron a utilizar comercialmente mezclas de varias especies de este género como *C. roseum* y *C. corneum*. En 1845 aproximadamente fue reconocido el *C. cinerariaefolium*, con propiedad insecticida superior al de las especies previamente conocidas, por lo que muy pronto su cultivo suplantó al de las otras especies.

Las limitaciones comerciales de los extractos del *pyrethrum* (mezcla de seis ésteres lipofílicos) conocidos como piretrinas, son debidas principalmente a su alta velocidad de fotodegradación y un corto efecto de parálisis rápida (*knockdown*). A partir de las piretrinas se sintetizaron los derivados piretroides, alrededor de la década de 1970, con mayor resistencia a la fotodegradación. Las ventajas que presentan en común tanto las piretrinas como los piretroides son su vida media corta en el ambiente, que son altamente lipofílicos, su baja toxicidad para con los vertebrados terrestres y no se biomagnifican tal como otros tipos de insecticidas, por ejemplo los organoclorados.

Los piretroides conservan la estructura básica de las piretrinas, un ácido crisantémico unido a un alcohol aromático por medio de una unión éster, cambiando otros aspectos estructurales. A partir de su síntesis su uso se ha difundido notablemente, y en las últimas décadas aun sobre otros insecticidas como organofosforados, carbamatos u organoclorados, cuyo uso paulatinamente ha ido disminuido.

Son ampliamente utilizados en la agricultura, áreas residenciales, en salud pública y en la preparación de alimentos (Schleier y Peterson, 2011).

2.4.2 Química y estructura de los Piretroides

Las piretrinas están constituidas de seis ésteres con actividad insecticida. Los extractos son líquidos altamente viscosos con elevado punto de ebullición, sensibles a la oxidación y difíciles de almacenar por largos periodos.

En 1924 Staudinger y Ruzicka elucidaron los constituyentes activos y lo dividieron en piretrinas I y II, los cuales son ésteres del ácido 2,2-dimetil-3-(2-metil-1-propenil)-1-ciclo-propanecarboxílico (ácido crisantémico) y del ácido 3-(2-metoxycarbonil-1-propenil)-2,2-dimetil-1-ciclopropanecarboxílico (ácido pirétrico) respectivamente. Los seis constituyentes de las piretrinas son la piretrina I y II, cinerina I y II y la jasmolina I y II. El nombre de los seis ésteres deriva del componente alcohol y se distinguen por el nombre y un número romano (I y II), que representan los ésteres del ácido crisantémico y pirétrico respectivamente.

La concentración de los distintos ésteres es variable en el extracto, estando este constituido en promedio por 73% de piretrinas I y II, 19% de cinerina I y II y 8% de jasmolina I y II. Las piretrinas I y II difieren en sus propiedades insecticidas, siendo que la piretrina I muestra mayor letalidad y la piretrina II muestra mayor efecto paralizante.

Los piretroides fueron sintetizados a partir de modelos provenientes de las piretrinas, de tal manera a mejorar la especificidad y actividad de estas, manteniendo la alta capacidad paralizante y la baja toxicidad sobre vertebrados terrestres. La gran mayoría de los piretroides sintéticos derivaron de la modificación del residuo del ácido crisantémico de la piretrina I y de la esterificación de los alcoholes. Ciertas características estructurales son requeridas para que los piretroides tengan una alta actividad insecticida.

Los ésteres activos piretroides son ácidos ciclopropenocarboxílicos 3-sustituidos que tienen una configuración 1 R, una sustitución gem-dimetilo en el C-2 del anillo ciclopropano y solo los fenilacetatos que tiene la correspondiente

sustitución en la posición 2. Existen más de 1000 estructuras diferentes de piretroides sintetizados, algunos muy diferentes de la estructura original de la piretrinas, incluso por la falta del anillo dimetilciclopropano y las uniones ésteres. El nivel de actividad está determinado por la penetración, el metabolismo y la sensibilidad del sitio diana, los cuales cambian con la estructura de la molécula.

Desde 1840 se ha sabido de la fotolabilidad de las piretrinas, por lo que con la síntesis de los piretroides se buscó justamente mejorar la estabilidad fotoquímica y metabólica. En 1949 fue introducido con el primer piretroide exitoso comercialmente, la alletrina. En 1967 se obtuvo el siguiente desarrollo significativo con la síntesis de la resmetrina, a partir de la modificación del alcohol de la piretrina I con su esterificación.

La resmetrina fue el primer compuesto con actividad insecticida igual o mayor que la piretrinas pero con menor toxicidad hacia los mamíferos, sin embargo no poseía la fotoestabilidad suficiente para su uso en la agricultura. Fue el primer compuesto en donde se empezó a relacionar la estereoquímica del residuo ácido con la actividad biológica y metabolismo del insecticida.

Los piretroides tienen tres átomos de carbono asimétrico y pueden tener hasta ocho posibles estereoisómeros. La presencia de dos centros quirales en el anillo del ciclopropano del ácido crisantémico produce dos pares de diasterómeros, designados como *cis* o *trans* de acuerdo a la orientación de los sustituyentes del C1 y C3 en relación al plano del anillo del ciclopropano, pero solo aquellos con orientación R en el C1 del ciclopropano son activos como insecticidas.

En 1971 fue sintetizada la permetrina, con suficiente fotoestabilidad para su uso en la agricultura. Fue sintetizada por el remplazo de los grupos metilos con átomos de cloro en la cadena lateral del ácido, estos bloquean la degradación fotoquímica en el doble enlace adyacente. Como la mayoría de los piretroides, el isómero 1R-*trans* de la permetrina es rápidamente metabolizado en los organismos, mientras el 1R-*cis* es más estable y tóxico. Posteriormente, se incorporó a la estructura el grupo ciano en el carbono benzílico del grupo 3-fenoxibencilo, lográndose mayor actividad insecticida.

De acuerdo a la falta o a la presencia del grupo -ciano en el residuo fenoxobencilo, los piretroides se clasifican en tipo I y tipo II respectivamente.

El siguiente desarrollo en la estructura de los piretroides fue la incorporación de residuos de ácidos fenilacéticos sustituidos más baratos, en lugar del ácido ciclopropanocarboxílico, esterificados con algún alcohol piretroide apropiado, dando lugar a la síntesis de piretroides como el fenvalerato.

Posteriormente, la síntesis de esta molécula dio lugar al desarrollo de piretroides no ésteres conocidos con el nombre de pseudo piretroides, entre ellos el etofenprox. Estos últimos compuestos tienen como característica una menor toxicidad sobre los peces que los piretroides convencionales, manteniendo el efecto tóxico sobre los insectos y la baja toxicidad sobre los mamíferos. Además, en la síntesis de los pseudopiretroides se han ido incorporando los llamados procesos verdes, tales como la síntesis quimioenzimática.

Por las características comunes de los piretroides y los análogos del DDT, se han desarrollado también los insecticidas híbridos, como la ciclotrina, un piretroide tipo II, único compuesto de este tipo desarrollado con fines comerciales. Aunque este compuesto no es tan tóxico hacia los organismos blanco como la deltametrina, pero también menos tóxico para los peces (Schleier y Peterson, 2011).

2.4.3 Propiedades Físicas

Las piretrinas y los piretroides son compuestos o polares, que tienen baja solubilidad en agua y baja volatilidad, coeficientes de partición octanol – agua elevados, y alta afinidad de unión a partículas de suelo y sedimento. Son rápidamente degradados vía reacciones fotoquímicas, siguiendo estas reacciones una cinética de primer orden, donde las principales reacciones son la escisión del enlace éster, la foto oxidación, la foto isomerización y la decianación.

En el suelo bajo condiciones atmosféricas estándares y de inundación, la vida media por fotólisis está dentro del rango de 34,7 y 164 días. En suelos, la vida media por fotólisis es generalmente por debajo de 55 días, siendo la degradación más rápida en suelos secos. La degradación aeróbica ocurre rápidamente, siendo los principales

mecanismos de degradación la ruptura del enlace éster, la oxidación y la hidroxilación. En el agua, son rápidamente adsorbidos por partículas de suelo y sedimento, restando solo una mínima fracción del compuesto en la fase acuosa.

La principal vía de degradación en mezclas agua – sedimento es la escisión del enlace éster. En medios ácidos y neutros son lentamente degradados, mientras que en medios alcalinos el proceso de degradación es más rápido. Además de las reacciones abióticas, también son posibles degradaciones biológicas, que pueden ser específicas para un compuesto o estereoquímica particular (Schleier y Peterson, 2011).

2.4.4 Modo de acción de los piretroides y piretrinas

Junto con el DDT y sus análogos, pertenecen a una familia de compuestos químicos que son neurotóxicos. Las piretrinas y piretroides pueden introducirse al organismo de distintas formas. La vía de entrada más importante es a través de la epidermis. La difusión de los piretroides a lo largo de las células de la epidermis es la principal ruta de distribución hasta el sistema nervioso central, después de la penetración. Otra vía de entrada al cuerpo, aunque menos importante por la presión de vapor de los piretroides, es por vía aérea. También pueden ser ingeridos y la penetración a la sangre y a la hemolinfa a través de los alimentos puede jugar un importante rol en la toxicidad.

El modo de acción de los piretroides está caracterizado por temblores finos (síndrome T) para el caso de los piretroides tipo I o por coreoatetosis y salivación (síndrome CS) para el caso de los piretroides tipo II).

Las piretrinas y piretroides actúan muy rápidamente para producir síntomas de pérdida de la coordinación y parálisis, los que son conocidos como efecto “*knockdown*”, y que a menudo es acompañado por espasmos y temblores que inducen una intensa repetitiva activación en órganos sensoriales y en fibras nerviosas mielinizadas. El incremento de los niveles de dosis resulta en un proporcional incremento en la actividad motora, lo que es el clásico efecto dosis – respuesta de las sustancias neurotóxicas.

Estudios fisiológicos y bioquímicos de las piretrinas, piretroides y DDT han mostrado que tanto en invertebrados como en vertebrados, el mecanismo primario de acción es la unión de los compuestos a los canales de sodio dependiente de voltaje. Los mamíferos a diferencia de los insectos, tienen múltiples isoformas de canales de sodio que varían según el tipo de tejido, como también por las propiedades biofísicas y farmacológicas.

Los piretroides inhiben los neurotransmisores de la Ca – ATPasa y de la Ca – Mg ATPasa y los receptores periféricos de las benzodiazepinas, pero su acción en estos sitios es menor comparado con el observado en los canales de sodio dependientes de voltaje, sin embargo, el efecto es de aumentar las convulsiones descontroladas y los temblores (Schleier y Peterson, 2011).

Las formulaciones comerciales de los piretroides son mezclas de los isómeros 1R-cis y 1R-trans. Se ha observado que tanto en la toxicidad aguda como en la crónica que los estereoisómeros S contribuyen muy insignificativamente.

Los estudios en la toxicidad de los insecticidas mostraron una significativa diferencia entre sexos, siendo los invertebrados machos en general más sensibles que las hembras, mientras que en los mamíferos se cumple lo opuesto. Estas diferencias son debidas al contenido de lípidos y a la diferente actividad enzimática, sin embargo la diferencia entre sexos no siempre es observada. La edad y el tamaño son factores más importantes que influyen en la susceptibilidad de los organismos al insecticida, debido a que están relacionados con el contenido de grasa corporal y a la actividad enzimática. Las diferencias de la sensibilidad al insecticida debidas a la edad son debidas a las diferencias en la farmacocinética y la farmacodinamia con la edad.

Los piretroides y el DDT tienen una mayor toxicidad a bajas temperaturas debido a una susceptibilidad intrínseca de algunos sistemas fisiológicos, en lugar de efectos de penetración o del metabolismo. Esta misma dependencia con la temperatura de la toxicidad ha sido observada en animales de sangre caliente. La disminución de la toxicidad a temperaturas más altas es principalmente debido a la desorción del piretroide de su sitio blanco (Schleier y Peterson, 2011).

2.4.5 Metabolismo

La baja toxicidad de los piretroides en mamíferos y aves es atribuida a su rápido metabolismo en la sangre y en el hígado, con más del 90% de los piretroides eliminado como metabolitos en orina dentro de las 24 horas de exposición. Por lo tanto, aunque su uso es bastante difundido, existen muy pocos reportes de intoxicaciones con piretroides en humanos, animales domésticos y animales salvajes.

La detoxificación de los piretroides y las piretrinas es realizada primariamente mediante el metabolismo oxidativo por el Citocromo P450 (CYP) resultando en metabolitos con grupos hidroxilos sustituyendo tanto los restos ácidos como los básicos. Los dos tipos de enzimas metabólicas primarias que participan en la detoxificación de los piretroides son las monooxigenasas microsomales y las esterarsas. La biotransformación inicial es a través del ataque de esterarsas al enlace éster central de la molécula, o por monooxigenasas CYP dependientes que introducen uno o más restos de alcohol o ácidos, con lo que se logra la detoxificación del compuesto. La alcohol aldehído deshidrogena es la enzima involucrada en la oxidación del alcohol fenoxibencilo al ácido fenoxibenzoico.

En los insectos, como en los mamíferos, los isómeros *cis* son generalmente más tóxicos que los correspondientes isómeros *trans*. Esto podría ser debido a que las fracciones hepáticas son pobres en el metabolismo de los isómeros *cis*, mientras que los isómeros *trans* son fácilmente metabolizados por las esterarsas.

Los piretroides son metabolizados predominantemente por las esterarsas, a lo que sigue la oxidación a los ácidos carboxílicos o fenoles respectivos. Posterior a estas oxidaciones, los ácidos carboxílicos o fenoles resultantes pueden ser conjugados por una variedad de enzimas, con lo que son excretados como metabolitos libres o conjugados con azúcares o amino ácidos (Schleier y Peterson, 2011).

2.4.6 Sinergistas

Los piretroides y piretrinas a menudo son combinados comercialmente con otros químicos llamados sinergistas, que son generalmente compuestos no tóxicos,

que aplicados en ciertas dosis aumentan la toxicidad del ingrediente activo del pesticida. Se utilizan generalmente como sinergistas compuestos que inhiben la actividad del CYP, entre ellos el N-octil biciclo hepteno dicarboximida (MGK – 264) y el butóxido de piperonilo (PBO). Se ha demostrado que estos dos compuestos aumentan la toxicidad de los piretroides sobre los organismos acuáticos, lo que no se ha visto en mamíferos. Además el PBO, también aumenta la velocidad de penetración de los piretroides a través de la cutícula de los insectos.

2.4.7 Destino Ambiental

Las principales rutas por las que los piretroides se introducen en sistemas acuáticos son a través del movimiento de la superficie del suelo (escorrentías) o a través de la deriva. Las piretrinas, piretroides y pseudo piretroides son degradados rápidamente en la mayoría de los tipos de suelos, ya sea bajo condiciones anaeróbicas o aeróbicas, siendo rápidamente adsorbidas por el suelo. Tienen una vida media en suelos y sedimentos mayor a 30 días, aunque mucho menor que pesticidas como el DDT.

La fuerte absorción de los piretroides al suelo sugiere que cuando ocurre efectivamente contaminación acuática con estos compuestos es debido a la erosión de partículas de suelo debido a fuertes vientos o a episodios de fuertes lluvias. En el cuerpo de agua, los piretroides son rápidamente absorbidos por los sedimentos y el contenido orgánico del agua, por lo que estarán presentes en fase acuosa solo por un corto periodo de tiempo.

Los piretroides más frecuentemente encontrados en las aguas de lluvia de escorrentías, aguas de irrigación y sedimentos son la bifentrina, la lambda cialotrina, la cipermetrina y la permetrina, por su utilización común para el control de plagas domiciliarias.

Las concentraciones de piretroides en el ambiente se encuentran en el rango de 0,0054 a 0,015 µg/l en fase disuelta y entre 0,0018 y 0,870 µg/l en el sedimento suspendido en áreas urbanas o agrícolas.

En estudios de pérdidas por escorrentías a partir de campos tratados se ha encontrado que menos de 1% a 10% del producto aplicado se introduce en las cuencas de agua. Después de aplicaciones simples o múltiples se ha encontrado que 1% del químico aplicado se encontraba durante todo el año. La mayor cantidad de escorrentía de pesticida ocurre después de eventos de fuertes lluvias, tan pronto después de la aplicación.

La deriva de las pulverizaciones de pesticidas es el movimiento físico del pesticida a través del aire en el momento de la aplicación o tan pronto después de la misma, a otro sitio no sometido a la aplicación. El incremento de la distancia desde la fuente de aplicación y la concentración depositada son inversas, lo que resulta en un gradiente de concentración en el agua. Generalmente las aplicaciones aéreas resultan en niveles mayores de deriva de aerosoles que las aplicaciones terrestres, lo que podría ser atribuido al equipamiento usado en los pulverizadores terrestres que reducen la deriva (Schleier y Peterson, 2011).

2.4.8 Ecotoxicología

Las piretrinas y piretroides son insecticidas de amplio espectro, por lo que su utilización también afecta a insectos benéficos, como parasitoides, predadores y abejas. Son también altamente tóxicos para organismos acuáticos. Las aves los eliminan rápidamente por la vía de la hidrólisis éster y oxidación, y en general eliminan estos insecticidas dos o tres veces más rápido que los mamíferos. Los piretroides son altamente tóxicos para peces e invertebrados acuáticos, excluyendo a los moluscos, y son ligeramente menos tóxicos para los anfibios.

En general, la toxicidad de los piretroides sobre los peces aumenta con el incremento del coeficiente de partición octanol – agua. La sensibilidad de los peces es debido principalmente a la pobre habilidad de metabolizar los piretroides. Los peces expuestos como la trucha muestran una muy baja o incluso nula actividad esterasa o de hidrólisis éster, que constituya la principal ruta de detoxificación para mamíferos y aves. La toxicidad sobre los anfibios no ha sido aun muy estudiada, y no está muy claro por qué resultan ser menos sensibles que otros organismos acuáticos a

los piretroides, más aún teniendo en cuenta que en general los anfibios son los organismos más sensibles a los contaminantes ambientales.

Los piretroides tipo II tienen una mayor toxicidad que las piretrinas y los piretroides tipo I tanto para invertebrados acuáticos como terrestres. La diferencia en toxicidad ha sido atribuida a la degradación disminuida de los piretroides ciano sustituidos tanto por las hidrolasas y oxidasas.

Contrariamente a su alto valor de K_{OW} , los piretroides presentan una mínima capacidad de biomagnificación a través de los niveles tróficos superiores de la cadena alimentaria, tanto en vertebrados como en invertebrados, debido a su rápido metabolismo y excreción.

Aunque los piretroides muestran una alta toxicidad aguda sobre organismos acuáticos cuando están en fase acuosa, la presencia de sedimento suspendido reduce sustancialmente la concentración disuelta libre de los piretroides y por tanto su biodisponibilidad. Los piretroides tienen una baja movilidad en suelos y están asociados con sedimentos en agua natural, por lo que estarán presentes en fase acuosa por un corto periodo de tiempo, limitando su exposición a muchos organismos.

La exposición crónica de los organismos que no tengan un estilo de vida béntico probablemente no resulte en efectos observables debido a que los piretroides se disipan rápidamente (la vida media de disipación en el agua es generalmente menos de un día). El pH del agua usado no influencia en la toxicidad de los piretroides pero el agua dura o salina puede incrementar la toxicidad sobre organismos acuáticos.

Actualmente las piretrinas, los piretroides y sus sinergistas que han sido registrados después de 1984 están siendo sometidos a la revisión de sus registros en los Estados Unidos para evaluar la efectividad de decisiones regulatorias recientes y para considerar nuevos datos.

La revisión de los registros está enfocada en la neurotoxicidad del desarrollo para considerar variaciones como el aumento o disminución del peso de las crías de

las ratas y/o el peso del cerebro. Además la USEPA recientemente ha actualizado las regulaciones sobre la deriva de las pulverizaciones de piretroides incrementando la distancia entre las áreas fumigadas y los ambientes acuáticos.

Aunque el uso de los piretroides como insecticidas se remonta desde hace casi 40 años, ellos siguen siendo muy utilizados. Esto es debido a su amplio espectro de acción sobre plagas, tasas de aplicación bajas, baja toxicidad sobre mamíferos y aves y un favorable perfil de destino ambiental. Además el uso apropiado de ellos permite que el desarrollo de resistencia de las plagas pueda ser manejada efectivamente, basando las regulaciones en evidencias científicas, con lo que se puede prever su utilización en el futuro próximo.

2.4.9 Reevaluación de la EPA de los piretroides, piretrinas y sinergistas

El programa de Revisión de reinscripción de la EPA sistemáticamente reevalúa cada 15 años todos los plaguicidas registrados, para asegurar que cada pesticida aún lleva a cabo con efectividad la función prevista sin excesivos efectos adversos sobre la salud humana o el medio ambiente.

Diez de las piretrinas, piretroides y sinergistas que fueron registrados antes del 1 de noviembre de 1984, fueron sujetos a la reinscripción por parte de la Agencia de protección Ambiental de los Estados Unidos (EPA). En el año 2008 la EPA completó la gestión de riesgos para las Decisiones de Admisibilidad para la Reinscripción (REDs) para estos 10 plaguicidas. Los piretroides registrados con posterioridad no fueron evaluados para la reinscripción. La reevaluación fue llevada a cabo desde el año fiscal 2010 hasta el año fiscal 2012, con la finalidad de evaluar la efectividad de las decisiones regulatorias recientes y considerar nuevos datos e informaciones acerca de los plaguicidas en cuestión.

Los pesticidas fueron introducidos dentro del programa de revisión del registro. La misma fue realizada para cada compuesto en particular. Los documentos relacionados al proceso de revisión del registro se encuentran todos disponibles en la página de la EPA para cada pesticida individual (US EPA 2011).

La EPA ha implementado ciertas iniciativas de etiquetado concerniente a la mitigación del riesgo ecológico. Los piretroides son altamente tóxicos para los organismos acuáticos. Estos compuestos se acumulan en los sedimentos por lo que el riesgo para los organismos que residen en los sedimentos representa una particular preocupación.

El monitoreo de la calidad de agua en California ha identificado piretroides en sedimentos de cuerpos de agua adyacentes a áreas residenciales urbanas. Los resultados de estos monitoreos, junto con datos específicos de piretroides adicionales, ponen en evidencia las preocupaciones que existen por el uso de los piretroides y su movimiento hacia áreas no blanco a través de esorrentías o la deriva de los aerosoles que pueden generarse durante las aplicaciones.

3- METODOLOGÍA

Se llevó a cabo un estudio computacional de modelado molecular, y experimental mediante la caracterización por espectrometría de masas, de moléculas pertenecientes a la familia de los piretroides, que corresponden a la Cipermetrina, Permetrina, Tetrametrina, Lambda Cialotrina, Alletrina y Fenotrina.

3.1 Materiales

3.1.1 Estudio teórico computacional

Los cálculos fueron realizados con el programa GAUSSIAN 09, Revisión A.02 e HiyperChem Release 8.0. Se utilizaron complementariamente los programas ACD/ChemSketck Versión 12 para Microsoft Windows y TCP Linda License para Linux. A excepción del programa ACD/ChemSketck de acceso libre, el acceso a los demás programas fue a través de financiamiento por parte de la Fundación von Humboldt y de proyectos de la ANPCyT.

3.1.2 Caracterización espectrométrica de las moléculas de piretroides

3.1.2.1 Reactivos utilizados

Se emplearon los siguientes reactivos de origen comercial:

- Acetonitrilo (ACN), grado HPLC
- Agua grado HPLC
- Metanol (MeOH) grado HPLC
- Ácido Fórmico para análisis.
- Acetato de Amonio.
- Piretroides, solución stock en MeOH, concentración 1 mg/ml

Cipermetrina, (*RS*)- -ciano-3-fenoxibenzil (*1RS,3RS;1RS,3SR*)-3-(2,2-diclorovinil)-2,2-dimetilciclopropanecarboxilato.

Permetrina, 3-fenoxibenzil (*1RS,3RS;1RS,3SR*)-3-(2,2-diclorovinil)-2,2-dimetilciclopropanecarboxilato.

Alletrina, (*RS*)-3-allil-2-metil-4-oxociclopent-2-enil (*1RS*)-cis-trans-2,2-dimetil-3-(2-metilprop-1-enil) ciclopropanecarboxilato.

Fenotrina, 3-fenoxibenzil (*1RS,3RS;1RS,3SR*)-2,2-dimetil-3-(2-metilprop-1-enil)ciclopropanecarboxilato.

Tetrametrina, ciclohex-1-ene-1,2-dicarboximidometil (*1RS,3RS;1RS,3SR*)-2,2-dimetil-3-(2-metilprop-1-enil)ciclopropanecarboxilato.

Lambda Cialotrina, (*R*)- -ciano-3-fenoxibenzil (*1S*)-cis-3-[(*Z*)-2-cloro-3,3,3-trifluoropropenil]-2,2-dimetilciclopropanecarboxilate y (*S*)- -ciano-3-fenoxibenzil (*1R*)-cis-3-[(*Z*)-2-chloro-3,3,3-trifluoropropenil]-2,2-dimetilciclopropanecarboxilato.

3.1.2.2 Equipos utilizados

Fue utilizado un cromatógrafo líquido acoplado a un detector de masas de cuadrupolo simple MSD-VL, con fuentes de ionización intercambiables de Electrospray (ESI) y de Ionización Química a Presión Atmosférica (APCI), de la marca Agilent Technologies, USA. Las muestras son ingresadas al sistema cromatográfico a través de un inyector con un loop de 20 µl. El control de los módulos instrumentales, así como la adquisición de los datos se realizaron a través de un programa informático para LC/MSD, Agilent ChemStation para GC, LC, CE, A/D, CE/MSD y LC/MSD Revisión - A.10.02 10-Ene-2004.

Los costos para la realización de las actividades referidas en esta sección fueron cubiertos por fondos del Proyecto Herramientas bioanalíticas para el diagnóstico ambiental de plaguicidas en zonas agrícolas bonaerenses. Proyecto de la Agencia Nacional de Promoción Científica y Técnica. PICT 0891 – Préstamo BID para la UNLP, y el proyecto N° 11-X-486 de la UNLP.

Los gastos de movilidad que requirieron la realización de este trabajo de tesis fueron cubiertos por el Programa de Becas Complementarias del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) dependiente de la presidencia de la República del Paraguay.

3.2 Métodos

3.2.1 Estudio computacional de las estructuras optimizadas de compuestos de la familia de piretroides

Se calcularon las geometrías moleculares de diversas estructuras correspondientes a la familia de los piretroides mediante métodos de la teoría funcional de la densidad (DFT). En particular se emplearon los funcionales híbridos B3LYP, B3PW91, B98 y B97-2, para el estudio teórico de cada una de las estructuras consideradas. Todos los métodos mencionados están accesibles y se llevaron a cabo con el programa GAUSSIAN 09 (Frisch et al., 2009).

En principio se realizó una búsqueda bibliográfica de datos experimentales disponibles para los piretroides estudiados. Los datos experimentales de interés para el trabajo son los referidos a parámetros moleculares como longitudes y ángulos de enlace, o información espectroscópica. De esta búsqueda resultó en la obtención de datos de la geometría molecular de la Cipermetrina, no así para los demás compuestos de los que no se encontró información en la bibliografía.

De cada una de las estructuras estudiadas, se realizó el cálculo de la geometría optimizada de la molécula neutra con los 4 funcionales utilizados. Con estos cálculos, se obtuvieron los datos de longitud de enlace, ángulos de enlace y ángulos diedros. Los datos obtenidos, son mostrados en la sección 4.1, y corresponden a los valores considerados más relevantes, en el sentido de poder estar participando en algún proceso que tiene lugar en la fuente de ionización del espectrómetro de masas; la ionización en si misma o en la fragmentación. Además, también fueron entresacados datos termoquímicos obtenidos a efectos de realizar comparaciones entre los distintos métodos.

Una vez que se obtuvo la conformación optimizada para las formas neutras, se procedió a realizar los cálculos de optimización de la geometría para las formas iónicas que pudieran estar involucradas en el proceso de ionización del espectro de masas. Específicamente fueron estudiadas las formas iónicas correspondientes al catión radical, al ión molecular protonado, a los iones secundarios resultantes de la formación de aductos con sodio y con amonio, y a los fragmentos iónicos más

importantes que fueron detectados y lograron identificarse. Los fragmentos iónicos que están descritos en este trabajo corresponden a fragmentos, cuyo mecanismo de formación ya han sido descritos previamente, en trabajos disponibles en la bibliografía.

El estudio computacional de las formas iónicas se llevó a cabo con el funcional B3LYP acoplado con el conjunto de bases 6-31G (d,p). Este método teórico fue elegido teniendo en cuenta que es el recomendado por la bibliografía para el análisis computacional de estructuras orgánicas con un número elevado de átomos (Alcamí et al., 2002). El conjunto de bases fue utilizado en todos los casos, considerando el alto costo computacional que se requeriría al hacer uso de bases mayores.

3.2.2 Caracterización espectrométrica de las moléculas de piretroides. Aplicación a la cuantificación en matrices ambientales

El estudio se llevó a cabo en un cromatógrafo de líquidos acoplado a un detector de masas de cuadrupolo simple (LC-MS), con fuentes de ionización intercambiables de Electrospray (ESI) y de Ionización Química a Presión Atmosférica (APCI), equipamiento disponible en el CIMA (Centro de Investigaciones del Medio Ambiente) y el INIFTA (Instituto de Investigaciones Teóricas, Fisicoquímicas y Aplicadas) de la Universidad Nacional de La Plata.

La preparación de los estándares se llevó a cabo por pesada de la cantidad determinada del analito en una balanza analítica y la dilución de los mismos en MeOH mediante la utilización de materiales de vidrio volumétricos. Las diluciones se llevaron a cabo con la utilización de micropipetas calibradas en matraces volumétricos de 10 ml.

3.2.3 Optimización del método de detección

Cada una de las soluciones stock de los piretroides fue diluida con un factor de dilución de $\frac{1}{2}$, obteniéndose por tanto soluciones nominales de 500 ppm, que fueron inyectadas al sistema cromatográfico, utilizando como fase móvil una mezcla isocrática de un solvente orgánico (ACN o MEOH) y un componente acuoso (Acido

fórmico 0,1%), en proporción 85:15 con una velocidad de flujo de 0,50 ml/min, utilizando como fuente de ionización ESI o APCI, en modo de detección positivo. Se barrieron en modo Scan distintas energías de ionización, empezando con un valor mínimo de 50 eV, con sucesivos incrementos de 20 eV hasta alcanzar el valor máximo de 400 eV. Se varió también la temperatura del gas de secado (300 y 350°C), para la determinación del efecto de la temperatura en el sistema separativo y de detección.

Para determinar la influencia de cada una de las variables experimentales estudiadas se realizaron los gráficos de relación entre la intensidad de los principales iones considerados para cada piretroide versus la energía de impacto electrónico de la fuente de ionización.

Para descartar la probable influencia del MeOH en la formación de aductos y la formación de los fragmentos iónicos para el caso específico de la Cipermetrina y la Lambda Cialotrina, también se realizaron las mismas determinaciones experimentales en condiciones de ausencia de MeOH, tanto en la solución stock y como componente de la fase móvil del sistema cromatográfico. Esto se realizó para la Cipermetrina, Lambda Cialotrina, Permetrina y Tetrametrina.

Una vez obtenidas las condiciones óptimas de separación y detección de cada estándar por separado, se realizaron mezclas de distintas concentraciones, de tal manera a obtener una técnica de identificación, y en lo posible de cuantificación de cada piretroide en la mezcla, por el seguimiento de los iones medidos para cada compuesto a través de la programación de un modo de Monitoreo de Ion Selectivo (SIM), según los distintos tiempos de retención.

Para lograr la resolución de los 6 piretroides en la mezcla, se programó la elución de la fase móvil, a partir de una mezcla ternaria en gradiente, estratificada en ventanas, por grupos de 2 piretroides, según el tiempo de retención. La mezcla ternaria fue constituida por un solvente orgánico (MeOH ó ACN), y la fase acuosa, constituida a su vez como una mezcla binaria de partes iguales de solución de Acido Fórmico al 0,1% y Acetato de Amonio 0,5%. Fueron llevadas a cabo varias mezclas de solventes en gradiente de concentraciones de cada uno de los componentes de la

fase móvil, para la elución de los analitos de la mezcla. Finalmente la proporción utilizada en el método optimizado de separación, para un tiempo de corrida total de 12 minutos se muestra en la Tabla 3.1.

Tabla 3.1: Gradiente de concentraciones de los solventes utilizados en la fase móvil para la elución de la mezcla de piretroides.

Tiempo de elución (min.)	Solvente B (fase orgánica: MeOH ó ACN) %	Solvente A (Fase Acosa: Acido Fórmico 0,1%-Acetato de Amonio 0,5% 1:1) %
0	70	30
1	70	30
3	80	20
5	90	10
12	95	5
13	70	30

Se estudió además la influencia de la presencia ó ausencia del MeOH en el sistema separativo. Los 3 grupos de piretroides fueron organizados según el tiempo de retención como se muestra en la tabla 3.2.

Tabla 3.2: Distribución de los piretroides para su elución en diferentes intervalos de tiempo.

Grupo	Intervalo de Tiempo (min)	Compuestos
1	6,0 – 8,4	Tetrametrina Alletrina
2	8,5 – 9,5	Lambda Cialotrina Cipermetrina
3	9,6 – 12,0	Fenotrina Permetrina

3.2.4 Modelado de propiedades fisicoquímicas y actividades biológicas

Se realizaron estudios de correlación estructura-actividad/propiedad, tipo QSAR/QSPR, empleando parámetros energéticos obtenidos por la modelización teórica de las estructuras de los piretroides considerados.

Las moléculas estudiadas: Cipermetrina, Permetrina, Tetrametrina, Fenotrina, Alletrina y Lambda Cialotrina, fueron cargadas de forma individual en el programa GAUSSIAN 09, Revisión A. 02, como fue detallado en el punto 3.2.1 de éste capítulo. A partir de los resultados obtenidos de los cálculos teóricos se obtuvieron los valores de energía de los orbitales moleculares, más alto ocupado (HOMO) y más

bajo desocupado (LUMO), para obtener finalmente la brecha energética HOMO – LUMO.

Se obtuvieron también los valores de Potencial de Ionización de cada molécula considerada (PI[M]) y de la Afinidad Protónica (AP[M]). Estos parámetros fueron calculados a partir de los valores de energía de la molécula neutra, el radical catión y la molécula protonada, según las Ecuaciones 3.1 y 3.2 (Foresman et al., 1996).

$$PI [M] = E[M^{\bullet+}] - E[M] \quad (3.1)$$

$$AP [M] = E [M] - E [M+H]^+ \quad (3.2)$$

Los principales iones detectados en el espectrómetro de masas fueron correlacionados con los parámetros energéticos que fueron descriptos: E_{H-L} , PI [M], y AP [M]. La distribución en porcentaje de los iones se obtuvo mediante la expresión de las intensidades absolutas de cada uno de los iones con respecto a la suma total de los mismos según la Ecuación 3.3 (Marino, 2009).

$$C_i = \frac{IC_i}{I_t} \times 100 \quad (3.3)$$

donde:

C_i es el porcentaje del ión i considerado,

IC_i es la intensidad absoluta del ión formado en la cámara del espectrómetro de masas, y

I_t es la suma de las intensidades absolutas de todos los iones.

El cálculo de las correlaciones se realizó con la planilla electrónica Excel de Microsoft Office.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Estudio computacional de las estructuras de los piretroides considerados

Se llevó a cabo un estudio computacional de las características estructurales y energéticas de las moléculas de piretroides consideradas en este estudio.

Los cálculos se realizaron empleando la teoría del funcional de la densidad con los funcionales híbridos B3LYP, B3PW91, B98 y B97-2, utilizando en todos los casos el conjunto de bases 6-31G (d,p) para el análisis de las formas neutras de las moléculas consideradas. Los diferentes iones, las formas protonadas, desprotonadas, los aductos y fragmentos considerados se estudiaron con el funcional híbrido B3LYP considerado por la literatura como el de mejor desempeño para el estudio de moléculas orgánicas en fase gaseosa (Alcamí et al., 2002). Además, al tratarse de moléculas relativamente grandes las consideradas en este estudio, con un número importante de átomos, y teniendo en cuenta el costo computacional relativamente alto, fue utilizado un solo funcional para obtener los datos referidos a las estructuras iónicas de los piretroides estudiados.

Los resultados del análisis computacional de la Cipermetrina, como longitudes de enlace y ángulos de la estructura optimizada con los diferentes funcionales teóricos, fueron comparados con valores experimentales resultantes del estudio de la estructura cristalina de la Cipermetrina por difracción de Rayos X. (Baert y Guelzim, 1991). Para las demás moléculas de piretroides no se encontraron datos experimentales en la bibliografía consultada.

Para cada molécula estudiada, se presentan las tablas correspondientes, con los datos obtenidos referidos a la geometría y a la energética de cada una de ellas. En cuanto a los datos geométricos presentados, se consideraron solamente las longitudes de enlace, ángulos de enlace y ángulos diedros más relevantes para este estudio, es decir aquellos valores referidos a alguna parte de la estructura molecular que podrían estar participando en el proceso de ionización y/o fragmentación que tienen lugar en el espectrómetro de masas.

A continuación se describen los resultados obtenidos en el estudio computacional de cada estructura considerada.

4.1.1 Cipermetrina

4.1.1.1 Geometría optimizada de la molécula neutra

En la Tabla 4.1.1.1 se muestran los resultados obtenidos para las longitudes de enlace entre los átomos considerados en la estructura de la Cipermetrina. Como se mencionó anteriormente, solamente se muestran los resultados correspondientes a los datos de valores geométricos más relevantes. El orden de los átomos a los cuales se hace referencia se muestra en la Figura 4.1.1.1, que corresponde a la estructura optimizada de la Cipermetrina con el funcional híbrido B3LYP.

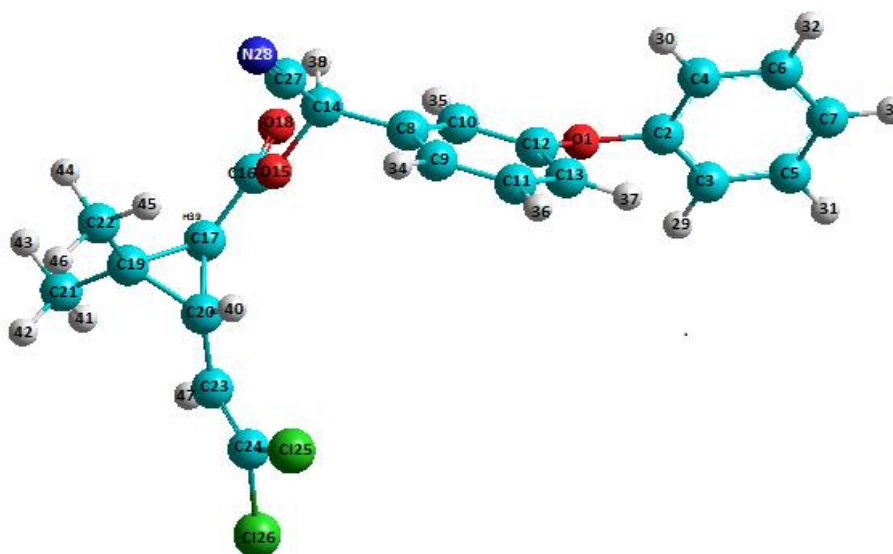


Figura 4.1.1.1: Geometría optimizada de la Cipermetrina al nivel de teoría B3LYP/6-31G (d,p)

Tabla 4.1.1.1: Comparación de las longitudes de enlace obtenidas con los distintos niveles de teoría

Parámetro	Datos	B3LYP	B3PW91	B98	B972
	experimentales*	6-31 G(d,p)	6-31 G(d,p)	6-31 G(d,p)	6-31 G(d,p)
Longitud de Enlace (Å)					
r(O1-C2)	1,394	1,3865	1,3828	1,3834	1,3822
r(O1-C12)	1,393	1,3758	1,3677	1,3718	1,3668
r(C8-C14)	1,509	1,5171	1,5210	1,5240	1,5212
r(C14-C27)	1,495	1,4706	1,4732	1,4851	1,4739
r(C27-N28)	1,146	1,1601	1,1599	1,1614	1,1588
r(C14-H38)	0,980	1,0939	1,0985	1,0954	1,0959
r(C14-O15)	1,439	1,4559	1,4258	1,4295	1,4241
r(O15-C16)	1,367	1,3665	1,3734	1,3753	1,3724
r(C16-O18)	1,204	1,2134	1,2063	1,2032	1,2040
r(C16-C17)	1,472	1,4850	1,4847	1,5062	1,4858
r(C17-C19)	1,523	1,5319	1,5321	1,5147	1,5292
r(C17-C20)	1,537	1,5355	1,5312	1,5489	1,5266
r(C19-C20)	1,515	1,5172	1,5096	1,5384	1,5083
r(C19-C21)	1,516	1,5199	1,5156	1,5238	1,5158
r(C19-C22)	1,507	1,5212	1,5140	1,524	1,5143
r(C20-C23)	1,467	1,4750	1,4704	1,4778	1,4709
r(C23=C24)	1,312	1,3369	1,3372	1,3406	1,3366
r(C24-Cl25)	1,719	1,7447	1,7359	1,7515	1,732
r(C24-Cl26)	1,715	1,7473	1,7308	1,7415	1,7266
Desviación promedio		0,0091	0,0085	0,0107	0,0084

*(Baert y Guelzim, 1991)

En la Tabla 4.1.1.1 puede observarse que las diferencias entre los valores de longitud de enlaces son muy pequeñas, considerando cada uno de los funcionales utilizados.

Tabla 4.1.1.2: Comparación de los ángulos de enlace obtenidos con los distintos niveles de teoría

Parámetro	Datos	B3LYP	B3PW91 6-	B98	B972
	experimentales*	6-31G(d,p)	31G(d,p)	6-31 G(d,p)	6-31 G(d,p)
Ángulo de enlace (grados)					
<(C2-O1-C12)	118,3	120,7177	120,2251	120,6032	120,2485
<(C8-C14-C27)	110,4	113,5036	110,3728	111,0175	110,3648
<(C8-C14-O15)	108,2	110,6665	113,8277	109,2543	113,9689
<(C14-O15-C16)	114,6	115,8787	122,5539	122,4596	122,8861
<(O15-C16-O18)	122,7	123,1629	116,643	117,449	116,5966
<(O15-C16-C17)	109,9	113,2178	119,0847	117,3752	119,0887
<(C17-C19-C22)	120,4	115,5354	120,2593	117,0554	115,7611
<(C17-C19-C21)	114,7	120,9602	115,5795	120,3501	120,2217
<(C17-C20-C23)	122,1	119,4071	119,7214	119,1683	119,769
<(C20-C23-C24)	124,5	125,8131	125,6584	125,9928	125,7647
<(C23-C24-Cl25)	122,7	124,1072	121,6688	121,4431	121,596
<(C23-C24-Cl26)	124,2	114,0397	124,127	124,3639	124,2013
Desviación promedio		1,6561	1,5182	1,6417	1,9247

*(Baert y Guelzim, 1991)

Tabla 4.1.1.3: Comparación de los ángulos diedros (en grados) obtenidos con los distintos niveles de teoría

Parámetro	Datos	B3LYP	B3PW91	B98	B972
	experimentales*	6-31 G(d,p)	6-31 G(d,p)	6-31 G(d,p)	6-31 G(d,p)
Ángulo Diedro (grados)					
D(C2-O1-C12-C13)	-160	-28,4643	27,4564	29,3631	27,9375
D(C10-C8-C14-O15)	-106,2	90,5361	-31,9234	-36,3491	-32,5962
D(C10-C8-C14-C27)	s/d	-150,2083	86,6807	83,4646	86,0328
D(C8-C14-O15-C16)	-159,6	-101,2727	-74,4353	-151,6112	-73,1154
D(C14-O15-C16-O18)	7	0,9264	-178,7598	165,5641	179,6607
D(O15-C16-C17-C19)	s/d	50,9497	133,1544	158,2741	130,5858
D(O15-C16-C17-C20)	s/d	-22,327	-158,3795	84,8664	-160,6795
D(C16-C17-C20-C23)	s/d	-130,9707	134,7809	134,5995	134,6376
D(C20-C23-C24-CL25)	s/d	0,1088	-179,5981	-179,8811	-179,6693
D(C20-C23-C24-CL26)	s/d	-179,9549	0,2726	-0,2471	0,2359

* (Baert y Guelzim 1991) s/d: sin datos

En las Tablas 4.1.1.2 y 4.1.1.3 se exponen los ángulos de enlace y los ángulos diedros. En estos casos se observa una diferencia más marcada entre un método y otro. Se observa además que con respecto a los valores experimentales hay una mayor desviación promedio comparada con las encontradas en los valores de ángulos de enlace. En la Tabla 4.1.1.4 se exponen los valores de datos termoquímicos que resultaron de los cálculos con cada uno de los métodos estudiados.

Tabla 4.1.1.4: Comparación de los parámetros termoquímicos obtenidos con los distintos niveles de teoría

Parámetro	B3LYP	B3PW91	B98	B972
	6-31 G(d,p)	6-31 G(d,p)	6-31 G(d,p)	6-31 G(d,p)
Energía (kcal/mol)	-1286747,1	-1286401,6	-1286380,6	-1286521,8
RMS	1,64E-06	2,72E-06	2,60E-06	2,71E-06
Momento Dipolar	2,0877	7,6701	5,0300	7,6715
Energía Vibracional del Punto Zero (kcal/mol)	225,70672	226,29787	224,94758	227,55226
Corrección del Punto Zero (Hartree/partícula)	0,359687	0,360629	0,358477	0,362628
Corrección térmica de la Energía	0,386418	0,387226	0,385362	0,389141
Corrección térmica de la Entalpía	0,387362	0,38817	0,386306	0,390085
Corrección térmica de la Energía Libre de Gibbs	0,296000	0,298025	0,294706	0,300064
Suma de las Energías electrónica y del Punto Zero	-2050,2023	-2049,6507	-2049,6194	-2049,8403
Suma de las Energías electrónica y térmica	-2050,1755	-2049,6241	-2049,5925	-2049,8138
Suma de las Entalpías electrónica y térmica	-2050,1746	-2049,6232	-2049,5916	-2049,8129
Suma de la Energía electrónica y Energía libre térmica	-2050,2659	-2049,7133	-2049,6832	-2049,9029

4.1.1.2 Formas Iónicas protonada y desprotonada

Mediante cálculos teóricos se realizó también el modelado de la estructura de la Cipermetrina en sus formas iónicas protonada y desprotonada ($[M+H]^+$ y $[M^\bullet]^+$). Se considera que bajo el proceso de ionización que tiene lugar en el espectrómetro de masas, estas formas son posibles con la utilización de interfases de ionización a presión atmosférica (API), para el acoplamiento de cromatógrafos líquidos y el equipo espectrométrico (Gross, 2006).

Se determinaron de igual manera que con la estructura neutra de la Cipermetrina, las estructuras optimizadas, con los correspondientes valores geométricos y los valores termoquímicos. Los cálculos fueron realizados con el funcional híbrido B3LYP y el conjunto de bases 6-31G (d,p). Las estructuras optimizadas de estas formas iónicas, ión radical e ión protonado, se observan en la Figura 4.1.1.2 y los datos obtenidos de los cálculos a este nivel de teoría, se presentan en las Tablas 4.1.1.5, 4.1.1.6 y 4.1.1.7.

A) $[M+H]^+$

B) $[M^\bullet]^+$

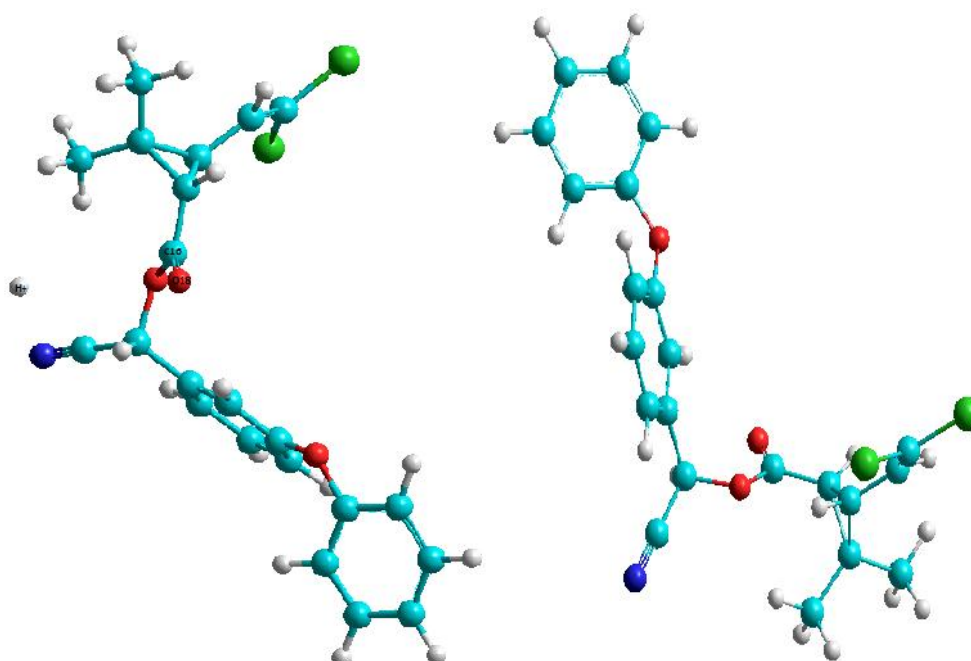


Figura 4.1.1.2: Geometría optimizada de la Cipermetrina en su formas iónicas A) $[M+H]^+$ y B) $[M^\bullet]^+$ al nivel de teoría B3LYP/6-31G (d,p)

Tabla 4.1.1.5: Parámetros geométricos optimizados obtenidos para la forma iónica $[M+H]^+$ de la Cipermetrina con el nivel de teoría B3LYP / 6-31 G(d,p)

Parámetro	Longitud de Enlace (Å)	Parámetro	Ángulo de enlace (grados)
r(O1-C2)	1,3608	<(C2-O1-C12)	124,2019
r(O1-C12)	1,3729	<(C8-C14-C27)	112,9549
r(C8-C14)	1,5218	<(C8-C14-O15)	110,9122
r(C14-C27)	1,4685	<(C14-O15-C16)	115,601
r(C27-N28)	1,1597	<(O15-C16-O18)	123,2462
r(C14-H38)	1,094	<(O15-C16-C17)	113,6693
r(C14-O15)	1,4553	<(C17-C19-C22)	116,233
r(O15-C16)	1,3640	<(C17-C19-C21)	121,3301
r(C16-O18)	1,2115	<(C17-C20-C23)	119,503
r(C16-C17)	1,4901	<(C20-C23-C24)	125,6076
r(C17-C19)	1,5144	<(C23-C24-C125)	123,4733
r(C17-C20)	1,5433	<(C23-C24-C126)	121,1975
r(C19-C20)	1,5493	Parámetro	Ángulo Diedro (grados)
r(C19-C21)	1,5191	D(C2-O1-C12-C13)	-36,2294
r(C19-C22)	1,5199	D(C10-C8-C14-O15)	89,2459
r(C20-C23)	1,4545	D(C10-C8-C14-C27)	-151,8907
r(C23=C24)	1,3572	D(C8-C14-O15-C16)	-95,2849
r(C24-CL25)	1,7279	D(C14-O15-C16-O18)	5,378
r(C24-CL26)	1,7555	D(O15-C16-C17-C19)	55,7383
r(H+-O18)	3,4948	D(O15-C16-C17-C20)	-18,9286
r(H+-C16)	3,6171	D(C16-C17-C20-C23)	-132,3236
		D(C20-C23-C24-C125)	-0,1048
		D(C20-C23-C24-C126)	179,8092

En la Tabla 4.1.1.5 se muestran los datos referentes a los parámetros geométricos optimizados del ión molecular protonado $[M+H]^+$. Realizando una rápida comparación con respecto a los valores obtenidos para el cálculo realizado a la estructura neutra de la Cipermetrina, no se observan diferencias muy significativas, aún en las localizaciones en donde se produce la interacción con el catión H^+ del medio. Esto es, por ejemplo en las longitudes y ángulos de enlace entre el C16 y el O18, que corresponden al Carbono y Oxígeno carbonílicos. La interacción del protón se supone en esta zona, por la presencia del doble par electrónico libre del Oxígeno carbonílico, que actuaría como dador de la carga negativa para el establecimiento de la interacción Ión - Dipolo carbonílico.

Tabla 4.1.1.6: Parámetros geométricos optimizados para la forma iónica $[M^+]^+$ de la Cipermetrina con el nivel de teoría B3LYP / 6-31 G(d,p)

Parámetro	Longitud de Enlace (Å)	Parámetro	Ángulo de enlace (grados)
r(O1-C2)	1,3608	<(C2-O1-C12)	124,1709
r(O1-C12)	1,373	<(C8-C14-C27)	112,9364
r(C8-C14)	1,5219	<(C8-C14-O15)	110,8756
r(C14-C27)	1,4684	<(C14-O15-C16)	115,6007
r(C27-N28)	1,1597	<(O15-C16-O18)	123,2292
r(C14-H38)	1,0940	<(O15-C16-C17)	113,6655
r(C14-O15)	1,4553	<(C17-C19-C22)	116,2122
r(O15-C16)	1,3642	<(C17-C19-C21)	121,3865
r(C16-O18)	1,2115	<(C17-C20-C23)	119,5007
r(C16-C17)	1,4902	<(C20-C23-C24)	125,6108
r(C17-C19)	1,5144	<(C23-C24-CL25)	123,4707
r(C17-C20)	1,5432	<(C23-C24-CL26)	121,2026
r(C19-C20)	1,5438	Parámetro	Ángulo Diedro (grados)
r(C19-C21)	1,5190	D(C2-O1-C12-C13)	-36,2899
r(C19-C22)	1,5200	D(C10-C8-C14-O15)	89,4662
r(C20-C23)	1,4545	D(C10-C8-C14-C27)	-151,668
r(C23=C24)	1,3572	D(C8-C14-O15-C16)	-95,3962
r(C24-C125)	1,7279	D(C14-O15-C16-O18)	5,0425
r(C24-C126)	1,7254	D(O15-C16-C17-C19)	55,3291
		D(O15-C16-C17-C20)	-19,3174
		D(C16-C17-C20-C23)	-132,079
		D(C20-C23-C24-C125)	-0,1031
		D(C20-C23-C24-C126)	179,814

Por otra parte, en la Tabla 4.1.1.6 se muestran los datos geométricos de la estructura optimizada del ión radical $[M^{\bullet}]^+$. Este ión en general es formado en condiciones de ionización electrónica, por abstracción de un electrón (Gross, 2004). En las condiciones experimentales de trabajo sin embargo, las condiciones de ionización fueron con los llamados métodos de ionización suaves (McLafferty y Turecek, 1993), utilizando las fuentes de ionización ESI y APCI, por lo que experimentalmente no se observó la formación de iones del tipo $[M^{\bullet}]^+$. Los cálculos teóricos de los datos geométricos fueron realizados solo a efectos de comparación.

En general se observa que las diferencias en todos los valores geométricos prácticamente no difieren de los que se observan para la estructura del ion $[M+H]^+$,

inclusive, por ejemplo, en la longitud de enlace entre el O de la posición 18 y el C de la posición 16 (enlace carbonílico) que se mantiene con el mismo valor de 1,2115 Å.

La longitud de enlace éster tampoco difiere en las dos estructuras iónicas. El ángulo de enlace en esta posición de la molécula (\angle (O15-C16-O18)), tampoco presenta diferencias. Comparando las dos estructuras iónicas con respecto a los valores obtenidos para la molécula neutra, las diferencias no son muy significativas.

Realizando una comparación similar a la hecha con los datos de los valores geométricos, pero con respecto a los valores termoquímicos obtenidos a través de los cálculos teóricos, se puede ver que no existen diferencias muy significativas entre las tres estructuras ya mencionadas, esto es para la forma neutra de la Cipermetrina, el ión radical y el ión protonado.

Tabla 4.1.1.7: Comparación de los parámetros termoquímicos obtenidos con el nivel de teoría B3LYP/6-31G (d,p) para las formas iónicas $[M+H]^+$ y $[M]^+$ de la Cipermetrina

Parámetro	$[M+H]^+$	$[M]^+$
Energía (kcal/mol)	-1286574,5	-1286888,6
RMS	4,17E-06	1,40E-06
Momento Dipolar	8,7138	8,7788
Energía Vibracional del Punto Zero (kcal/mol)	225,11466	225,3819
Corrección del Punto Zero (Hartree/partícula)	0,358743	0,359169
Corrección térmica de la Energía	0,385529	0,388383
Corrección térmica de la Entalpía	0,386473	0,389327
Corrección térmica de la Energía Libre de Gibbs	0,295736	0,291456
Suma de las Energías electrónica y del Punto Zero	-2049,928106	-2050,428336
Suma de las Energías electrónica y térmica	-2049,901321	-2050,399122
Suma de las Entalpías electrónica y térmica	-2049,900377	-2050,398178
Suma de la Energía electrónica y Energía libre térmica	-2049,991111	-2050,496049

4.1.1.3 Formación de Aductos

En el espectrómetro de masas, durante el proceso de formación de los iones también es posible la generación de aductos con cationes como Sodio (Na^+), Amonio (NH_4^+), Potasio (K^+) y otros compuestos que están presentes en el medio de reacción. Estos aductos se generan espontáneamente por la presencia de las sales como contaminantes, o por inducción, mediante el agregado de soluciones dopantes al medio de reacción (Hoffmann y Stroobant, 2007).

En este trabajo se vio la formación de aductos con los cationes Na^+ , NH_4^+ (por inducción) y para el caso de la Cipermetrina, también se observó un aducto $[\text{M}+33]^+$, que se presume, corresponde al aducto de la forma protonada de la Cipermetrina con el solvente metanol (PM=32) $[\text{M}+\text{H}+32]^+$.

Se realizó también el modelado teórico de las posibles estructuras correspondientes a estos compuestos, obteniéndose los parámetros geométricos de las estructuras optimizadas correspondientes y los datos termoquímicos.

A continuación se presentan las estructuras optimizadas y las tablas con los valores respectivos

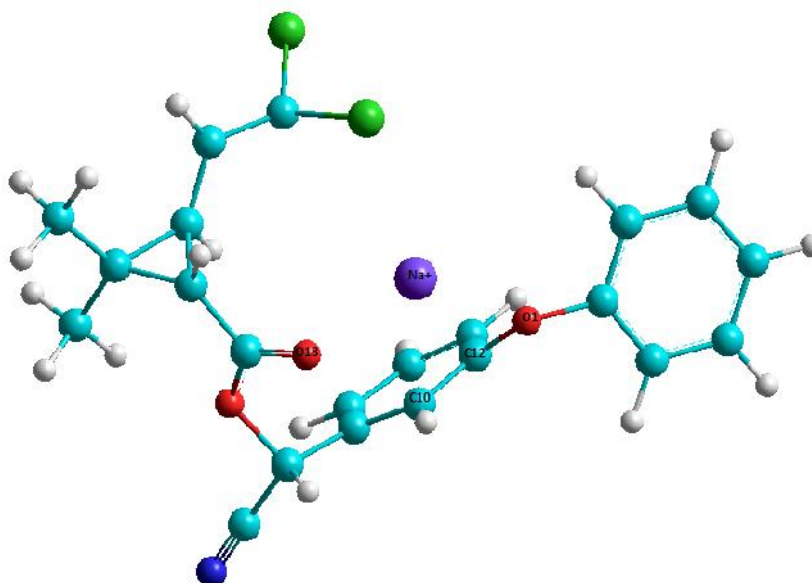


Figura 4.1.1.3: Estructura optimizada de $[\text{M}+\text{Na}]^+$ al nivel de teoría B3LYP/6-31G (d,p)

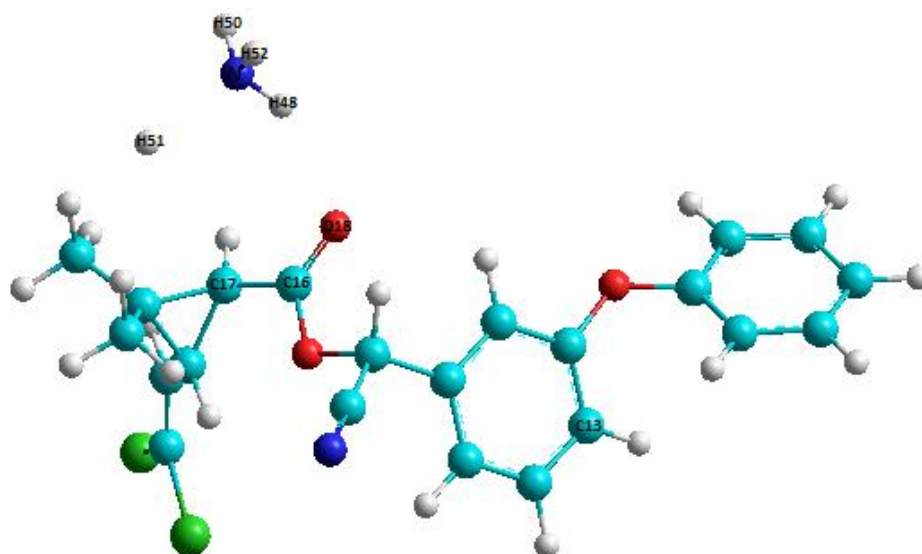


Figura 4.1.1.4: Estructura optimizada de $[M+NH_4]^+$ al nivel de teoría B3LYP/6-31G (d,p)

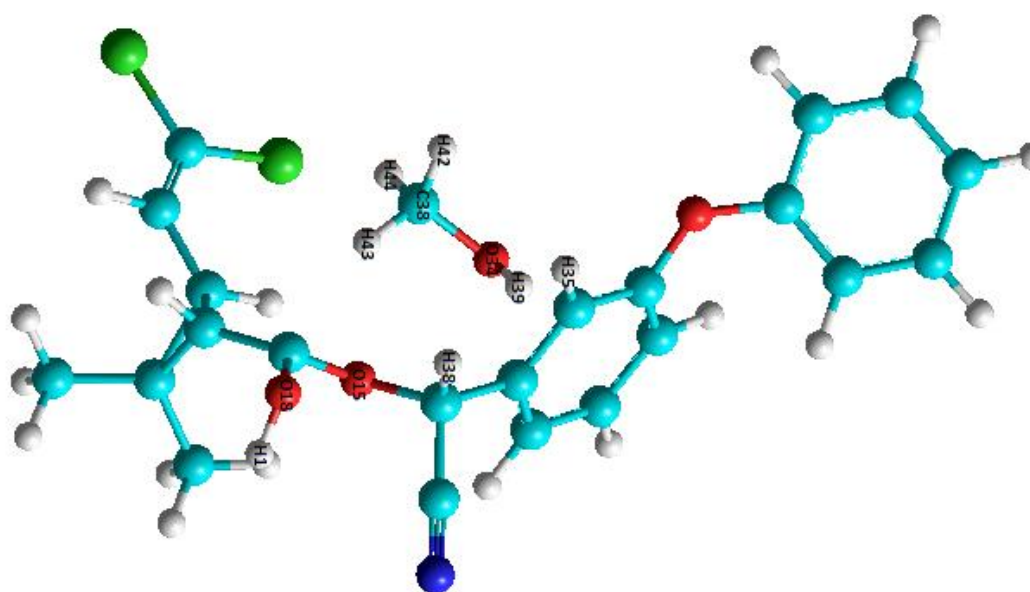


Figura 4.1.1.5: Estructura optimizada de $[M+H+32]^+$ al nivel de teoría B3LYP/6/31G (d,p)

La Figura 4.1.1.3 muestra la estructura optimizada del aducto de la molécula de la Cipermetrina con el ión Sodio $[M+Na]^+$. Por la orientación de la estructura optimizada se presume la interacción del ión Na^+ con el O Carbonílico (O18). Experimentalmente, en este trabajo, se vio la formación de este aducto a bajas energías de impacto electrónico pero con muy baja intensidad en presencia de MeOH en la fase móvil. Con ACN en la fase móvil, sin embargo, los iones de mayor predominancia en cuanto a abundancia son los aductos que corresponden a la $m/z=$

448 y $m/z=240$. Estos iones corresponderían al aducto $[M+H+32]^+$ y al ión fragmento $[240]^+$, respectivamente, que se estima se tratan de los aductos formados con una molécula del solvente MeOH, utilizado en la preparación de la solución stock del estándar.

La estructura optimizada del aducto $[M+H+32]^+$ se muestra en la Figura 4.1.1.5, mientras que la del ión fragmento se muestra más adelante en la Figura 4.1.1.7. Suprimiendo la utilización de MeOH en la preparación de la solución stock, y llevando a cabo la corrida cromatográfica con ACN, predominan en abundancia los iones de $m/z=433$ y $m/z=438$ que corresponden a los aductos del ión molecular con los iones Na^+ y NH_4^+ , respectivamente.

La estructura optimizada del aducto $[M+NH_4]^+$, se muestra en la Figura 4.1.1.4. En esta estructura, y teniendo en cuenta las distancias de enlace que se presentan en la Tabla 4.1.1.9, se supone la interacción del protón H^+ (H51) y del H48 del ión NH_4^+ con el Oxígeno carbonílico (O18).

Tabla 4.1.1.8: Parámetros geométricos optimizados de los aductos formados con la Cipermetrina con el nivel de teoría B3LYP / 6-31 G (d,p)

Parámetro	$[M+Na]^+$	$[M+NH_4]^+$	$[M+H+32]^+$
	Longitud de Enlace (Å)		
r(O1-C2)	1,4126	1,3641	1,3658
r(O1-C12)	1,3901	1,3731	1,3697
r(C8-C14)	1,5176	1,5208	1,5183
r(C14-C27)	1,4660	1,4685	1,4762
r(C27-N28)	1,1593	1,1596	1,1606
r(C14-H38)	1,0936	1,0933	1,0964
r(C14-O15)	1,4732	1,4508	1,4453
r(O15-C16)	1,3406	1,3575	1,3828
r(C16-O18)	1,2351	1,2150	1,3694
r(C16-C17)	1,4727	1,4901	1,4812
r(C17-C19)	1,5148	1,5073	1,5130
r(C17-C20)	1,6035	1,5449	1,5411
r(C19-C20)	1,5129	1,5671	1,5684
r(C19-C21)	1,5226	1,5167	1,5179
r(C19-C22)	1,5238	1,5177	1,5188
r(C20-C23)	1,4512	1,4475	1,4487
r(C23=C24)	1,4484	1,3615	1,3594
r(C24-C125)	1,7173	1,7205	1,7283
r(C24-C126)	1,8294	1,7231	1,7255

Tabla 4.1.1.9: Parámetros geométricos optimizados de los aductos formados con la Cipermetrina con el nivel de teoría B3LYP / 6/31 G (d,p). Relación entre los cationes Na⁺ y NH₄⁺, y el solvente MeOH con los átomos de la Cipermetrina.

[M+Na] ⁺	Longitud de Enlace (Å)	[M+NH ₄] ⁺	Longitud de Enlace (Å)	[M+H+32] ⁺	Longitud de Enlace (Å)
r(Na-O1)	2,4833	r(O18-H48)	2,3119	r(H1-O18)	0,9766
r(Na-O18)	2,2944	r(O18-H51)	3,7252	r(O34-H38)	2,1795
r(Na-C10)	2,7303	r(C17-H51)	3,5256	r(O34-H35)	2,326
r(Na-C12)	2,84	r(N-H48)	1,0161	r(O34-H39)	0,9661
		r(N-H50)	1,0152	r(O34-C38)	1,4315
		r(N-H51)	1,9543	r(C38-H42)	1,0917
		r(N-H52)	1,0151	r(C38-H43)	1,0966
		r(C16-H48)	3,1055	r(C38-H44)	1,0961
		r(C16-H51)	3,7178		

Para el caso del aducto ión molecular protonado con MeOH, se buscó la geometría optimizada considerando la interacción del protón H1 (del medio de reacción) con el O18 del grupo carbonílico. El O34 de la molécula de MeOH interacciona, presumiblemente a través de uniones tipo dipolo – dipolo inducido con átomos de H de la molécula de Cipermetrina, uno de ellos, el H38 unido al C en posición a la estructura aromática, y el otro H (H35) unido a su vez a uno de los anillos aromáticos de la Cipermetrina.

En cuanto a los valores geométricos, que se listan en las Tablas 4.1.1.8, 4.1.1.9 y 4.1.1.10, no se observan diferencias muy importantes en las longitudes y ángulos de enlace. Solo para el aducto [M+H+32]⁺, se observa un incremento en la longitud del enlace tipo éster (r(O15-C16)) y el enlace carbonílico, sobre todo este último, con respecto a las distancias de enlace de la molécula neutra y de los demás aductos. Esto puede ser debido a la fuerte interacción del O18 con el H⁺ (H1), demostrado también por la corta longitud de enlace (0,9766 Å) presente en esta interacción.

Los valores termoquímicos resultantes de los cálculos teóricos con el funcional B3LYP para los tres aductos considerados, se muestran en la Tabla 4.1.1.11.

Tabla 4.1.1.10: Parámetros geométricos optimizados de los aductos formados con la Cipermetrina con el nivel de teoría B3LYP 6-31 G (d,p). Ángulos de enlace y ángulos diedros

Parámetro	[M+Na] ⁺	[M+NH ₄] ⁺	[M+H+32] ⁺
	Ángulo de Enlace (grados)		
<(C2-O1-C12)	119,356	123,8688	123,9824
<(C8-C14-C27)	113,7708	112,803	112,0247
<(C8-C14-O15)	109,8616	110,9774	107,7818
<(C14-O15-C16)	118,4684	115,9899	115,6304
<(O15-C16-O18)	122,9928	123,0867	117,2324
<(O15-C16-C17)	115,576	113,633	115,6814
<(C17-C19-C22)	114,2343	116,3798	117,4315
<(C17-C19-C21)	121,8986	121,3793	121,2324
<(C17-C20-C23)	117,6032	119,9094	120,4979
<(C20-C23-C24)	119,8472	125,515	125,8702
<(C23-C24-C125)	121,2224	123,4093	123,4295
<(C23-C24-C126)	116,4972	121,0915	121,2746
Parámetro	Ángulo Diedro (grados)		
D(C2-O1-C12-C13)	-35,3042	-36,1961	-33,5903
D(C10-C8-C14-O15)	94,7993	95,8791	110,0915
D(C10-C8-C14-C27)	-147,9155	-145,7574	-130,3302
D(C8-C14-O15-C16)	-73,5726	-92,0113	-149,4636
D(C14-O15-C16-O18)	-3,9265	4,6278	-34,334
D(O15-C16-C17-C19)	2,2668	57,4463	48,4008
D(O15-C16-C17-C20)	66,1249	-17,8612	-27,513
D(C16-C17-C20-C23)	-116,738	-133,0902	-129,427
D(C20-C23-C24-CL25)	122,982	-0,3094	0,1766
D(C20-C23-C24-CL26)	-93,0982	179,6397	-179,7614

Tabla 4.1.1.11: Comparación de los parámetros termoquímicos obtenidos con el nivel de teoría B3LYP/6-31G (d,p) para los aductos $[M+Na]^+$, $[M+NH_4]^+$ y $[M+H+32]^+$ de la Cipermetrina

Parámetro	$[M+Na]^+$	$[M+NH_4]^+$	$[M+H+32]^+$
Energía (kcal/mol)	-1388448,416	-1322385,408	-1359531,881
RMS	3,27E-06	3,45E-06	4,36E-06
Momento Dipolar	4,3309	9,4541	5,7346
Energía Vibracional del Punto Zero (kcal/mol)	224,4169	249,33164	263,72479
Corrección del Punto Zero (Hartree/partícula)	0,357631	0,397335	0,420272
Corrección térmica de la Energía	0,386645	0,4294	0,453176
Corrección térmica de la Entalpía	0,387589	0,430345	0,45412
Corrección térmica de la Energía Libre de Gibbs	0,292322	0,326322	0,346841
Suma de las Energías electrónica y del Punto Zero	-2212,2756	-2106,9579	-2166,1316
Suma de las Energías electrónica y térmica	-2212,2466	-2106,9258	-2166,09869
Suma de las Entalpías electrónica y térmica	-2212,2457	-2106,9249	-2166,09775
Suma de la Energía electrónica y Energía libre térmica	-2212,3409	-2107,0289	-2166,20503

4.1.1.4 Fragmentos de la Cipermetrina

Durante el proceso de ionización se da también la fragmentación de la molécula en estudio, ya que al obtener suficiente energía durante la ionización puede tener lugar la ruptura de enlaces, para la formación de especies químicas nuevas que también alcanzan el detector del espectrómetro de masas. Se sabe que con la utilización de las fuentes de ionización ESI y APCI, para sistemas de acoplamiento HPLC / MS, son posibles diversos mecanismos de fragmentación de la molécula (McLafferty y Turecek, 1993; Hoffmann y Stroobant, 2007)

En este trabajo se identificaron dos fragmentos iónicos mayoritarios, correspondientes a distintas condiciones experimentales.

Con la utilización del solvente metanol, tanto como disolvente del analito y como componente de la fase orgánica de la cromatografía líquida, se ha identificado al ión fragmento de $m/z=240$, como mayoritario con respecto a otros fragmentos iónicos también generados en el espectrómetro de masas. Al excluir el metanol, tanto como disolvente y como solvente durante la cromatografía, se obtuvo que el principal fragmento iónico observado corresponde a la especie de $m/z=181$.

Experimentalmente, el ión fragmento de $m/z= 240$ es la principal especie iónica detectada cuando se utiliza ACN como fase móvil, y alcanza un pico de máxima abundancia con una energía de impacto electrónico de 210 eV, el ión de $m/z= 448$, mencionado anteriormente, en estas condiciones, también se presenta con una abundancia muy interesante, a energías de impacto electrónico inferiores.

Con la utilización de MeOH en la fase móvil, estos dos iones se presentan también de manera más importante en cuanto a intensidad, pero también aparecen otros iones como los aductos con sodio y amonio. Suprimiendo el MeOH de las condiciones experimentales, el ión de $m/z=181$ es el fragmento más importante, pero en intensidad los aductos con sodio y amonio, cobran mayor importancia, aunque se observen a energías de impacto electrónico más bajas.

La presencia mayoritaria de un fragmento con respecto a otros durante la ionización se relaciona directamente con la energía interna y estabilidad de los fragmentos. Se hicieron varios estudios proponiendo mecanismos posibles de fragmentación tanto de la Cipermetrina como de otros compuestos relacionados (Fleet, et al., 1993; Pattenden et al., 1973).

Según el mecanismo propuesto el fragmento 240 corresponde al ión resultante de la escisión del enlace entre el carbono en posición α y el oxígeno del ácido, con lo que el resto acídico se libera como molécula neutra, mientras que el fragmento iónico corresponde a la estructura del alcohol ciano 3-fenoxi bencil, de PM igual a 208. Se propone que este fragmento iónico forma un aducto con el metanol lo que resulta en el ión positivo de PM igual a 240, que es el detectado en el espectrómetro de masas.

El fragmento iónico de PM 181 corresponde al ión tipo tropilio benzofurano según el mecanismo propuesto por (Fleet et al., 1993). Este ión también resulta de la separación del resto acídico de la estructura de la Cipermetrina como molécula neutra y por otro lado, también de la ruptura del resto ciano, y por un mecanismo de re arreglo queda finalmente la estructura del ión tropilio.

Se realizó de igual modo que con las estructuras anteriores, un estudio computacional con el nivel de teoría B3LYP y con el conjunto de bases 6-31G (d,p) para los dos iones principales considerados en este trabajo.

A continuación se resumen en las Tablas los valores obtenidos para las geometrías optimizadas de los dos fragmentos, como también los valores termoquímicos y las estructuras optimizadas resultantes.

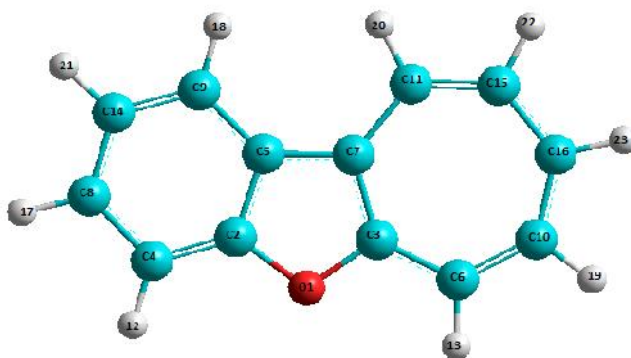


Figura 4.1.1.6: Estructura optimizada del ión $[181]^+$ correspondiente al ion tipo tropilio benzofurano

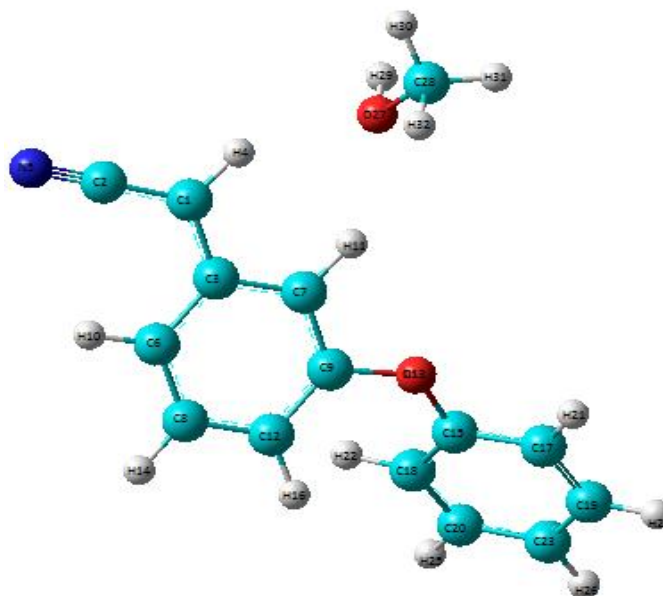


Figura 4.1.1.7: Estructura optimizada del ión $[240]^+$ correspondiente al ión ciano 3-fenoxi bencil formando el aducto con la molécula del metanol.

Tabla 4.1.1.12: Parámetros geométricos optimizados del fragmento [181]⁺ con el nivel de teoría B3LYP 6-31G (d,p)

Parámetro	[181] ⁺ Longitud de Enlace (Å)
r(O1-C2)	1,3814
r(O1-C3)	1,3471
r(C2-C5)	1,4248
r(C3-C7)	1,4325
r(C2-C4)	1,3605
r(C5-C9)	1,4381
r(C9-C14)	1,3858
r(C14-C8)	1,4071
r(C4-C8)	1,4367
r(C3-C6)	1,4165
r(C7-C11)	1,4615
r(C6-C10)	1,3857
r(C10-C16)	1,4148
r(C16-C15)	1,4335
r(C11-C15)	1,3625
Parámetro	Ángulo de enlace (grados)
<(C2-O1-C3)	107,4035
<(O1-C2-C4)	126,4087
<(O1-C2-C5)	109,3171
<(O1-C3-C7)	110,8722
<(O1-C3-C6)	116,955
Parámetro	Ángulo Diedro (grados)
D(O1-C3-C6-C10)	-179,9993
D(O1-C3-C7-C11)	-179,9977
D(O1-C2-C4-C8)	-180,0003
D(O1-C2-C5-C9)	179,9999
D(O1-C3-C7-C5)	0,002
D(O1-C2-C5-C7)	0,0008

Tabla 4.1.1.13: Parámetros geométricos optimizados del fragmento [208+32]⁺ con el nivel de teoría B3LYP 6-31G (d,p)

Parámetro	[208+32] ⁺ Longitud de Enlace (Å)
r(O10-C15)	1,3642
r(C91-O13)	1,3518
r(C1-C3)	1,4282
r(C1-H4)	1,0883
r(C1-C2)	1,3989
r(C2-N5)	1,1716
r(C7-H11)	1,0879
r(O27-H11)	2,2382
r(O27-H4)	2,2389
r(O27-C28)	1,4341
r(O27-H29)	0,9664
r(C28-H30)	1,0915
r(C28-H31)	1,0958
r(C28-H32)	1,0963
Parámetro	Ángulo de enlace (grados)
<(C9-O13-C15)	126,6473
<(C2-C1-C3)	122,2176
<(C3-C1-H4)	118,7142
<(C2-C1-H4)	119,0679
Parámetro	Ángulo Diedro (grados)
D(C9-O13-C15-C17)	-154,1289
D(C7-C9-O13-C15)	-159,8231
D(C3-C7-C9-O13)	-179,4771
D(C2-C1-C3-C7)	179,9952
D(H4-C1-C3-C7)	-0,1923

Tabla 4.1.1.14: Comparación de los parámetros termoquímicos obtenidos con el nivel de teoría B3LYP/6-31G (d,p) para los fragmentos $[181]^+$ y $[208+32]^+$ de la Cipermetrina

Parámetro	$[181]^+$	$[208+32]^+$
Energía (kcal/mol)	-361263,7452	-492534,8421
RMS	1,04E-04	2,54E-06
Momento Dipolar	1,1163	0,3354
Energía Vibracional del Punto Zero (kcal/mol)	111,412	157,90385
Corrección del Punto Zero (Hartree/partícula)	0,177546	0,251636
Corrección térmica de la Energía	0,187795	0,269721
Corrección térmica de la Entalpía	0,188739	0,270665
Corrección térmica de la Energía Libre de Gibbs	0,140741	0,201369
Suma de las Energías electrónica y del Punto Zero	-575,5328	-784,6526
Suma de las Energías electrónica y térmica	-575,5226	-784,6345
Suma de las Entalpías electrónica y térmica	-575,5216	-784,6336
Suma de la Energía electrónica y Energía libre térmica	-575,5696	-784,7029

En la Tabla 4.1.1.12 están dados los parámetros geométricos de la estructura optimizada del fragmento $[181]^+$, que se muestra en la Figura 4.1.1.6. En la Tabla 4.1.1.13 se muestran a su vez los parámetros optimizados del ion $[240]^+$, que correspondería a un aducto del fragmento iónico de $m/z=208$ con una molécula del solvente MeOH de PM 32.

La estructura optimizada propuesta se muestra en la Figura 4.1.1.7. En esta estructura, de igual manera que con el aducto $[448]^+$, se muestra la interacción del O27 (del MeOH) con dos H de la estructura, en este caso del fragmento $[208]^+$, el H4 y H11. Estos dos H ocupan las mismas posiciones que los H35 y H38 de la estructura optimizada del ión $[M+H+32]^+$ que se muestra en la Figura 4.1.1.5.

Probablemente la presencia del MeOH da estabilidad suficiente a este fragmento, para permitir su detección en el espectrómetro de masas, y con una abundancia bastante importante. En condiciones de ausencia de MeOH se observa que el fragmento 208 pierde el grupo ciano dando lugar a la formación de un ión tipo tropilio más estable.

En la Tabla 4.1.1.14 se muestran los parámetros termoquímicos obtenidos en los cálculos al nivel de teoría B3LYP/6-31G (d,p) para los dos fragmentos considerados: [181]⁺ y [240]⁺.

4.1.2 Permetrina

4.1.2.1 Geometría optimizada de la molécula neutra

Se realizó el análisis computacional de la molécula neutra con los 4 funcionales híbridos y con el conjunto de bases 6-31 G(d,p). Se presentan en las tablas los valores de los datos geométricos que han sido obtenidos. La Figura 4.1.2.1 corresponde la estructura optimizada con el funcional B3LYP, en la cual se detallan el orden de los átomos a los cuales se hace referencia en las tablas.

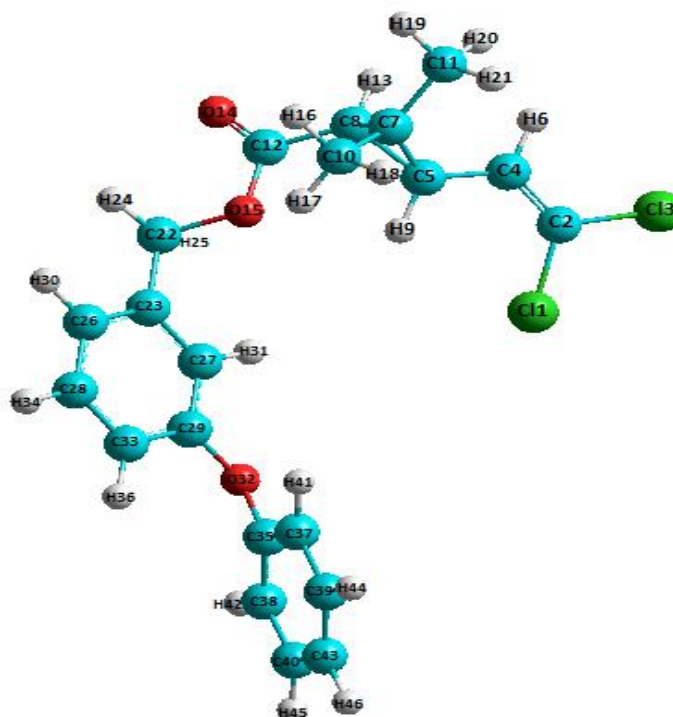


Figura 4.1.2.1: Geometría optimizada de la Permetrina al nivel de teoría B3LYP/6-31G (d,p)

Estructuralmente, la Permetrina es semejante a la Cipermetrina, excepto por la ausencia del grupo ciano en posición a la estructura aromática. En la Tabla 4.1.2.1 se muestran los valores de longitudes de enlace de la estructura optimizada, con los diferentes funcionales utilizados. Para esta molécula no se cuentan con datos experimentales de difracción de Rayos X para realizar las respectivas comparaciones.

En las Tablas 4.1.2.2 y 4.1.2.3 se encuentran resumidos los valores de los ángulos de enlace y ángulos diedros optimizados con los diferentes funcionales que han sido utilizados.

Tabla 4.1.2.1: Comparación de las longitudes de enlace obtenidas con los distintos niveles de teoría y el conjunto de bases 6-31 G (d,p)

Parámetro	B3LYP	B3PW91	B98	B972
	Longitud de Enlace (Å)			
r(C11-C2)	1,7482	1,7363	1,7509	1,7323
r(C2-C13)	1,7454	1,7333	1,7483	1,7293
r(C2-C4)	1,3369	1,3369	1,3390	1,3364
r(C4-C5)	1,4743	1,4701	1,4767	1,4703
r(C5-C7)	1,5196	1,5157	1,5258	1,5133
r(C5-C8)	1,5346	1,5277	1,5438	1,5247
r(C7-C8)	1,5286	1,5238	1,5368	1,5211
r(C8-C12)	1,4908	1,4872	1,494	1,4881
r(C12-O14)	1,2141	1,2124	1,213	1,2104
r(C12-O15)	1,3556	1,3507	1,3532	1,3487
r(O15-C22)	1,4515	1,4429	1,44437	1,4412
r(C22-C23)	1,5051	1,5021	1,5101	1,5024
r(C29-O32)	1,3789	1,3735	1,3763	1,3727
r(O32-C35)	1,3840	1,3776	1,3803	1,3768

Tabla 4.1.2.2: Comparación de los ángulos de enlace obtenidos con los distintos niveles de teoría y el conjunto de bases 6-31 G (d,p)

Parámetro	B3LYP	B3PW91	B98	B972
	Ángulo de enlace (grados)			
<(C11-C2-C4)	121,885	121,8534	121,9131	121,7853
<(C13-C2-C4)	124,1248	124,0416	124,1439	124,1067
<(C2-C4-C5)	125,9458	125,8327	125,66349	125,861
<(C4-C5-C7)	123,1398	123,0553	123,2369	123,295
<(C4-C5-C8)	119,6637	119,6327	119,7071	119,7813
<(C5-C8-C12)	122,2759	122,4101	122,0147	122,5359
<(C5-C7-C10)	117,4901	117,3771	117,4051	117,4105
<(C5-C7-C11)	119,8444	119,849	119,8626	119,9775
<(C8-C12-O14)	123,3251	123,3343	123,4062	123,242
<(C8-C12-O15)	113,4871	113,4776	113,3264	113,4097
<(O14-C12-O15)	123,1867	123,1873	123,2658	123,3471
<(C12-O15-C22)	115,4211	115,1071	115,5954	115,5068
<(O15-C22-O23)	108,3094	108,4685	108,5265	108,3999
<(C29-O32-C35)	120,8505	120,5643	120,7580	120,5999

Tabla 4.1.2.3: Comparación de los ángulos diedros (en grados) obtenidos con los distintos niveles de teoría y el conjunto de bases 6-31 G (d,p)

Parámetro	B3LYP	B3PW91	B98	B972
	Ángulo Diedro (grados)			
D(C11-C2-C4-C5)	179,8651	179,8703	179,9669	179,8272
D(C13-C2-C4-C5)	-0,0851	-0,0842	0,043	-0,0883
D(C2-C4-C5-C7)	143,608	142,6787	146,6822	143,2722
D(C2-C4-C5-C8)	-144,6964	-145,6398	-141,5357	-144,8747
D(C4-C5-C8-C12)	131,3633	131,7824	131,38	131,3686
D(C5-C8-C12-O14)	-157,0484	-158,4083	-157,7267	-158,8012
D(C5-C8-C12-O15)	22,5868	21,2956	21,822	20,7982
D(C8-C12-O15-C22)	-179,8251	179,8031	-179,2768	-179,8705
D(C12-O15-C22-C23)	177,3222	176,9081	173,8669	176,679
D(C27-C29-O32-C35)	149,854	146,8425	147,1374	145,9333

Realizando una comparación entre los parámetros geométricos obtenidos, no se observan diferencias muy notorias entre los parámetros obtenidos con los distintos funcionales. Por otro lado, comparando estos datos con los obtenidos para la geometría optimizada de la Cipermetrina, tampoco se observan diferencias muy notorias, que es lo esperado por la semejanza estructural entre las dos estructuras.

Tabla 4.1.2.4: Comparación de los parámetros termoquímicos obtenidos con los distintos niveles de teoría y el conjunto de bases 6-31 G (d,p)

Parámetro	B3LYP	B3PW91	B98	B972
Energía (kcal/mol)	-1228872,191	-1228560,627	-1228539,775	-1228676,088
RMS	2,17E-06	2,39E-06	3,39E-06	2,19E-06
Momento Dipolar	3,3516	3,2781	3,208	3,2849
Energía Vibracional del Punto Zero (kcal/mol)	226,8824	227,53582	226,14422	228,84078
Corrección del Punto Zero (Hartree/partícula)	0,361565	0,362601	0,360862	0,364681
Corrección térmica de la Energía	0,386576	0,387566	0,385926	0,38955
Corrección térmica de la Entalpía	0,38752	0,388511	0,38687	0,390495
Corrección térmica de la Energía Libre de Gibbs	0,299533	0,30098	0,299571	0,302808
Suma de las Energías electrónica y del Punto Zero	-1957,97085	-1957,4733	-1957,44181	-1957,65522
Suma de las Energías electrónica y térmica	-1957,94584	-1957,44838	-1957,41675	-1957,63035
Suma de las Entalpías electrónica y térmica	-1957,94489	-1957,44739	-1957,4158	-1957,62941
Suma de la Energía electrónica y Energía libre térmica	-1958,03288	-1957,53492	-1957,5031	-1957,74095

En la Tabla 4.1.2.4 se exponen los valores de los parámetros termoquímicos que han sido obtenidos. Como puede verse con el funcional B3LYP se ha obtenido el mínimo valor de energía electrónica en la geometría optimizada.

4.1.2.2 Formas iónicas protonada y desprotonada

De los datos experimentales que se han obtenido durante el trabajo no se han observado la formación de estas formas iónicas. Debido al costo computacional, aun no se tienen datos de los cálculos teóricos.

4.1.2.3 Formación de aductos

Experimentalmente se ha observado que se forman los iones aductos con los iones Na^+ y NH_4^+ . En presencia de ACN como fase móvil, los dos aductos se forman con una baja intensidad. Realizando la corrida cromatográfica con MeOH, el aducto $[\text{M}+\text{Na}]^+$, se incrementa de manera bastante interesante en cuanto a abundancia. Esto es discutido en la sección 4.2 donde se trata la revisión de los datos experimentales.

4.1.2.4 Fragmentos de la Permetrina.

Se ha observado que el fragmento que mayoritariamente se forma en las condiciones experimentales es el que corresponde a la relación $m/z=183$. Este fragmento correspondería al ión del tipo fenoxi tropilium, según el mecanismo que ha sido propuesto por (Fleet et al., 1993).

Se observa una gran importancia en cuanto a intensidad iónica de este ión con respecto a las otras especies que también se forman y que han sido identificados en el espectrómetro de masas, los aductos $[\text{M}+\text{Na}]^+$ y $[\text{M}+\text{NH}_4]^+$, de $m/z=413$ y $m/z=408$, respectivamente. Esto es así en todas las condiciones experimentales que se estudiaron, obteniéndose un pico de mayor abundancia al proporcionar al sistema una energía de impacto electrónico de 150 eV. Esta energía es menor a la observada para la fragmentación de la Cipermetrina, por lo que se esperaría obtener de los cálculos teóricos, una mayor estabilidad de las formas iónicas de la Cipermetrina, que de la Permetrina.

4.1.3 Tetrametrina

4.1.3.1 Geometría Optimizada de la molécula neutra

El estudio teórico de la Tetrametrina se realizó considerando la estructura neutra y las posibles formas iónicas que pudieran ser detectadas en el espectrómetro de masas. Los cálculos teóricos de la forma neutra de la molécula se realizaron con los cuatro funcionales: B3LYP, B3PW91, B98 y B97-2, todos ellos con el conjunto de bases 6-31 G (d,p).

En la Figura 4.1.3.1 se expone la geometría optimizada resultante con el funcional B3LYP. En la Figura también está especificada la numeración de los átomos a los cuales se hace referencia en las siguientes tablas. Estructuralmente la Tetrametrina es bastante similar a las estructuras ya mencionadas anteriormente. Proviene de la esterificación del ácido crisantémico con el alcohol 3,4,5,6-tetrahidroftalimidometil, resultando en este último residuo, el del alcohol, la principal diferencia estructural.

En la Tabla 4.1.3.1 se muestran las longitudes de enlace que han sido entresacadas como las más importantes.

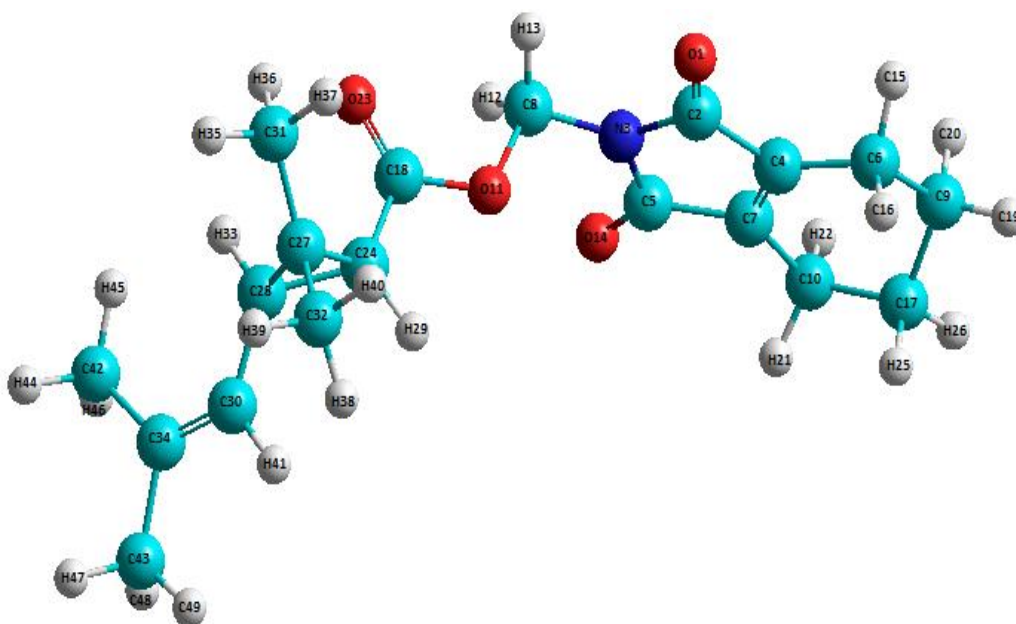


Figura 4.1.3.1: Geometría optimizada de la Tetrametrina al nivel de teoría B3LYP/6-31G (d,p)

Tabla 4.1.3.1: Comparación de las longitudes de enlace obtenidas con los distintos niveles de teoría y el conjunto de bases 6-31 G (d,p)

Parámetro	B3LYP	B3PW91	B98	B972
	Longitud de Enlace (Å)			
r(O1=C2)	1,2129	1,2110	1,2114	1,2091
r(C2-N3)	1,4089	1,4041	1,4093	1,4029
r(C2-C4)	1,4968	1,4935	1,5110	1,4931
r(N3-C5)	1,4089	1,4041	1,4093	1,4030
r(C5-C7)	1,4970	1,4937	1,5011	1,4934
r(C4-C7)	1,3442	1,3434	1,3457	1,3422
r(C7-C10)	1,4945	1,4895	1,4976	1,4895
r(C4-C6)	1,4942	1,4891	1,4973	1,4892
r(C6-C9)	1,5425	1,5365	1,5456	1,5358
r(C17-C9)	1,5408	1,5353	1,5442	1,5345
r(C17-C10)	1,5424	1,5364	1,5455	1,5357
r(N3-C8)	1,4263	1,4219	1,4277	1,4217
r(C8-O11)	1,4444	1,4369	1,4404	1,4354
r(O11-C18)	1,3584	1,3531	1,3554	1,3520
r(C18=O23)	1,2179	1,2161	1,2170	1,2138
r(C18-C24)	1,4820	1,4787	1,4856	1,4799
r(C24-C27)	1,5335	1,5283	1,5423	1,5255
r(C24-C28)	1,5373	1,5307	1,5461	1,5266
r(C27-C28)	1,5132	1,5092	1,5200	1,5077
r(C28-C30)	1,4803	1,4761	1,4831	1,4769
r(C30=C34)	1,3443	1,3438	1,3465	1,3431
r(C34-C42)	1,5093	1,5048	1,5128	1,5048
r(C34-C43)	1,5082	1,5034	1,5115	1,5034

Realizando una comparación de los valores obtenidos con cada funcional utilizado para los cálculos puede verse que no se presentan diferencias muy significativas. Para esta molécula, tampoco se dispone de datos de difracción de Rayos X de la estructura cristalina, que permita contrastar los valores experimentales con los obtenidos computacionalmente.

Considerando la región de la molécula correspondiente a la de la unión éster y la del ácido crisantémico, y comparando los valores de longitudes de enlace con los obtenidos para la Cipermetrina y la Permetrina, en esta misma región, y que se vieron anteriormente, tampoco hay diferencias muy marcadas. Esto hace suponer un comportamiento similar en cuanto a las formas iónicas que se podrían presentar, como a los fragmentos que pueden darse en la fuente de ionización del espectrómetro de masas.

En las Tablas 4.1.3.2 y 4.1.3.3 se muestran los datos de ángulos de enlace y ángulos diedros de las estructuras optimizadas con los cuatro funcionales que han sido utilizados. Como puede verse, los resultados obtenidos para estos datos de la geometría de la molécula son bastante similares.

Tabla 4.1.3.2: Comparación de los ángulos de enlace obtenidos con los distintos niveles de teoría y el conjunto de bases 6-31 G (d,p)

Parámetro	B3LYP	B3PW91	B98	B972
	Ángulo de enlace (grados)			
<(N3-C8-O11)	108,1819	108,2402	108,1365	108,1993
<(C8-O11-C18)	114,7212	114,4578	114,6394	114,7292
<(O11-C18-O23)	122,4815	122,504	122,5369	122,609
<(O11-C18-O24)	110,8747	110,8898	110,8495	110,7303
<(O23-C18-C24)	126,6426	126,6048	126,6127	126,6595
<(C18-C24-C27)	122,4274	122,2618	122,2734	122,4648
<(C18-C24-C28)	118,1608	118,0034	117,9937	118,3432
<(C24-C27-C31)	119,9344	119,8842	119,9065	120,0199
<(C24-C27-C32)	115,8456	115,8139	115,7754	115,8868
<(C24-C28-C30)	120,0486	120,039	119,9164	120,0448
<(C28-C30-C34)	127,2249	127,1894	127,1054	127,2634
<(C30-C34-C42)	120,5259	120,4906	120,4998	120,4815
<(C30-C34-C43)	124,9773	124,9322	125,0164	125,0033

Tabla 4.1.3.3: Comparación de los ángulos diedros (en grados) obtenidos con los distintos niveles de teoría y el conjunto de bases 6-31 G (d,p)

Parámetro	B3LYP	B3PW91	B98	B972
	Ángulo Diedro (grados)			
D(N3-C8-O11-C18)	-176,5811	-175,7906	-177,0916	-176,7376
D(C8-O11-C18-O23)	-0,3148	-0,3348	-0,3734	-0,2428
D(O11-C18-C24-C28)	-152,922	-153,4681	-153,2913	-153,9624
D(O11-C18-C24-C27)	137,6361	137,1202	137,4941	136,2973
D(C8-O11-C18-C24)	179,2932	179,265	179,315	179,364
D(C18-C24-C28-C30)	132,5906	132,7563	132,8301	132,5037
D(C24-C28-C30-C34)	-143,0637	-142,9161	-143,1119	-145,5022
D(C28-C30-C34-C42)	179,7098	179,7318	179,6922	179,5127
D(C28-C30-C34-C43)	-0,2659	0,2113	-0,2498	-0,4871
D(C18-C24-C27-C31)	-1,4363	-1,4132	-1,609	-0,9993
D(C18-C24-C27-C32)	-143,0292	-1143,1534	-143,2035	-142,7562

En la Tabla 4.1.3.4 se muestran los parámetros termoquímicos que han sido calculados con los cuatro funcionales utilizados sobre la molécula en su forma neutra.

Tabla 4.1.3.4: Comparación de los parámetros termoquímicos obtenidos con los distintos niveles de teoría y el conjunto de bases 6-31 G (d,p)

Parámetro	B3LYP	B3PW91	B98	B972
Energía (kcal/mol)	-686981,4619	-686728,2743	-686711,7018	-686746,6353
RMS	3,47E-06	2,22E-06	5,56E-05	3,98E-06
Momento Dipolar	3,6902	3,7002	3,7109	3,7106
Energía Vibracional del Punto Zero (kcal/mol)	259,18814	259,78922	258,70801	261,38513
Corrección del Punto Zero (Hartree/partícula)	0,413043	0,414	0,412277	0,416544
Corrección térmica de la Energía	0,437842	0,438808	0,437169	0,441226
Corrección térmica de la Entalpía	0,8786	0,439752	0,438113	0,44217
Corrección térmica de la Energía Libre de Gibbs	0,355104	0,356041	0,354291	0,358633
Suma de las Energías electrónica y del Punto Zero	-1094,36156	-1093,95612	-1093,93243	-1093,98384
Suma de las Energías electrónica y térmica	-1094,33676	-1093,93231	-1093,90754	-1093,95916
Suma de las Entalpías electrónica y térmica	-1094,33582	-1093,1366	-1093,9066	-1093,95821
Suma de la Energía electrónica y Energía libre térmica	-1094,4195	-1094,01508	-1093,99042	-1094,04175

4.1.3.2 Formas Iónicas protonada y desprotonada

Se realizaron además los cálculos teóricos de las formas iónicas $[M+H]^+$ y $[M]^{+}$ de la Tetrametrina. Estos cálculos se realizaron con el funcional B3LYP y el conjunto de bases 6-31G (d,p). En la Figura 4.1.3.2 se muestra la geometría optimizada de la forma iónica protonada de relación $m/z=332$ en el espectro de masas.

Al igual que con las demás estructuras, en la forma protonada de la Tetrametrina se considera la interacción del ión H^+ del medio con el Oxígeno carbonílico que forma parte del enlace éster de la molécula. En este modelo teórico se aprecia una fuerte interacción resultante en la formación de un enlace tipo covalente por la proximidad entre el O23 y el H^+ .

La distancia de enlace correspondiente a esta interacción, según el cálculo realizado es de 0,9698 Å. El ion $[M+H]^+$ es detectado con una intensidad bastante interesante, en el espectrómetro de masas en todas las condiciones experimentales estudiadas, a bajas energías de impacto electrónico. En todos los casos la abundancia de este ión es máxima con una energía de IE de 90 eV.

El ión molecular $[M]^+$, como ya se mencionó anteriormente no es detectado en condiciones de ionización a presión atmosférica como son las fuentes ESI Y APCI, sin embargo, también fueron realizados los cálculos teóricos para esta estructura con fines comparativos.

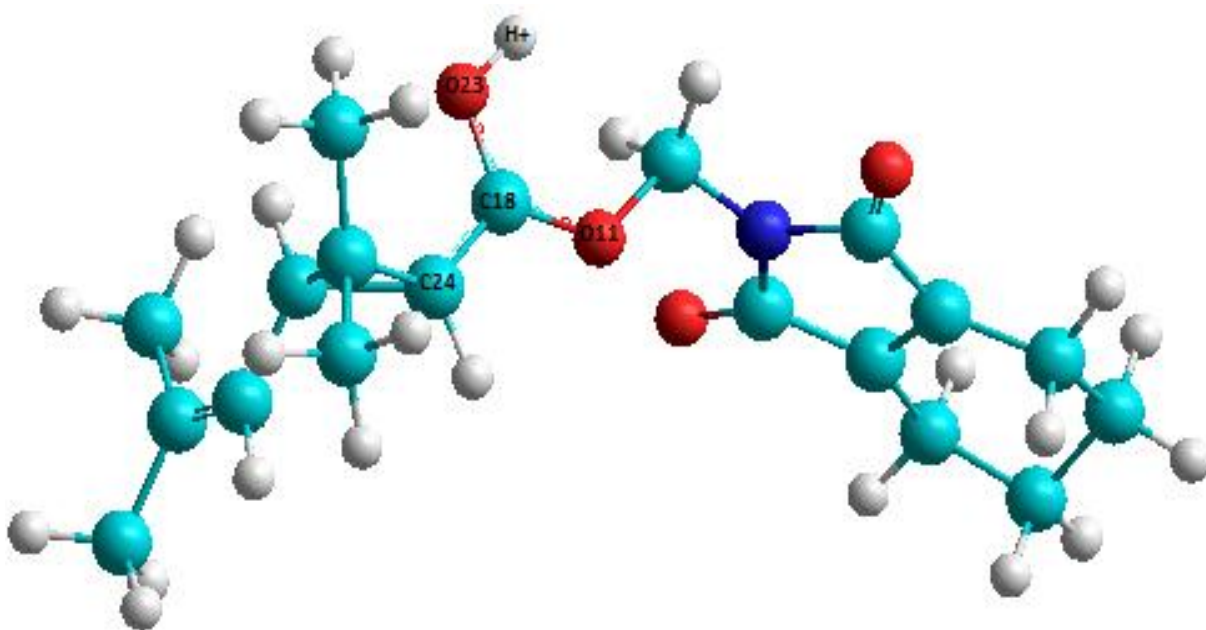


Figura 4.1.3.2: Geometría optimizada de la forma iónica protonada $[M+H]^+$, al nivel de teoría B3LYP/6-31G (d,p)

En la Tabla 4.1.3.5 se muestran de manera contrastada los valores de los datos geométricos para las formas iónicas: $[M+H]^+$ y $[M]^+$, esto es los datos de longitudes de enlace, ángulos de enlace y ángulos diedros más importantes de las correspondientes estructuras geométricas.

Tabla 4.1.3.5: Parámetros geométricos optimizados para las formas iónicas $[M]^+$ y $[M+H]^+$ de la Tetrametrina con el nivel de teoría B3LYP / 6-31 G(d,p)

Parámetro	$[M]^+$	$[M+H]^+$	Parámetro	$[M]^+$	$[M+H]^+$
	Longitud de Enlace (Å)			Ángulo de enlace (grados)	
r(O1=C2)	1,2110	1,2271	<(N3-C8-O11)	108,4162	108,2717
r(C2-N3)	1,4176	1,4370	<(C8-O11-C18)	115,6174	122,3287
r(C2-C4)	1,4930	1,4388	<(O11-C18-O23)	126,5508	122,0042
r(N3-C5)	1,4168	1,4373	<(O11-C18-C24)	109,8705	117,805
r(C5-C7)	1,4928	1,4387	<(O23-C18-C24)	123,5777	120,1642
r(C4-C7)	1,3479	1,5048	<(C18-C24-C27)	119,245	126,7837
r(C7-C10)	1,4946	1,4751	<(C18-C24-C28)	113,7374	119,2471
r(C4-C6)	1,4942	1,4755	<(C24-C27-C31)	122,6059	119,6133
r(C6-C9)	1,54525	1,5471	<(C24-C27-C32)	119,0378	112,8898
r(C17-C9)	1,5399	1,5377	<(C24-C28-C30)	124,2241	117,6193
r(C17-C10)	1,5426	1,5475	<(C28-C30-C34)	125,4915	125,8313
r(N3-C8)	1,4055	1,3904	<(C30-C34-C42)	119,4705	120,0492
r(C8-O11)	1,4840	1,5109	<(C30-C34-C43)	124,0453	125,2013
r(O11-C18)	1,3258	1,2974	Parámetro	Ángulo Diedro °(grados)	
r(C18=O23)	1,2129	1,3188	D(N3-C8-O11-C18)	174,0041	-173,3492
r(C18-C24)	1,5271	1,4180	D(C8-O11-C18-O23)	0,7977	-5,7124
r(C24-C27)	1,4823	1,5629	D(O11-C18-C24-C28)	-152,8008	-143,8093
r(C24-C28)	1,5112	1,6187	D(O11-C18-C24-C27)	120,1236	149,2846
r(C27-C28)	1,8486	1,4818	D(C8-O11-C18-C24)	-178,847	172,4119
r(C28-C30)	1,4056	1,4703	D(C18-C24-C28-C30)	114,807	126,2201
r(C30=C34)	1,3937	1,3499	D(C24-C28-C30-C34)	-170,2375	-122,8551
r(C34-C42)	1,4944	1,5060	D(C28-C30-C34-C42)	176,5078	-177,209
r(C34-C43)	1,4943	1,5055	D(C28-C30-C34-C43)	-2,1931	2,266
r(H+O23 O carbonilo)	----- -	0,9698	D(C18-C24-C27-C31)	17,8488	-6,7053
			D(C18-C24-C27-C32)	-147,5181	-143,2477

A diferencia de lo que ocurría con la Cipermetrina, aquí se nota una influencia más marcada de la presencia de la unión con el H⁺ en los parámetros geométricos. Por ejemplo en la unión C8 – O11 que es en donde se da la escisión del enlace para la formación del principal fragmento detectado, hay un ligero alargamiento del enlace que de 1,484 Å en el ión $[M]^+$, pasa a tener 1,511 Å en la forma iónica protonada $[M+H]^+$, también se observa un alargamiento del enlace carbonílico (C18 – O23) que en el ión $[M]^+$ presenta una longitud de 1,213 Å mientras que en el ión protonado la longitud de enlace es de 1,319 Å.

4.1.3.3 Formación de Aductos

En el espectrómetro de masas han sido detectados los aductos de la molécula de Tetrametrina con los iones Na^+ y NH_4^+ , además del dímero $2\text{M} + \text{Na}^+$. Los aductos formados con el Na^+ , fueron especialmente importantes, ya que se observó la formación tanto del $[\text{M}+\text{Na}]^+$ como del dímero $[2\text{M}+\text{Na}]^+$, en todas las condiciones experimentales estudiadas, y aún a 350°C , y en abundancia predominante para el caso del ión $[\text{M}+\text{Na}]^+$, con respecto a los demás iones. Esto hace suponer una alta estabilidad de estas formas iónicas. El aducto con el ion amonio también pudo ser detectado pero en menor abundancia y a bajas energías de IE.

El estudio computacional se realizó para las formas iónicas $[\text{M}+\text{Na}]^+$ y $[\text{M}+\text{NH}_4]^+$, que corresponden a una relación $m/z = 354$ y $m/z=349$ respectivamente. En las Figuras 4.1.3.3 y 4.1.3.4 se muestran las estructuras optimizadas obtenidas con el funcional B3LYP con el conjunto de bases 6-31 G (d,p).

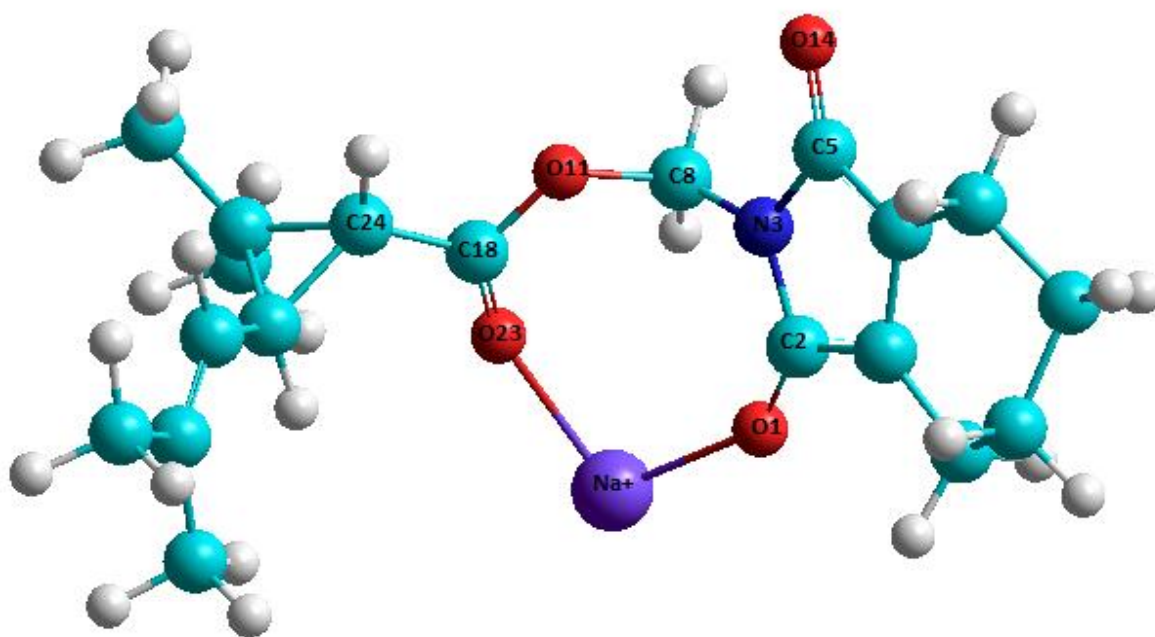


Figura 4.1.3.3: Estructura optimizada de $[\text{M}+\text{Na}]^+$ al nivel de teoría B3LYP/6-31G (d,p)

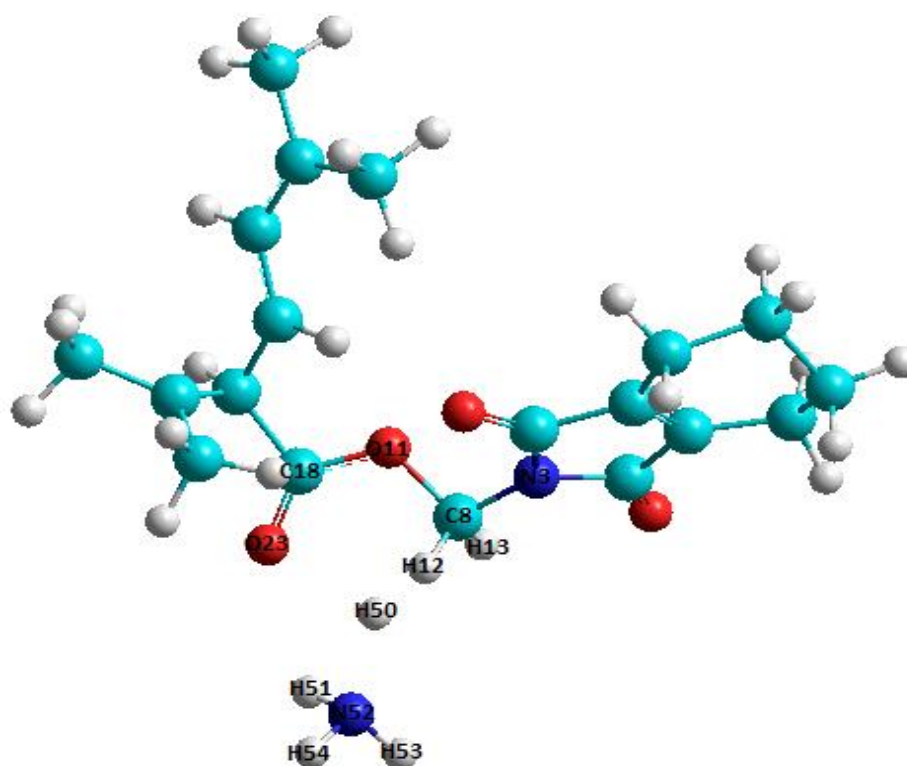


Figura 4.1.3.4: Estructura optimizada de $[M+NH_4]^+$ al nivel de teoría B3LYP/6-31G (d,p)

En la Tabla 4.1.3.6 se muestran los valores de los datos geométricos para estas dos estructuras propuestas con el modelado computacional. Para el caso del aducto con sodio, se observa una fuerte interacción del ión Na^+ con dos Oxígenos de la estructura de la Tetrametrina, uno de ellos, el oxígeno carbonílico (O23) del ácido crisantémico y el otro, uno de los oxígenos carbonílicos de la estructura del indol en el residuo correspondiente al alcohol (O1). Por la distancia de enlace que se presenta (2,170 Å y 2,147 Å), hace suponer que no se trata de un enlace covalente, sino de una fuerte interacción tipo ión – dipolo, entre el sodio y los dos oxígenos.

En el caso del aducto con el ión NH_4^+ , dos de los H del amonio interactúan con el Oxígeno carbonílico del enlace éster de la Tetrametrina, Si embargo, esta unión es más débil de la que se observa para con el sodio.

En cuanto a los datos geométricos de las estructuras optimizadas, se observan ciertas diferencias sobre todo en la región correspondiente al anillo indólico del residuo de alcohol. Para el resto de la molécula las diferencias no son muy importantes.

Tabla 4.1.3.6: Parámetros geométricos optimizados de los aductos formados con la Tetrametrina, con el nivel de teoría B3LYP 6-31 G (d,p)

Parámetro	[M+Na] ⁺	[M+NH ₄] ⁺	Parámetro	[M+Na] ⁺	[M+NH ₄] ⁺
	Longitud de Enlace (Å)			Ángulo de enlace (grados)	
r(O1=C2)	1,2508	1,2220	<(N3-C8-O11)	111,8445	106,7899
r(C2-N3)	1,4016	1,4011	<(C8-O11-C18)	120,2455	117,059
r(C2-C4)	1,4349	1,4943	<(O11-C18-O23)	122,7081	126,6608
r(N3-C5)	1,4489	1,4207	<(O11-C18-O24)	110,8955	111,0389
r(C5-C7)	1,4377	1,4942	<(O23-C18-C24)	126,3964	122,2833
r(C4-C7)	1,4923	1,3463	<(C18-C24-C27)	123,4243	116,531
r(C7-C10)	1,4758	1,4936	<(C18-C24-C28)	119,797	116,2725
r(C4-C6)	1,476	1,4948	<(C24-C27-C31)	119,9797	121,0315
r(C6-C9)	1,5472	1,5430	<(C24-C27-C32)	115,0311	120,1404
r(C17-C9)	1,5379	1,5402	<(C24-C28-C30)	118,985	124,1501
r(C17-C10)	1,5466	1,5425	<(C28-C30-C34)	126,9532	125,1045
r(N3-C8)	1,4351	1,4264	<(C30-C34-C42)	120,3917	119,4891
r(C8-O11)	1,4435	1,4609	<(C30-C34-C43)	125,087	124,1603
r(O11-C18)	1,3495	1,3340	Parámetro	Ángulo Diedro (grados)	
r(C18=O23)	1,2349	1,2087	D(N3-C8-O11-C18)	-104,2394	-148,6566
r(C18-C24)	1,4631	1,5299	D(C8-O11-C18-O23)	3,2617	-20,4428
r(C24-C27)	1,5469	1,4779	D(O11-C18-C24-C28)	-153,9067	-31,0178
r(C24-C28)	1,5493	1,5062	D(O11-C18-C24-C27)	136,6022	-121,6865
r(C27-C28)	1,505	1,9011	D(C8-O11-C18-C24)	-176,7555	158,0768
r(C28-C30)	1,4798	1,4043	D(C18-C24-C28-C30)	131,3437	147,225
r(C30=C34)	1,3464	1,3913	D(C24-C28-C30-C34)	-145,4381	-174,575
r(C34-C42)	1,508	1,4954	D(C28-C30-C34-C42)	-179,5568	177,4857
r(C34-C43)	1,5075	1,4960	D(C28-C30-C34-C43)	-0,2978	-2,282
r(Na-O23)	2,1702		D(C18-C24-C27-C31)	-0,6962	22,6784
r(Na-O1)	2,1471		D(C18-C24-C27-C32)	-141,117	-144,6665
r(N52-H50)		2,1225			
r(N52-H51)		1,0167			
r(N52-H53)		1,0171			
r(N52-H54)		1,0157			
r(O23-H50)		3,4945			
r(O23-H51)		2,4332			

Tabla 4.1.3.7: Parámetros termoquímicos obtenidos con el nivel de teoría B3LYP / 6-31 G (d,p) para cada una de las formas iónicas de la Tetrametrina.

Parámetro	[M] ⁺	[M+H] ⁺	[M+Na] ⁺	[M+NH ₄] ⁺
Energía (kcal/mol)	-686814,7263	-687146,6788	-788696,4722	-722625,2169
RMS	4,41E-06	3,86E-06	2,94E-06	7,14E-06
Momento Dipolar	14,6947	2,03029	7,8611	9,8755
Energía Vibracional del Punto Zero (kcal/mol)	257,59677	264,02927	257,87819	281,81277
Corrección del Punto Zero (Hartree/partícula)	0,410507	0,420757	0,410955	0,449097
Corrección térmica de la Energía	0,436204	0,446421	0,437649	0,480028
Corrección térmica de la Entalpía	0,437148	0,447365	0,438594	0,480972
Corrección térmica de la Energía Libre de Gibbs	0,350224	0,361624	0,350632	0,383519
Suma de las Energías electrónica y del Punto Zero	-1094,09838	-1094,61713	-1256,456825	-1151,127544
Suma de las Energías electrónica y térmica	-1094,07268	-1094,59146	-1256,430131	-1151,096509
Suma de las Entalpías electrónica y térmica	-1094,07174	-1094,59052	-1256,429187	-1151,095565
Suma de la Energía electrónica y Energía libre térmica	-1094,15866	-1094,67626	-1256,517148	-1151,193017

En la Tabla 4.1.3.7 se muestran los datos termoquímicos obtenidos para las distintas estructuras iónicas consideradas en este estudio.

4.1.3.4 Fragmentos de la Tetrametrina

El principal fragmento que ha sido identificado durante el estudio por espectrometría de masas de la Tetrametrina fue el correspondiente al valor de $m/z=164$ en el espectro. El ión probablemente corresponda al resultante de la fragmentación de la molécula Tetrametrina en el punto de unión del O11 – C8, liberándose el ácido crisantémico como molécula neutra.

La estructura optimizada se muestra en la Figura 4.1.3.5, en donde se especifica el orden de los átomos, y los datos de la geometría y termoquímica que han sido obtenidos con el cálculo computacional se muestran en la Tabla 4.1.3.8.

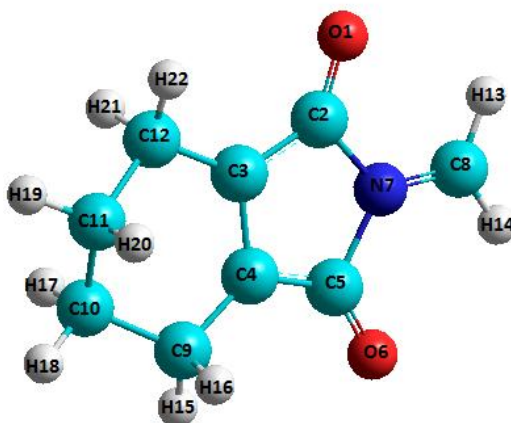


Figura 4.1.3.5: Estructura optimizada del ion $[164]^+$ con el nivel de teoría B3LYP / 6-31G (d,p)

Tabla 4.1.3.8: Parámetros geométrico y termoquímicos obtenidos con el nivel de teoría B3LYP/6-31G (d,p) para el fragmento $[164]^+$

Parámetro	Longitud de Enlace (Å)	Parámetro	
r(O1=C2)	1,2185	Energía (kcal/mol)	-347540,4775
r(C2-C3)	1,4183	RMS	1,52E-05
r(C2-N7)	1,5172	Momento Dipolar	1,3173
r(N7=C8)	1,2777	Energía Vibracional del Punto Zero (kcal/mol)	109,14659
r(N7-C5)	1,5174	Corrección del Punto Zero (Hartree/partícula)	0,173936
r(C5=O6)	1,2185	Corrección térmica de la Energía	0,184456
r(C4-C5)	1,4183	Corrección térmica de la Entalpía	0,1854
r(C3-C4)	1,5085	Corrección térmica de la Energía Libre de Gibbs	0,137029
r(C3-C12)	1,4731	Suma de las Energías electrónica y del Punto Zero	-553,667046
r(C11-C12)	1,5476	Suma de las Energías electrónica y térmica	-553,656526
r(C10-C11)	1,5353	Suma de las Entalpías electrónica y térmica	-553,655581
r(C9-C10)	1,5475	Suma de la Energía electrónica y Energía libre térmica	-553,703953
r(C4-C9)	1,4732		
Parámetro	Ángulo de enlace (grados)		
<(O1-C2-N7)	120,9148		
<(O6-C5-N7)	120,9073		
<(C2-N7-C8)	124,8693		
<(C5-N7-C8)	124,8634		

4.1.4 Fenotrina

4.1.4.1 Geometría optimizada de la molécula neutra

La molécula de Fenotrina fue estudiada a través de cálculos computacionales, abarcándose en este estudio la estructura neutra de la molécula, como también, las formas iónicas que fueron detectados en el espectrómetro de masas. El estudio de la molécula neutra se realizó con los funcionales híbridos B3LYP, B3PW91, B98 y B97-2, todos con el conjunto de bases 6-31G (d,p).

La Fenotrina, al igual que otros miembros de la familia de los piretroides, resulta de la esterificación de un resto del ácido crisantémico con una molécula de un alcohol aromático, en este caso el alcohol 3-fenoxibencil. En la Figura 4.1.4.1 se muestra la estructura optimizada de la Fenotrina con el nivel de teoría B3LYP/6-31G (d,p), y en la misma también están especificados el orden de los átomos a los cuales se hace referencia en la presentación de los resultados en las tablas.

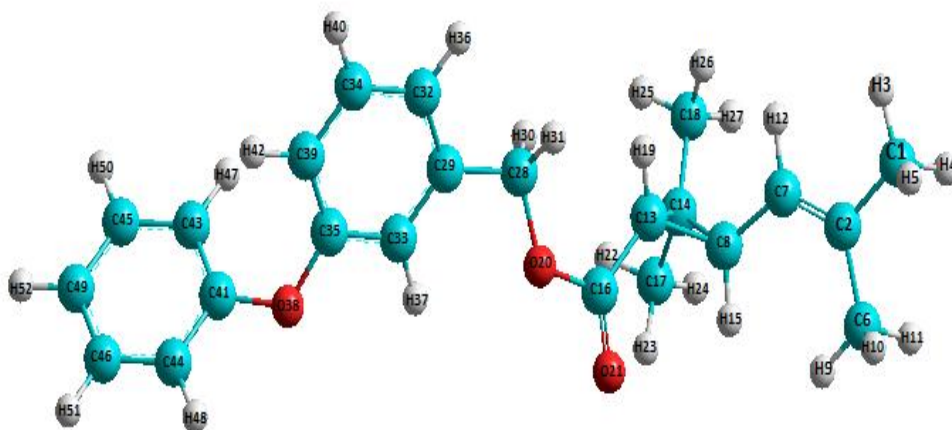


Figura 6.1.4.1: Geometría optimizada de la Fenotrina al nivel de teoría B3LYP/6-31G (d,p)

En la Tabla 4.1.4.1 están contrastados los valores de longitudes de enlace para la forma neutra de la Fenotrina, y que se obtuvieron con los cuatro funcionales híbridos mencionados. Para esta molécula, tampoco se disponen de datos de la literatura sobre los parámetros geométricos experimentales, para realizar comparaciones con los datos obtenidos computacionalmente.

Tabla 4.1.4.1: Comparación de las longitudes de enlace obtenidas con los distintos niveles de teoría y el conjunto de bases 6-31 G (d,p)

Parámetro	B3LYP	B3PW91	B98	B972
	Longitud de Enlace (Å)			
r(O38-C41)	1,3823	1,3764	1,3792	1,3758
r(O38-C35)	1,3797	1,3739	1,3766	1,3728
r(C29-C28)	1,5123	1,5085	1,5159	1,5094
r(C28-H30)	1,0981	1,0985	1,0995	1,0962
r(C28-H31)	1,0972	1,0979	1,0987	1,0957
r(C28-O20)	1,4327	1,4246	1,4286	1,4222
r(O20-C16)	1,3654	1,3600	1,3625	1,3539
r(C16-O21)	1,2125	1,2108	1,2116	1,2085
r(C16-C13)	1,4902	1,4866	1,494	1,4876
r(C13-C14)	1,5393	1,5339	1,5483	1,5310
r(C13-C8)	1,5366	1,5304	1,5446	1,5253
r(C8-C14)	1,5113	1,5074	1,5179	1,5064
r(C14-C18)	1,5196	1,5144	1,5224	1,5145
r(C14-C17)	1,5206	1,5156	1,5235	1,5156
r(C8-C7)	1,4807	1,4764	1,4835	1,4775
r(C7-C2)	1,3442	1,3438	1,3465	1,3430
r(C2-C1)	1,5081	1,5033	1,5114	1,5033
r(C2-C6)	1,5093	1,5048	1,5128	1,5049

Tabla 4.1.4.2: Comparación de los ángulos de enlace obtenidos con los distintos niveles de teoría y el conjunto de base 6-31 G (d,p)

Parámetro	B3LYP	B3PW91	B98	B972
	Ángulo de enlace (grados)			
<(C1-C2-C3)	125,0654	124,9619	125,0716	125,0094
<(C6-C2-C7)	120,5071	120,4494	120,4518	120,4525
<(C2-C7-C6)	127,1627	127,1136	127,0871	127,2014
<(C7-C6-C14)	123,8954	123,8316	123,7091	123,8436
<(C7-C6-C13)	120,0235	120,0096	119,8817	119,9831
<(C13-C16-C20)	118,4534	118,4343	118,3633	118,366
<(C13-C16-O21)	124,0196	123,9958	123,9878	124,092
<(O20-C16-O21)	117,5261	117,5692	117,6483	117,5409
<(O20-C28-C29)	109,1343	109,2577	109,1645	109,474
<(C35-O38-C41)	121,1329	120,8631	120,9489	120,8818

Tabla 4.1.4.3: Comparación de los ángulos diedros (en grados) obtenidos con los distintos niveles de teoría y el conjunto de base 6-31 G (d,p)

Parámetro	B3LYP	B3PW91	B98	B972
	Ángulo Diedro (grados)			
D(C35-C38-C41-C44)	-141,1133	-141,6761	-140,8027	-138,7064
D(O20-C28-C29-C33)	-28,652	-25,3458	-27,6642	-20,2003
D(C16-O20-C28-C29)	168,2159	168,2766	167,5831	168,8307
D(O21-C16-O20-C28)	-172,7014	-173,5745	-172,426	-172,9014
D(C13-C16-O20-C28)	7,6332	6,7203	7,8312	7,4635
D(C16-C13-C14-C17)	143,5553	143,735	143,513	143,2613
D(C16-C13-C14-C18)	2,0653	2,0715	2,0536	1,4023
D(C16-C13-C8-C7)	-133,5605	-133,7	-133,9803	-133,5833
D(C1-C2-C7-C8)	0,0577	-0,0115	-0,016	0,2376
D(C6-C2-C7-C8)	-179,958	179,9939	179,9921	-179,8419

En las Tablas 4.1.4.2 y 4.1.4.3 se muestran los valores de los ángulos de enlace y ángulos diedros que se obtuvieron con los cálculos computacionales aplicados a la molécula neutra. Los valores que se exponen son los considerados como más importantes en la geometría de la molécula. Realizando una comparación de los datos geométricos obtenidos con los distintos funcionales, no se perciben diferencias muy importantes.

Por otro lado realizando una comparación entre los datos geométricos que se han determinado para esta molécula, con los que se obtuvieron para la molécula de Cipermetrina y Permetrina, de gran parecido estructural con la Fenotrina, se observa que tampoco hay diferencias muy importantes en las respectivas estructuras optimizadas.

En la Tabla 4.1.4.4 se resumen los valores de los parámetros termoquímicos que se obtuvieron con los distintos funcionales empleados en la molécula neutra de la Fenotrina.

Tabla 4.1.4.4: Comparación de los parámetros termoquímicos obtenidos con los distintos niveles de teoría y el conjunto de base 6-31 G (d,p)

Parámetro	B3LYP	B3PW91	B98	B972
Energía (kcal/mol)	-701417,5187	-701153,4313	-701133,0875	-701172,8088
RMS	6,25E-06	2,73E-06	2,83E-06	1,31E-06
Momento Dipolar	4,311	4,3864	4,411	4,3698
Energía Vibracional del Punto Zero (kcal/mol)	273,46632	274,03057	272,83511	275,58632
Corrección del Punto Zero (Hartree/partícula)	0,435796	0,436696	0,43479	0,439175
Corrección térmica de la Energía	0,461659	8,46257	0,460773	0,464976
Corrección térmica de la Entalpía	0,462603	0,463515	0,461717	0,465921
Corrección térmica de la Energía Libre de Gibbs	0,375136	0,376026	0,373915	0,377808
Suma de las Energías electrónica y del Punto Zero	-1117,34412	-1116,92237	-1116,89186	-1116,95078
Suma de las Energías electrónica y térmica	-1117,31826	-1116,8965	-1116,86588	-1116,92497
Suma de las Entalpías electrónica y térmica	-1117,31731	-1116,89555	-1116,86494	-1116,92403
Suma de la Energía electrónica y Energía libre térmica	-1117,40478	-1116,98304	-1116,95274	-1116,01214

4.1.4.2 Formas Iónicas: protonada, desprotonada y aducto con Na⁺

Se realizó también un estudio teórico computacional de las formas iónicas de la Fenotrina, cuya formación se ha detectado en el espectrómetro de masas. El estudio teórico abarcó el análisis computacional de los formas iónicas protonada ($[M+H]^+$), desprotonada ($[M']^+$) y el aducto del ión molecular con sodio ($[M+Na]^+$).

En el análisis experimental por espectrometría de masas del estándar de la Fenotrina, se identificaron los iones correspondientes a la razón $m/z= 373$, $m/z=351$ y, aunque con menor abundancia, al ion de $m/z= 723$. Estos iones corresponden al aducto $[M+Na]^+$, al ión molecular protonado ($[M+H]^+$), y al dímero molecular formando un aducto con sodio $[2M+Na]^+$, respectivamente.

En la Figura 4.1.4.2 se muestra la estructura optimizada de la forma iónica protonada al nivel de teoría B3LYP y el conjunto de bases 6-31G (d,p).

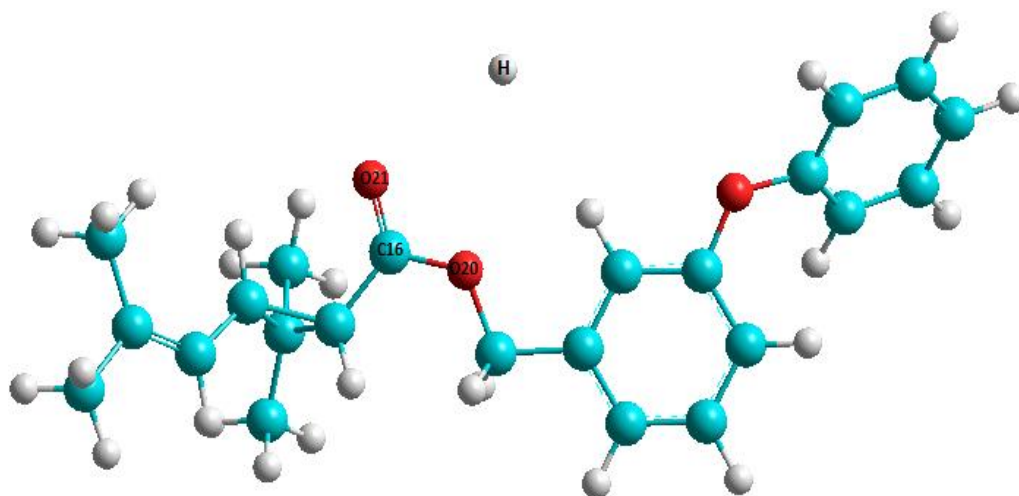


Figura 4.1.4.2: Geometría optimizada de la forma iónica protonada $[M+H]^+$ de la Fenotriline, al nivel de teoría B3LYP/6-31G (d,p)

Tabla 4.1.4.5: Parámetros geométricos optimizados para la formas iónicas $[M^*]^+$ y $[M+H]^+$ de la Fenotriline con nivel de teoría B3LYP/6-31G (d,p)

Parámetro	$[M^*]^+$	$[M+H]^+$	Parámetro	$[M^*]^+$	$[M+H]^+$
	Longitud de Enlace (Å)			Ángulo de enlace (grados)	
r(O38-C41)	1,3672	1,3669	<(C1-C2-C3)	124,4055	124,4004
r(O38-C35)	1,3697	1,3695	<(C6-C2-C7)	119,8367	119,8426
r(C29-C28)	1,5138	1,5139	<(C2-C7-C6)	126,5726	126,5987
r(C28-H30)	1,0975	1,0972	<(C7-C6-C14)	123,1276	122,951
r(C28-H31)	1,0981	1,0982	<(C7-C6-C13)	120,2439	120,3573
r(C28-O20)	1,4282	1,4286	<(C13-C16-C20)	118,1601	118,0963
r(O20-C16)	1,3628	1,3625	<(C13-C16-O21)	123,8401	123,8271
r(C16-O21)	1,2082	1,2085	<(O20-C16-O21)	117,9994	118,0766
r(C16-C13)	1,4987	1,4985	<(O20-C28-C29)	108,7337	108,6772
r(C13-C14)	1,5147	1,5143	<(C35-O38-C41)	124,0531	124,077
r(C13-C8)	1,5512	1,5488	Parámetro	Ángulo Diedro (grados)	
r(C8-C14)	1,5478	1,5502	D(C35-C38-C41-C44)	-152,9591	-153,4323
r(C14-C18)	1,5195	1,5197	D(O20-C28-C29-C33)	1,3417	-2,8326
r(C14-C17)	1,5191	1,5189	D(C16-O20-C28-C29)	168,7913	171,4043
r(C8-C7)	1,4531	1,453	D(O21-C16-O20-C28)	-172,8603	-173,7573
r(C7-C2)	1,3726	1,3726	D(C13-C16-O20-C28)	7,3417	6,3198
r(C2-C1)	1,4985	1,4985	D(C16-C13-C14-C17)	146,6216	146,2234
r(C2-C6)	1,4998	1,4997	D(C16-C13-C14-C18)	1,3862	0,799
r(H+ - O21)		2,8803	D(C16-C13-C8-C7)	-133,5768	-134,0556
			D(C1-C2-C7-C8)	0,0736	0,1119
			D(C6-C2-C7-C8)	-179,9893	-179,9645

En la Tabla 4.1.4.5 se muestran los parámetros geométricos optimizados de las formas iónicas protonada y desprotonada. Experimentalmente, por las condiciones de ionización, no se observa la formación del ión molecular desprotonado, y el estudio teórico de este ión se realizó con fines de comparación. En cambio, la forma iónica protonada se forma a bajas energías de IE y con una intensidad bastante interesante en todas las condiciones de ensayo, como se verá más adelante en la sección 4.2.4. Los resultados de los datos geométricos contrastados en esta tabla, no presentan diferencias muy importantes.

En cuanto a la estructura optimizada del ion $[M+H]^+$, la interacción del protón H^+ y la molécula de Fenotrina, se supone nuevamente que se da en la región del enlace éster, específicamente entre el H y el O carbonílico (O21), registrándose una distancia de 2,8803 Å.

Otro aducto importante, cuya formación se da en el análisis por espectrometría de masas de la Fenotrina, en las condiciones de ionización utilizadas, es el aducto de la molécula con un ión sodio, que es detectado en el espectro a un valor de $m/z=373$. El ión $[M+Na]^+$ se presenta con un pico máximo en su abundancia con energías de IE intermedias (150 – 170 eV), y con MeOH como componente de la fase móvil, se presenta con la mayor intensidad con respecto a otros iones.

La estructura optimizada de este ión, con un nivel de teoría de B3LYP /6-31G (d,p) se presenta en la Figura 4.1.4.3.

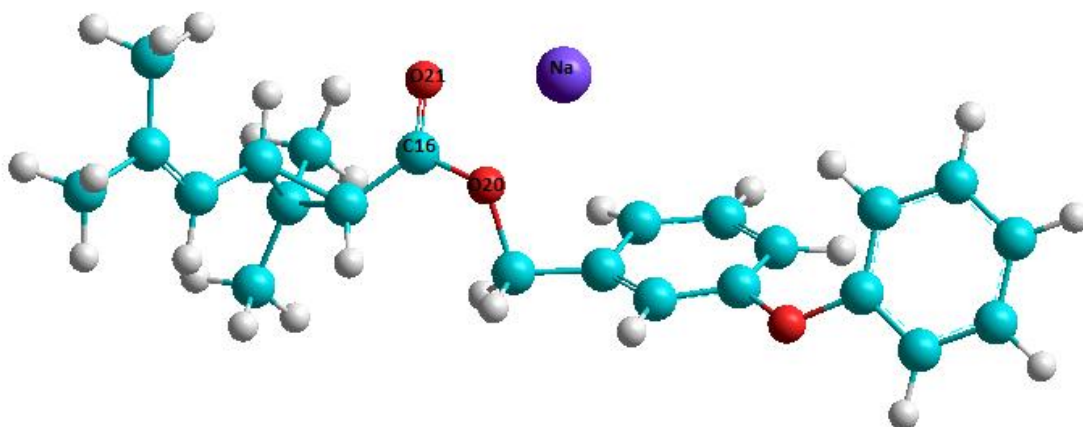


Figura 4.1.4.3: Estructura optimizada de $[M+Na]^+$ al nivel de teoría B3LYP/6-31G (d,p)

Tabla 4.1.4.6: Parámetros geométricos optimizados para el aducto $[M+Na]^+$ con nivel de teoría B3LYP/6-31G (d,p)

Parámetro	Longitud de enlace (Å)	Parámetro	Ángulo de enlace (grados)
r(O38-C41)	1,3775	<(C1-C2-C3)	125,2312
r(O38-C35)	1,3575	<(C6-C2-C7)	120,2539
r(C29-C28)	1,4746	<(C2-C7-C6)	126,5286
r(C28-H30)	1,0957	<(C7-C6-C14)	124,6843
r(C28-H31)	1,0914	<(C7-C6-C13)	119,0403
r(C28-O20)	1,5053	<(C13-C16-C20)	118,5479
r(O20-C16)	1,3704	<(C13-C16-O21)	126,7914
r(C16-O21)	1,2344	<(O20-C16-O21)	114,6221
r(C16-C13)	1,4552	<(O20-C28-C29)	105,8497
r(C13-C14)	1,5533	<(C35-O38-C41)	121,5925
r(C13-C8)	1,5673	Parámetro	Ángulo Diedro (grados)
r(C8-C14)	1,4947	D(C35-C38-C41-C44)	-151,7928
r(C14-C18)	1,5211	D(O20-C28-C29-C33)	110,0221
r(C14-C17)	1,5195	D(C16-O20-C28-C29)	140,2329
r(C8-C7)	1,4788	D(O21-C16-O20-C28)	-145,1554
r(C7-C2)	1,3459	D(C13-C16-O20-C28)	36,9505
r(C2-C1)	1,5073	D(C16-C13-C14-C17)	143,8
r(C2-C6)	1,5082	D(C16-C13-C14-C18)	4,4975
r(Na-O21)	2,3088	D(C16-C13-C8-C7)	-130,3002
r(Na-C16)	2,7111	D(C1-C2-C7-C8)	-0,9299
r(Na-O20)	2,2967	D(C6-C2-C7-C8)	178,5644

En la Tabla 4.1.4.6 se presentan los datos de los parámetros geométricos optimizados de la estructura optimizada del ion $[M+Na]^+$. La interacción del ion Na^+ con la molécula de Fenotrina, se da en la región de la formación del enlace éster, tanto con él oxígeno carbonílico (O21) como con el oxígeno del enlace éster (O20).

En la Tabla 4.1.4.7 se presentan los datos termoquímicos obtenidos para las distintas formas iónicas de la Fenotrina, estudiadas computacionalmente: $[M]^+$, $[M+H]^+$ y $[M+Na]^+$.

Tabla 4.1.4.7: Parámetros termoquímicos obtenidos con el nivel de teoría B3LYP / 6-31 G (d,p) para cada una de las formas iónicas de la Fenotrina: $[M]^+$, $[M+H]^+$ y $[M+Na]^+$

Parámetro	$[M]^+$	$[M+H]^+$	$[M+Na]^+$
Energía (kcal/mol)	-701254,5168	-701568,8238	-803103,9836
RMS	2,00E-06	2,12E-06	2,63E-06
Momento Dipolar	3,8674	3,9913	5,1143
Energía Vibracional del Punto Zero (kcal/mol)	272,53357	272,72204	270,69833
Corrección del Punto Zero (Hartree/partícula)	0,43431	0,434611	0,431385
Corrección térmica de la Energía	0,460483	0,46322	0,459897
Corrección térmica de la Entalpía	0,461427	0,464165	0,460842
Corrección térmica de la Energía Libre de Gibbs	0,372337	0,367749	0,367689
Suma de las Energías electrónica y del Punto Zero	-1117,08585	-1117,58643	-1279,39623
Suma de las Energías electrónica y térmica	-1117,05967	-1117,55782	-1279,36772
Suma de las Entalpías electrónica y térmica	-1117,05873	-1117,55688	-1279,36677
Suma de la Energía electrónica y Energía libre térmica	-1117,14782	-1117,65329	-1279,45992

4.1.4.3 Fragmentos de la Fenotrina

El principal fragmento detectado durante el proceso de ionización en el espectrómetro de masas es el correspondiente al valor de $m/z=183$ en el espectro. La formación de este fragmento tiene un máximo de intensidad con la aplicación de una energía de IE de 150 eV. El fragmento $[183]^+$ correspondería al mismo fragmento detectado para la molécula de Permetrina, ya que el residuo de alcohol en ambas moléculas es idéntica, y este fragmento iónico resultaría de la liberación del resto fenoxibencil, que por un mecanismo de re arreglo propuesto por Fleet et al. (1993), da lugar a la formación del ion tipo fenoxi tropilio.

La estructura optimizada de este ión, con el nivel de teoría B3LYP/6-31G (d,p), se muestra en la Figura 4.1.4.4. Los datos geométricos optimizados y los parámetros termoquímicos obtenidos con este nivel de teoría se muestran en la Tabla 4.1.4.8

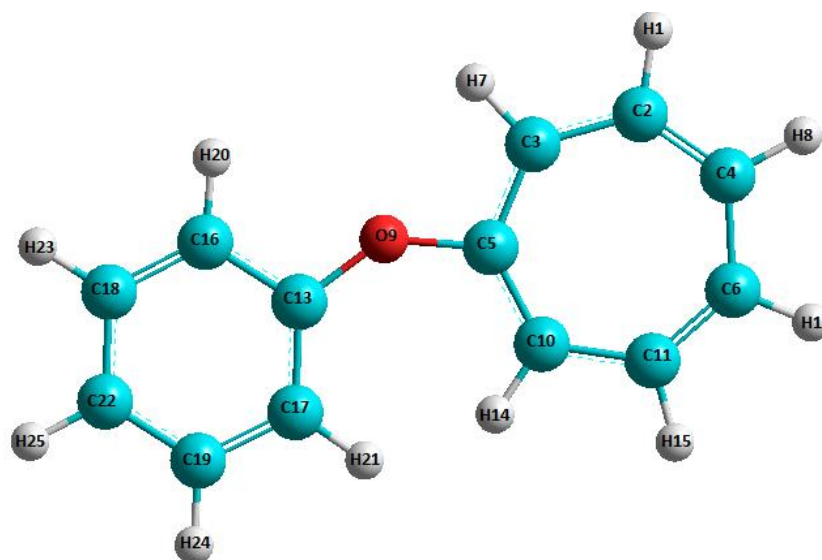


Figura 4.1.4.4: Estructura optimizada del fragmento $[183]^+$ (ión fenoxi tropilio) al nivel de teoría B3LYP/6-31G (d,p)

Tabla 4.1.4.8: Parámetros geométrico y termoquímicos obtenidos con el nivel de teoría B3LYP/6-31G (d,p) para el fragmento $[183]^+$

Parámetro	Longitud de Enlace (Å)	Parámetro	
r(C2-C4)	1,3655	Energía (kcal/mol)	-362001,4785
r(C4=C6)	1,4665	RMS	4,21E-06
r(C6-C11)	1,3656	Momento Dipolar	2,2889
r(C11-C10)	1,4309	Energía Vibracional del Punto Zero (kcal/mol)	124,54395
r(C10-C5)	1,4025	Corrección del Punto Zero (Hartree/partícula)	0,198473
r(C5-C3)	1,4211	Corrección térmica de la Energía	0,209375
r(C3-C2)	1,4238	Corrección térmica de la Entalpía	0,210319
r(C5-O9)	1,3674	Corrección térmica de la Energía Libre de Gibbs	0,160267
r(O9-C13)	1,347	Suma de las Energías electrónica y del Punto Zero	-576,687578
Parámetro	Ángulo de enlace (grados)	Suma de las Energías electrónica y térmica	-576,676678
<(C13-O9-C5)	138,8318	Suma de las Entalpías electrónica y térmica	-576,675734
<(C2-C3-C5)	127,8338	Suma de la Energía electrónica y Energía libre térmica	-576,725785

4.1.5 Alletrina

4.1.5.1 Geometría Optimizada de la molécula neutra

Se realizó un estudio teórico computacional de la molécula de Alletrina, primer piretroide sintético introducido comercialmente de forma exitosa (1949), resultante de la esterificación del ácido crisantémico con la alletrona (2-ciclopenten-1-ona-2-alil-4-hidroxi-3-metil). El estudio computacional abarcó la forma neutra de la molécula, como también las posibles formas iónicas que pudieran resultar del proceso de ionización en el espectrómetro de masas.

La estructura neutra de la Alletrina fue estudiada con los funcionales híbridos B3LYP, B3PW91, B98 y B97-2, todos con el conjunto de bases 6-31G (d,p). La estructura optimizada de la Alletrina con el nivel de teoría B3LYP 6-31G (d,p) se muestra en la Figura 4.1.5.1, en la misma también se especifica el orden de los átomos a los que se hace referencia posteriormente en las tablas de resultados.

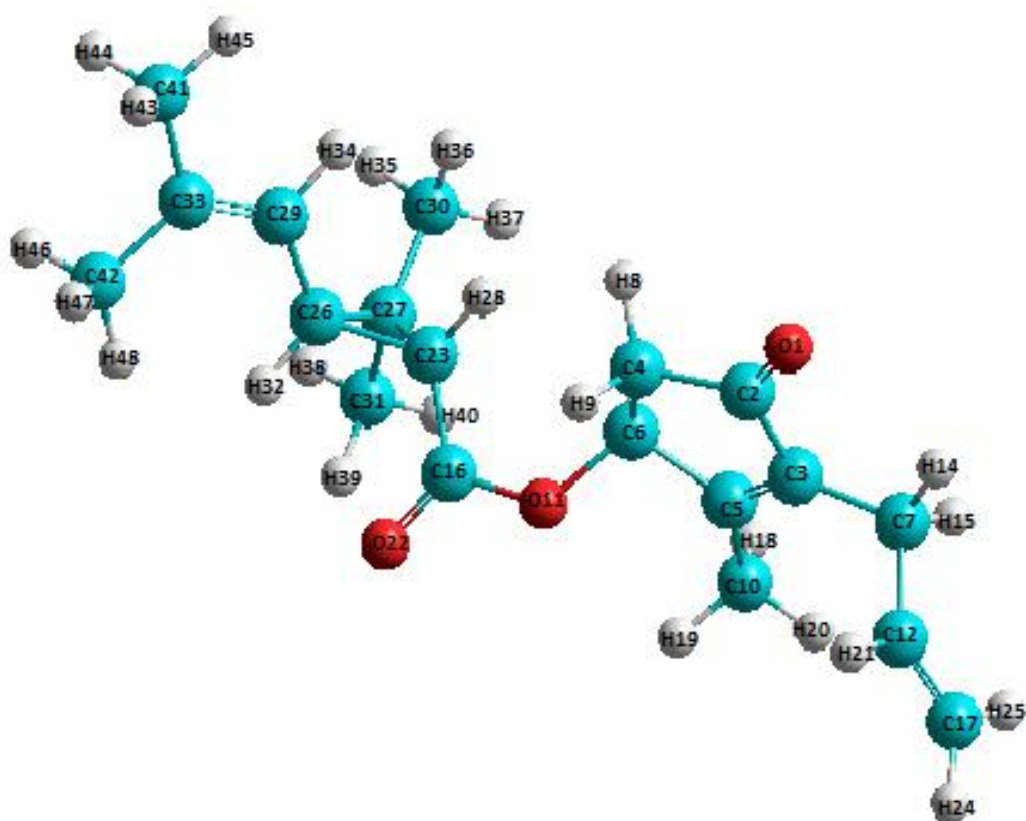


Figura 4.1.5.1: Geometría optimizada de la Alletrina al nivel de teoría B3LYP/6-31G (d,p)

Tabla 4.1.5.1: Comparación de las longitudes de enlace obtenidas con los distintos niveles de teoría y el conjunto de bases 6-31 G (d,p)

Parámetro	B3LYP	B3PW91	B98	B972
	Longitud de Enlace (Å)			
r(O1-C2)	1,2174	1,2156	1,2159	1,2137
r(C2-C3)	1,4832	1,4799	1,4874	1,4797
r(C3-C5)	1,3504	1,3498	1,3522	1,3489
r(C5-C6)	1,5216	1,5174	1,5254	1,5171
r(C4-C6)	1,5359	1,5300	1,5391	1,5292
r(C5-C7)	1,5084	1,5032	1,5115	1,5033
r(C7-C12)	1,5102	1,5053	1,5134	1,5054
r(C12=C17)	1,3328	1,3324	1,3351	1,3316
r(C5-C10)	1,4928	1,488	1,4962	1,4883
r(C6-O11)	1,4418	1,4340	1,4375	1,4330
r(O11-C16)	1,3683	1,3625	1,3652	1,3613
r(C16=O22)	1,2122	1,2105	1,2113	1,2081
r(C16-C23)	1,4901	1,4868	1,4942	1,4882
r(C23-C26)	1,5368	1,5297	1,5436	1,5248
r(C23-C27)	1,5399	1,5345	1,5492	1,5311
r(C27-C30)	1,5196	1,5145	1,5226	1,5147
r(C27-C31)	1,5205	1,5154	1,5234	1,5155
r(C26-C27)	1,5110	1,5073	1,5179	1,5063
r(C26-C29)	1,4812	1,4769	1,4841	1,4775
r(C29=C33)	1,3442	1,3437	1,3464	1,3430
r(C33-C41)	1,5094	1,5048	1,5128	1,5048
r(C33-C42)	1,5081	1,5033	1,5113	1,5042
r(C2-C4)	1,5316	1,5260	1,5354	1,5253

En la Tabla 4.1.5.1 se presentan los valores de longitudes de enlace que han sido obtenidos con los cuatro funcionales teóricos empleados en el estudio computacional de la molécula neutra. Una rápida apreciación de estos valores, permite determinar que no se presentan diferencias muy importantes según el funcional que ha sido empleado. No se disponen de datos experimentales de la geometría de esta molécula para realizar las respectivas comparaciones.

En las Tablas 4.1.5.2 y 4.1.5.3 se muestran los demás datos de la geometría de la molécula, referidos a los ángulos de enlace y ángulos diedros. Estos valores, incluyendo los de longitudes de enlace, son los que han sido considerados como más relevantes para ser entresacados de los cálculos teóricos hechos.

Tabla 4.1.5.2: Comparación de los ángulos de enlace obtenidos con los distintos niveles de teoría y el conjunto de bases 6-31 G (d,p)

Parámetro	B3LYP	B3PW91	B98	B972
	Ángulo de enlace (grados)			
<(C6-O11-C16)	123,0451	122,6627	122,6607	122,8654
<(O11-C16-O22)	117,3487	117,4532	117,5336	117,4862
<(O11-C16-C23)	118,6268	118,5494	118,4653	118,4352
<(C26-C29-C33)	127,1072	127,0718	126,9971	127,1528
<(C29-C33-C41)	120,5201	120,5148	120,5339	120,5018
<(C29-C33-C42)	124,9729	124,9241	125,0001	125,0129
<(C42-C33-C41)	114,507	114,5611	114,466	114,4854
<(C3-C7-C12)	113,3526	113,4137	113,1564	113,0644
<(C7-C12-C17)	124,9099	124,8984	124,795	124,9473

Tabla 4.1.5.3: Comparación de los ángulos diedros obtenidos con los distintos niveles de teoría y el conjunto de bases 6-31 G (d,p)

Parámetro	B3LYP	B3PW91	B98	B972
	Angulo Diedro (grados)			
D(C3-C7-C12-C17)	126,5996	127,6439	126,2477	126,4087
D(C6-O11-C16-O22)	170,5196	170,3105	169,1399	168,6949
D(C16-C23-C27-C30)	-2,1182	-2,042	-2,0208	-1,5672
D(C16-C23-C27-C31)	-143,7229	-143,9039	-143,6432	-143,3973
D(C16-C23-C26-C29)	133,3626	133,5475	133,8135	133,439
D(C23-C26-C29-C33)	-143,5915	-143,5407	-143,6233	-144,8572
D(C26-C29-C23-C41)	179,848	179,9004	179,8533	1.797.326
D(C26-C29-C33-C42)	-0,2801	-0,1988	-0,2041	-0,2502

En la región del ácido crisantémico los valores obtenidos en la geometría de esta molécula son bastante similares a los que se obtuvieron para los demás piretroides ya descritos, que tienen en común esta parte de la estructura, como la Fenotrina y la Tetrametrina. Incluso en la zona de la molécula correspondiente a la unión éster los parámetros obtenidos son bastante similares.

En la Tabla 4.1.5.4 se muestran los datos de los parámetros termoquímicos que han sido obtenidos de los cálculos con los cuatro funcionales para la molécula neutra de la Alletrina.

Tabla 4.1.5.4: Comparación de los parámetros termoquímicos obtenidos con los distintos niveles de teoría y el conjunto de bases 6-31 G (d,p)

Parámetro	B3LYP	B3PW91	B98	B972
Energía (kcal/mol)	-605756,8336	-605531,7598	-605513,2545	-605545,8555
RMS	2,33E-06	2,17E-06	2,11E-06	1,90E-06
Momento Dipolar	3,4339	3,443	3,4725	3,5048
Energía Vibracional del Punto Zero (kcal/mol)	256,88675	257,33513	256,35491	258,93456
Corrección del Punto Zero (Hartree/partícula)	0,409375	0,41009	0,408528	0,412638
Corrección térmica de la Energía	0,434298	0,435033	0,433556	0,437474
Corrección térmica de la Entalpía	0,435242	0,435978	0,4345	0,438419
Corrección térmica de la Energía Libre de Gibbs	0,351249	0,351721	0,349988	0,354736
Suma de las Energías electrónica y del Punto Zero	-964,925546	-964,566153	-964,538226	-964,586068
Suma de las Energías electrónica y térmica	-964,900623	-964,54121	-964,513197	-964,561232
Suma de las Entalpías electrónica y térmica	-964,899679	-964,540265	-964,512253	-964,560288
Suma de la Energía electrónica y Energía libre térmica	-964,983672	-964,624522	-964,596765	-964,64397

4.1.5.2 Formas Iónicas protonada y desprotonada

Se realizó también el estudio teórico computacional de las formas iónicas de la Alletrina, que podrían presentarse en el proceso de ionización del espectrómetro de masas.

Experimentalmente se observó que el ión protonado de la Alletrina ($[M+H]^+$) se forma a bajas energías de impacto electrónico y corresponde a un valor de $m/z=303$ en el espectro de masas obtenido. El ion radical ($[M^\bullet]^+$) no se forma por las condiciones de ionización utilizadas en este estudio, que han sido discutidas anteriormente. De igual manera, a efectos de comparación se realizó el cálculo teórico de las dos estructuras iónicas $(M+H)^+$ y $[M^\bullet]^+$ con un nivel de teoría B3LYP/6-31G (d,p). La estructura optimizada del ion protonado se muestra en la Figura 4.1.5.2.

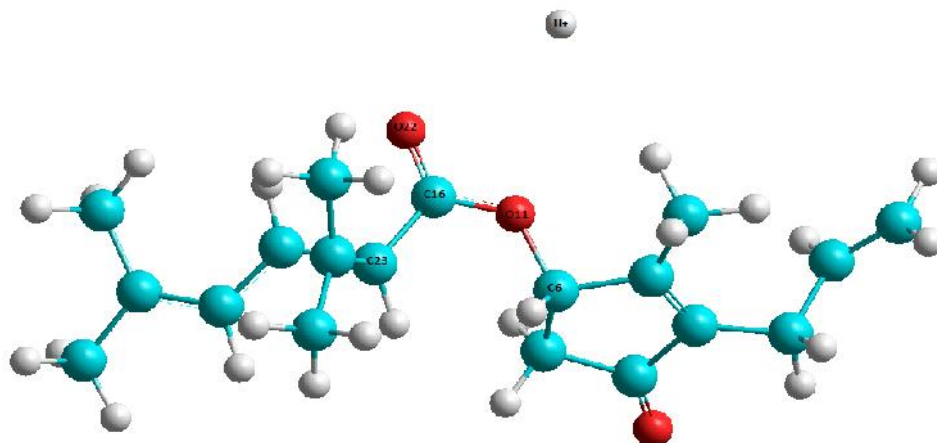


Figura 4.1.5.2: Geometría optimizada de la forma iónica protonada $[M+H]^+$ de la Alletrina al nivel de teoría B3LYP/6-31G (d,p)

Tabla 4.1.5.5: Parámetros geométricos optimizados para la formas iónicas $[M]^+$ y $[M+H]^+$ de la Alletrina al nivel de teoría B3LYP/6-31G (d,p)

Parámetro	$[M]^+$	$[M+H]^+$	Parámetro	$[M]^+$	$[M+H]^+$
	Longitud de Enlace (Å)			Ángulo de enlace °(grados)	
r(O1-C2)	1,2123	1,2123	<(C6-O11-C16)	124,6383	124,7034
r(C2-C3)	1,4854	1,485	<(O11-C16-O22)	120,8901	120,8899
r(C3-C5)	1,351	1,3511	<(O11-C16-C23)	118,4174	118,4303
r(C5-C6)	1,5191	1,5192	<(C26-C29-C33)	125,2883	125,3059
r(C4-C6)	1,5312	1,531	<(C29-C33-C41)	119,4506	119,4198
r(C5-C7)	1,5081	1,5081	<(C29-C33-C42)	123,9579	123,9776
r(C7-C12)	1,5115	1,5115	<(C42-C33-C41)	116,5777	116,5889
r(C12=C17)	1,3327	1,3327	<(C3-C7-C12)	113,7752	113,7318
r(C5-C10)	1,4937	1,4936	<(C7-C12-C17)	124,5979	124,5931
r(C6-O11)	1,467	1,4671	Parámetro	Ángulo Diedro (grados)	
r(O11-C16)	1,3336	1,3331	D(C3-C7-C12-C17)	126,9748	126,8330
r(C16=O22)	1,2092	1,2095	D(C6-O11-C16-O22)	175,7571	175,3562
r(C16-C23)	1,5369	1,5367	D(C16-C23-C27-C30)	14,8866	14,9500
r(C23-C26)	1,5159	1,5159	D(C16-C23-C27-C31)	-149,1676	149,1404
r(C23-C27)	1,484	1,484	D(C16-C23-C26-C29)	144,9206	144,6694
r(C27-C30)	1,501	1,501	D(C23-C26-C29-C33)	-168,3647	-168,3085
r(C27-C31)	1,5034	1,5033	D(C26-C29-C23-C41)	176,7325	176,6270
r(C26-C27)	1,8171	1,8172	D(C26-C29-C33-C42)	-1,8717	-1,9744
r(C26-C29)	1,4063	1,4063			
r(C29=C33)	1,3958	1,3957			
r(C33-C41)	1,4934	1,4935			
r(C33-C42)	1,4938	1,4937			
r(C2-C4)	1,5385	1,5386			
r(H+ - O22)		3,073			

Como se muestra en la estructura del ion protonado, se supone la interacción del H^+ con el Oxígeno carbonílico (O22), en donde se establece una distancia entre estos átomos de 3,073 Å.

En la Tabla 4.1.5.5 están contrastados los valores de los datos geométricos (longitudes de enlace, ángulos de enlace y ángulos diedros) de las estructuras optimizadas de las formas iónicas $[M^*]^+$ y $[M+H]^+$.

4.1.5.3 Formación de Aductos

Se realizó el estudio teórico computacional de posibles aductos de la Alletrina, que podrían formarse con las condiciones de ionización utilizadas experimentalmente. El estudio abarcó a los iones formados por la interacción de la molécula de la Alletrina con el ión sodio ($[M+Na]^+$) y el ión amonio ($[M+NH_4]^+$). Experimentalmente, sin embargo se observó solo la formación del aducto con sodio, no así el de amonio.

La formación del ión $[M+Na]^+$ se observó de manera bastante importante en cuanto a abundancia con respecto a los otros iones detectados en el espectrómetro de masas, de hecho, con la utilización de MeOH en la fase móvil, constituyó el principal ión en intensidad iónica, presentándose a un valor de $m/z=325$. El pico máximo de abundancia de este ión se observó con la aplicación de una energía de IE de entre 130 y 150 eV.

En las Figuras 4.1.5.3 y 4.1.5.4 se muestran las estructuras optimizadas de los aductos $[M+Na]^+$ y $[M+NH_4]^+$.

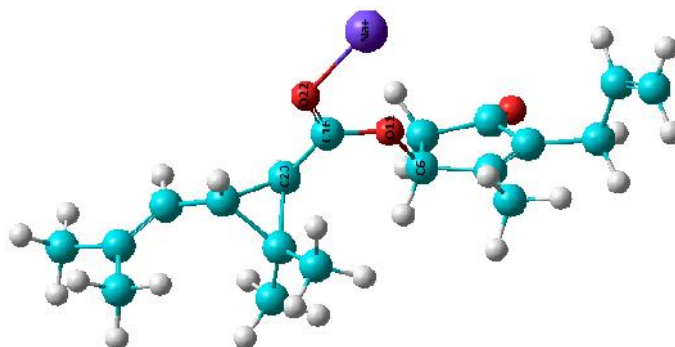


Figura 4.1.5.3: Estructura optimizada de $[M+Na]^+$ al nivel de teoría B3LYP/6-31G (d,p)

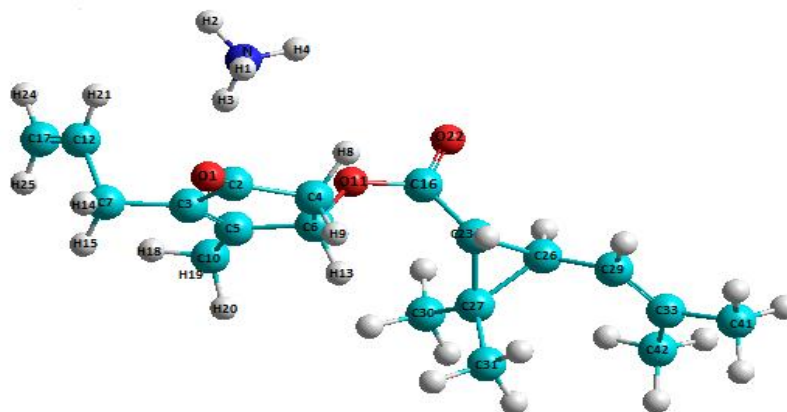


Figura 4.1.5.4: Estructura optimizada de $[M+NH_4]^+$ al nivel de teoría B3LYP/6-31G (d,p)

Tabla 4.1.5.6: Parámetros geométricos optimizados de los aductos formados con la Alletrina al nivel de teoría B3LYP/6-31G (d,p)

Parámetro	$[M+Na]^+$	$[M+NH_4]^+$	Parámetro	$[M+Na]^+$	$[M+NH_4]^+$
	Longitud de Enlace (Å)			Ángulo de enlace (grados)	
r(O1-C2)	1,2882	1,2936	<(C6-O11-C16)	122,0562	124,4089
r(C2-C3)	1,4044	1,4004	<(O11-C16-O22)	115,2931	115,3977
r(C3-C5)	1,4146	1,41	<(O11-C16-C23)	117,8692	120,6861
r(C5-C6)	1,4991	1,4923	<(C26-C29-C33)	-126,4136	126,5321
r(C4-C6)	1,5333	1,534	<(C29-C33-C41)	120,1739	120,2906
r(C5-C7)	1,5147	1,5122	<(C29-C33-C42)	125,1775	125,2232
r(C7-C12)	1,5152	1,5131	<(C42-C33-C41)	114,6463	114,4837
r(C12=C17)	1,3417	1,3386	<(C3-C7-C12)	109,9952	110,8117
r(C5-C10)	1,497	1,4945	<(C7-C12-C17)	125,1769	125,0942
r(C6-O11)	1,504	1,5061	Parámetro	Ángulo Diedro (grados)	
r(O11-C16)	1,3764	1,3414	D(C3-C7-C12-C17)	105,7692	109,917
r(C16=O22)	1,2328	1,2485	D(C6-O11-C16-O22)	129,3453	145,7255
r(C16-C23)	1,4556	1,457	D(C16-C23-C27-C30)	-5,2953	-4,066
r(C23-C26)	1,5751	1,5659	D(C16-C23-C27-C31)	-144,7979	-143,5579
r(C23-C27)	1,5488	1,5526	D(C16-C23-C26-C29)	129,1492	129,8312
r(C27-C30)	1,5197	1,5193	D(C23-C26-C29-C33)	-133,3465	-136,4987
r(C27-C31)	1,5216	1,5211	D(C26-C29-C23-C41)	-178,3975	-178,8224
r(C26-C27)	1,4955	1,4962	D(C26-C29-C33-C42)	1,0183	-0,577
r(C26-C29)	1,4756	1,4791			
r(C29=C33)	1,3491	1,3458			
r(C33-C41)	1,507	1,5082			
r(C33-C42)	1,5062	1,5073			
r(C2-C4)	1,5404	1,5382			
r(Na-O22)	2,3047				

Tabla 4.1.5.7: Longitudes de enlace del aducto $[M+NH_4]^+$ al nivel de teoría B3LYP/6-31G (d,p)

$[M+NH_4]^+$	Longitud de Enlace (Å)	$[M+NH_4]^+$	Longitud de Enlace (Å)
r(N-H1)	1,021	r(H1-C12)	3,8407
r(N-H2)	1,0212	r(N1-O11)	3,0644
r(N-H3)	1,0317	r(N1-H21)	3,7446
r(N-H4)	1,1186	r(H2-C5)	3,5453
r(H1-C2)	4,168	r(H3-C10)	3,9836
r(H1-C3)	4,2252	r(H3-O11)	3,1497
r(H1-C5)	4,4234	r(H3-C12)	2,6675
r(H1-C6)	4,2775	r(H4-O11)	2,3948
r(H1-O11)	3,1456	r(H4-O22)	1,4722

Tabla 4.1.5.8: Parámetros termoquímicos obtenidos con el nivel de teoría B3LYP / 6-31 G (d,p) para cada una de las formas iónicas de la Alletrina.

Parámetro	$[M]^+$	$[M+H]^+$	$[M+Na]^+$	$[M+NH_4]^+$
Energía (kcal/mol)	-605584,9462	-605899,1547	-707452,2587	-641440,2172
RMS	2,43E-06	4,10E-06	3,24E-06	5,22E-06
Momento Dipolar	15,1391	15,2084	3,883	6,0038
Energía Vibracional del Punto Zero (kcal/mol)	255,43979	255,76053	254,85758	286,11948
Corrección del Punto Zero (Hartree/partícula)	0,407069	0,407580	0,406141	0,45596
Corrección térmica de la Energía	0,432751	0,435610	0,433329	0,484256
Corrección térmica de la Entalpía	0,433695	0,436555	0,434273	0,4852
Corrección térmica de la Energía Libre de Gibbs	0,347717	0,344046	0,345968	0,393939
Suma de las Energías electrónica y del Punto Zero	-964,653932	-965,154144	-1126,99069	-1021,74405
Suma de las Energías electrónica y térmica	-964,628251	-965,126114	-1126,9635	-1021,71576
Suma de las Entalpías electrónica y térmica	-964,627307	-965,125169	-1126,96256	-1021,17148
Suma de la Energía electrónica y Energía libre térmica	-964,713284	-965,217678	-1127,05085	-1021,80607

En las Tablas 4.1.5.6 y 4.1.5.7 se resumen los datos de la estructura geométrica optimizada de los dos aductos considerados en el estudio computacional. Para el aducto $[M+Na]^+$ puede verse una interacción entre el ion Na^+ y el oxígeno carbonílico (O22) a través de una distancia de enlace de 2,3047 Å.

Se podría suponer que esta interacción es bastante fuerte por la distancia a la que tiene lugar, lo que da una idea de la estabilidad de este ión en las condiciones experimentales.

En los estudios por espectrometría de masas, también se ha observado la formación de manera importante del dímero aducto con Na^+ $[2M+\text{Na}]^+$, sobre todo con la utilización de MeOH con fase móvil, con el correspondiente valor de $m/z=627$.

En la Tabla 4.1.5.8 se resumen los datos de los parámetros termoquímicos de todas las formas iónicas de la Alletrina que han sido descriptas.

4.1.5.4 Fragmentos de la Alletrina

Los fragmentos más importantes de la Alletrina, cuya formación se dio en el estudio experimental correspondieron los iones $[169]^+$ y $[123]^+$. Estos fragmentos probablemente corresponderían a formas iónicas de la región del ácido crisantémico, lo que difiere del resto de las moléculas que han sido tratadas en este estudio, en donde se vio que los fragmentos iónicos principales detectados en el espectrómetro de masas correspondían al residuo del alcohol correspondiente.

El fragmento $[169]^+$ correspondería a una forma protonada del ácido crisantémico, mientras que el fragmento $[123]^+$, sería el resultado de la liberación del residuo carboxilato del ión anterior. Aún no se disponen de datos de la estructura optimizada calculada, para estos iones.

4.2 Estudio experimental por espectrometría de masas de las estructuras de los piretroides considerados

En la bibliografía existen numerosos trabajos que hacen mención de la espectrometría de masas como método analítico para la determinación de compuestos orgánicos en el medio ambiente, y en particular a plaguicidas, en distintos tipos de matrices, como ser agua, suelos y sedimentos. Entre estas metodologías se hace especial referencia a los métodos LC/MS, particularmente a la utilización de las fuentes de ionización ESI y APCI, y GC/MS. (Richardson, 2000).

En este trabajo se realizó un estudio experimental por espectrometría de masas de las seis estructuras de los piretroides que han sido consideradas, cada una por separado en principio, y con la metodología de barrido a distintas energías de impacto y con modos de detección positivo, para luego finalmente lograr una metodología ión selectiva que permita la determinación simultánea de una mezcla de estos compuestos, en muestras ambientales, como pueden ser agua, suelos o sedimentos.

Durante el estudio se fueron variando condiciones experimentales analíticas, lo que permitió obtener una metodología optimizada para el análisis cuantitativo de matrices ambientales.

Las condiciones experimentales que se variaron fueron las fuentes de ionización utilizadas como interfases entre el cromatógrafo líquido y el espectrómetro de masas, los solventes utilizados como fase móvil para la corrida cromatográfica, la temperatura del sistema LC/MS durante el proceso de ionización y las energías de impacto electrónico en la cámara de ionización.

A continuación se presentan los resultados obtenidos para cada una de las estructuras estudiadas, según las variaciones experimentales que se realizaron.

4.2.1 Cipermetrina

Realizando las determinaciones con el estándar de Cipermetrina en solución metanólica, todos los espectros resultantes, obtenidos utilizando ya sea con MeOH o ACN como solvente de la fase móvil cromatográfica, dieron al ión 448 $[M+H+32]^+$ como predominante utilizando los valores más bajos de energía de impacto electrónico. Este ion predomina como pico base hasta aproximadamente 150 eV de energía de impacto como se ve en el cromatograma y espectro de masas de la Figura 4.2.1.1 y en la Figura 4.2.1.5 (a y b), esta última mostrando la relación de la abundancia en que se presentan los iones mayoritarios según la energía de impacto electrónico aplicado en la fuente de ionización.

A partir de 150 eV de energía se hace importante como pico base el fragmento iónico 240, que posiblemente corresponde al fragmento de PM 208 unido

como aducto a una molécula del solvente metanol. Este fragmento iónico permanece como pico base hasta aproximadamente 250 eV de energía de impacto. Utilizando valores mayores de energía de impacto electrónico no se observa predominancia de algún ion en particular por el proceso de fragmentación de la molécula, lo que resulta en la presencia de una gran cantidad de iones de difícil asociación con alguna especie química particular.

Utilizando ACN como fase móvil de la cromatografía el único ion secundario que se forma es el correspondiente al aducto 448 $[M+H+32]^+$, a energías de impacto inferiores a 150 eV. En presencia de MeOH (Figura 4.2.1.3) como solvente de la fase móvil también se generan aductos con los cationes Na^+ y NH_4^+ de $m/z=438$ y $m/z=433$ respectivamente. Estos aductos son minoritarios y tienen lugar a energías de impacto inferiores a 150 eV.

La influencia del solvente utilizado en la fase móvil, sobre la abundancia de los iones considerados en el espectro de masas arrojó que para todos los casos experimentales, en presencia de ACN la abundancia de los iones fue mayor que en presencia de MeOH.

Con respecto a la influencia de la temperatura del gas de secado en la abundancia iónica, no se obtuvieron diferencias significativas, resultando que tanto a 300 o 350°C se obtuvo la misma población y abundancia iónica (Figura 4.2.1.6).

En ausencia de MeOH (Figura 4.2.1.2 y 6.2.1.4), tanto como solución diluyente del estándar de Cipermetrina y como componente de la fase móvil de la corrida cromatográfica, los iones que se presentan como pico base a bajas energías de impacto corresponden a los aductos $[M+NH_4]^+$ en principio y luego al ion $[M+Na]^+$.

El fragmento iónico que aparece con mayor importancia al aumentar la energía de impacto electrónico corresponde al ion $[181]^+$, resultante de la pérdida del residuo ácido de la molécula para dar finalmente el ion tipo tropilio benzofurano, según el mecanismo de fragmentación propuesto por (Fleet et al., 1993). A energías de impacto electrónico superiores a 190 eV, se produce una fragmentación masiva de

la molécula del piretroide resultando en iones de distintos valores de m/z de difícil asignación.

La temperatura del gas de secado no tiene una influencia muy marcada en la abundancia de las especies iónicas consideradas. Sin embargo se puede observar en las comparaciones hechas que los fragmentos iónicos aumentan ligeramente en abundancia a 350°C, mientras que los aductos no muestran una tendencia clara. Así el aducto $[M+NH_4]^+$ se presenta con mayor abundancia a 350°C, mientras que el correspondiente aducto con Na, $[M+Na]^+$ se presenta con mayor abundancia a 300°C.

Con la fuente de ionización APCI, con el agregado de un dopante, acetato de amonio son detectables principalmente los fragmentos iónicos $[213]^+$ y $[389]^+$, el aducto del ion molecular y el catión NH_4^+ , $[415+18]^+$. Sin el agregado del NH_4^+ al medio, para la separación cromatográfica, se hace muy difícil la obtención de algún ión característico.

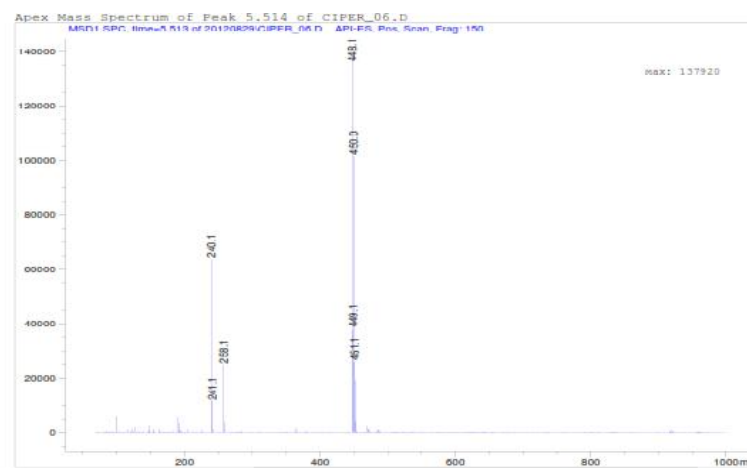
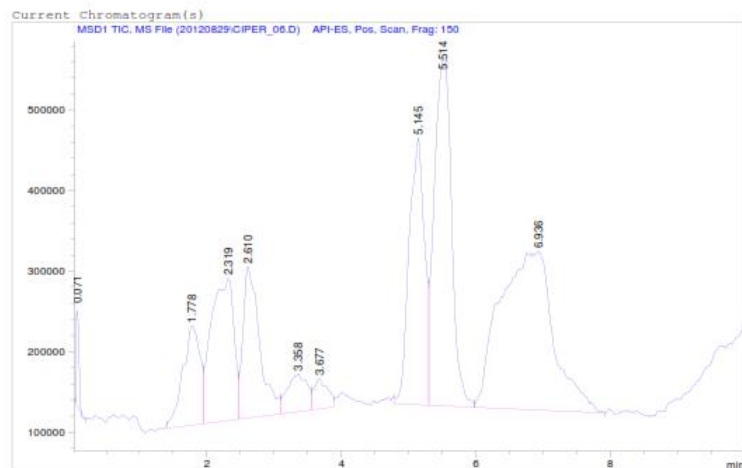


Figura 4.2.1.1: Cromatograma y espectro de masas de la Cipermetrina utilizando ACN en la fase móvil, con temperatura del gas de secado de 300°C y Energía de impacto electrónico: 150 eV

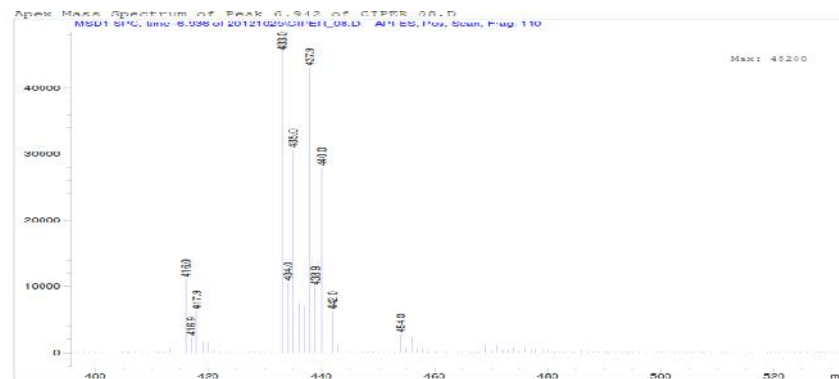
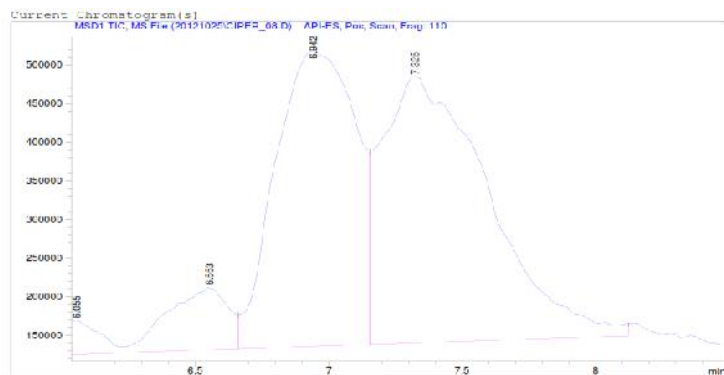


Figura 4.2.1.2: Cromatograma y espectro de masas de la Cipermetrina en ausencia de metanol, utilizando ACN en la fase móvil, con temperatura del gas de secado de 350°C y Energía de impacto electrónico: 110 eV

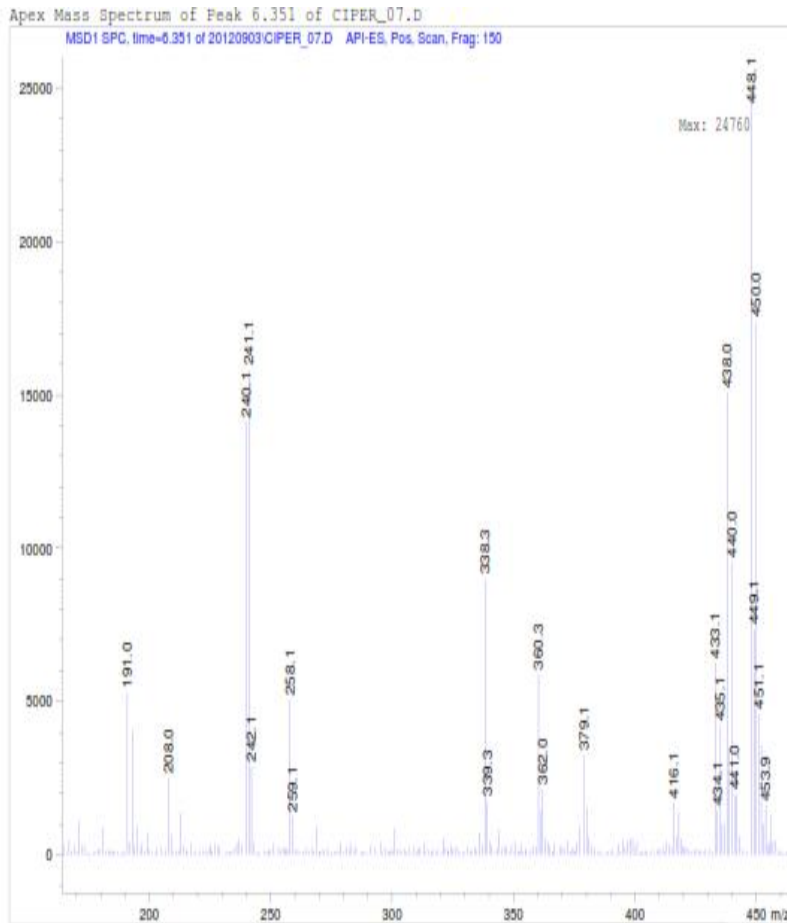


Figura 4.2.1.3: Espectro de masas de la Cipermetrina utilizando MeOH en la fase móvil, con temperatura del gas de secado de 300°C y energía de impacto electrónico de 150 eV

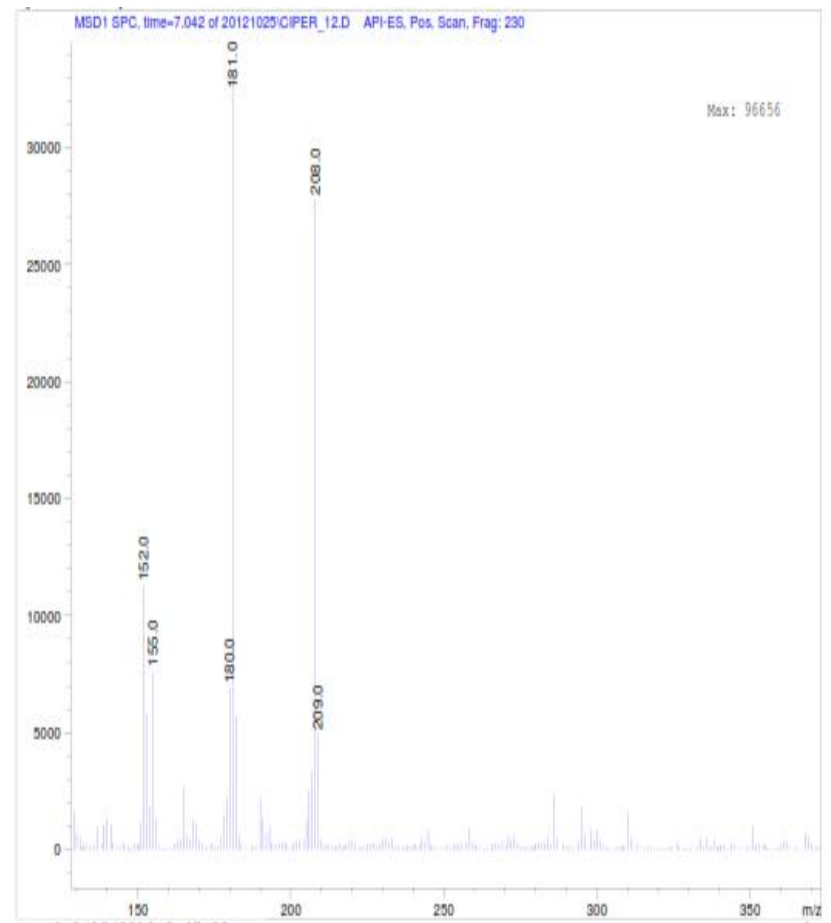


Figura 4.2.1.4: Espectro de masas de la Cipermetrina en ausencia de metanol, utilizando ACN en la fase móvil, con temperatura del gas de secado de 350°C y energía de impacto electrónico: 230 eV.

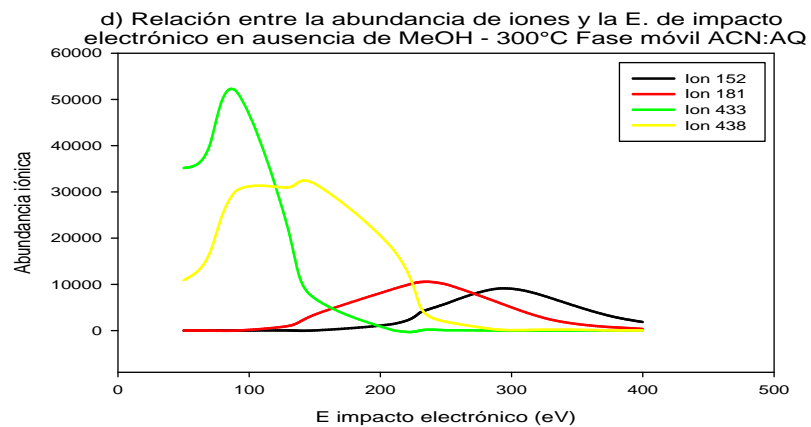
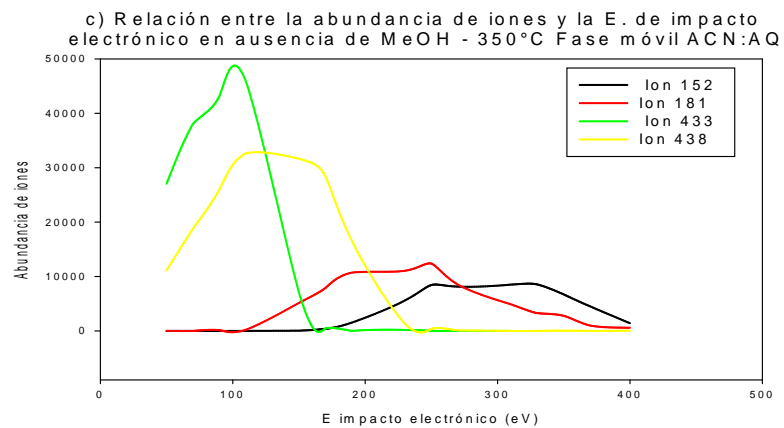
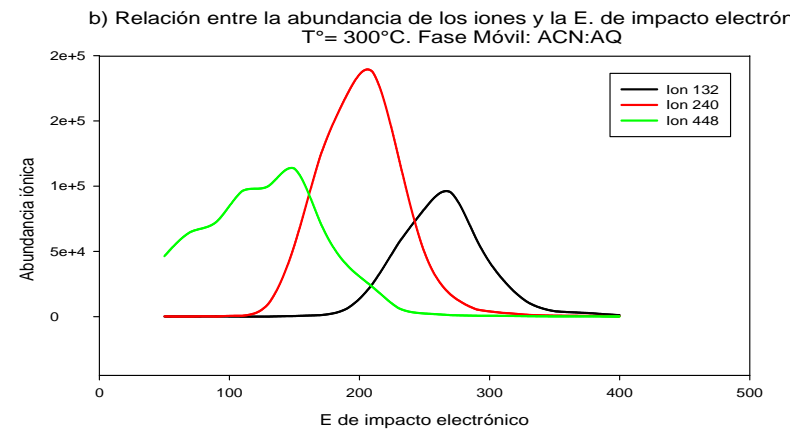
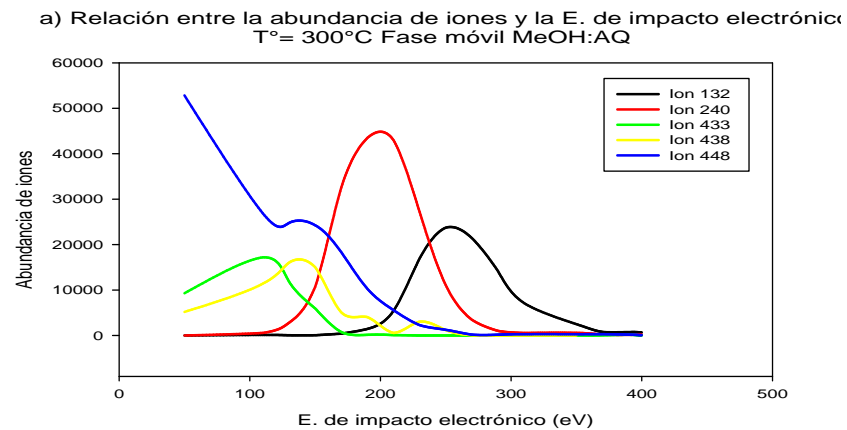


Figura 4.2.1.5: Comportamiento de la relación de la abundancia de iones frente a distintas variables analíticas

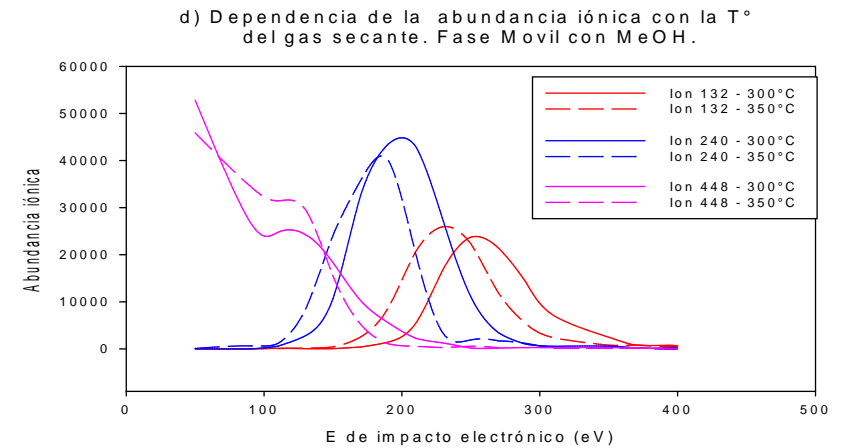
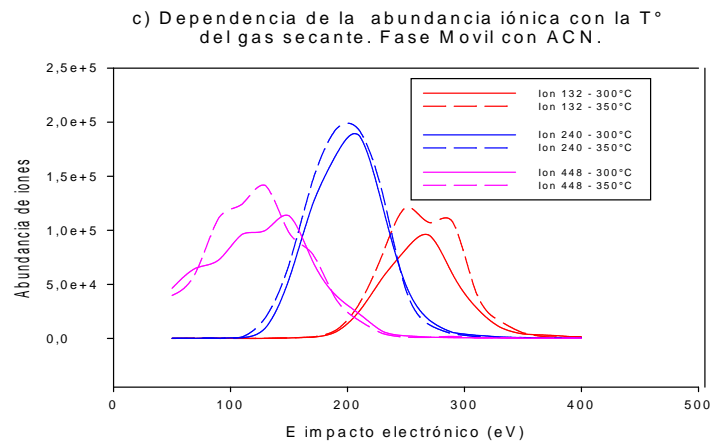
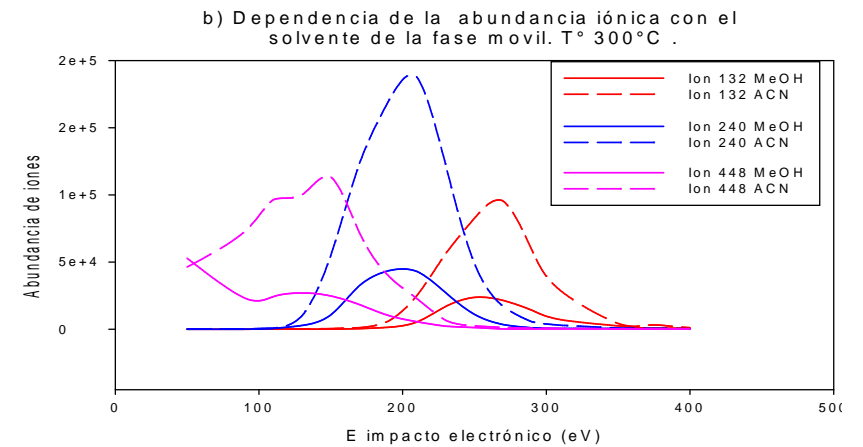
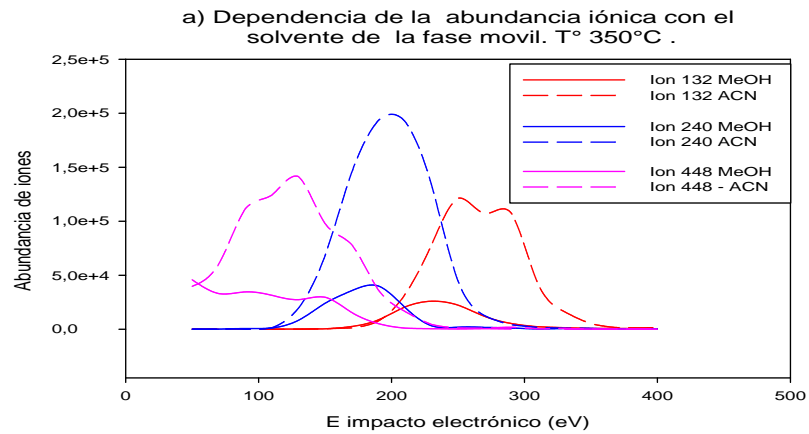


Figura 4.2.1.6: Comparación de la relación de la abundancia de iones con la energía de impacto electrónico, variando la composición de la fase móvil utilizada y la temperatura del sistema.

4.2.2 Permetrina

Con el estándar de Permetrina, en todas las condiciones experimentales predomina el fragmento iónico $[183]^+$, correspondiente al ion fenoxi tropilium, según el mecanismo propuesto por (Fleet et al., 1993). Esto es observado en los espectros mostrados en las Figuras 4.2.2.1 y 4.2.2.2.

A bajas energías de impacto electrónico también se presentan en el espectro los iones secundarios, aductos del ion molecular con los cationes Na^+ y NH_4^+ , pero en mucha menor proporción que el fragmento iónico. Utilizando metanol como constituyente de la fase móvil, a muy bajas energías de impacto, también llegan al detector de espectrómetro de masas, el aducto $[2M+\text{Na}]^+$ pero en muy pequeñas cantidades respecto a los otros iones. Variando la temperatura, no es muy notable la diferencia en las abundancias de los iones tanto utilizando metanol o ACN, sin embargo hay una tendencia de mayor abundancia a 300°C para todos los iones, como verse en la Figura 4.2.2.5 (c y d).

Con respecto el solvente utilizado, en presencia de MeOH la abundancia es mayor para los iones $[183]^+$ y $[M+\text{Na}]^+$, y sobre todo para este último la diferencia es significativa, con lo que se observa utilizando como fase móvil ACN, tanto a 300°C como a 350°C (Figura 4.2.2.5 a y b). Eliminando la presencia de MeOH (Figuras 4.2.2.3 y 4.2.2.4), tanto como diluyente del estándar y como componente de la fase móvil, se observa que el ión $[M+\text{Na}]^+$ se presenta en mayor abundancia. Esta comparación se realizó a 300°C y utilizando ACN como componente de la fase móvil de la cromatografía.

Utilizando la fuente de ionización APCI, no se observó prácticamente la formación de iones secundarios. Realizando el estudio en modo positivo con una programación de SCAN, los iones predominantes son los fragmentos $[319]^+$ y $[355]^+$, que resultan de la escisión de la molécula, de los dos y de uno solo de los átomos de Cloro, respectivamente. La respuesta específica (relación área del pico del cromatograma / concentración del analito) fue inferior al observado con la fuente de ionización ESI.

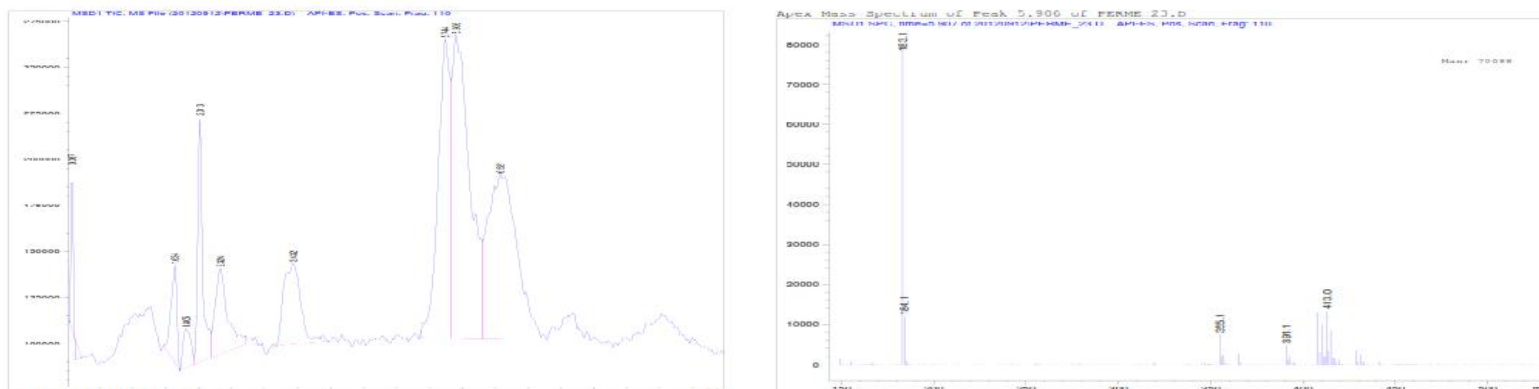


Figura 4.2.2.1: Cromatograma y Espectro de masas de la Permetrina, utilizando ACN en la fase móvil, con temperatura del gas de secado de 300°C y energía de impacto electrónico: 110 eV

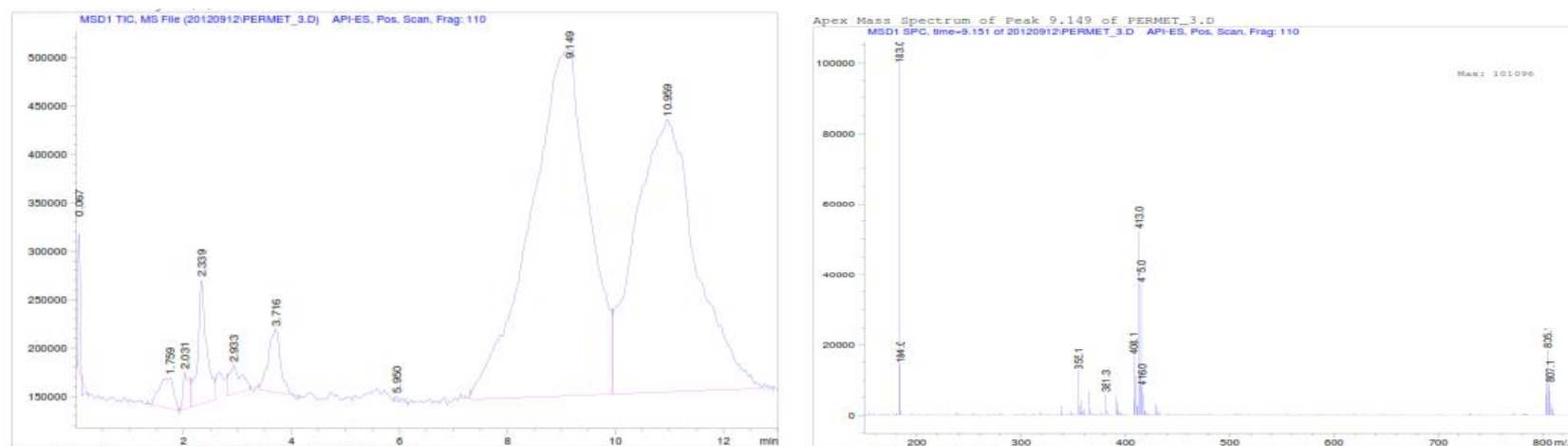


Figura 4.2.2.2: Cromatograma y Espectro de masas de la Permetrina, utilizando MeOH en la fase móvil, con temperatura del gas de secado de 300°C y energía de impacto electrónico: 110 eV

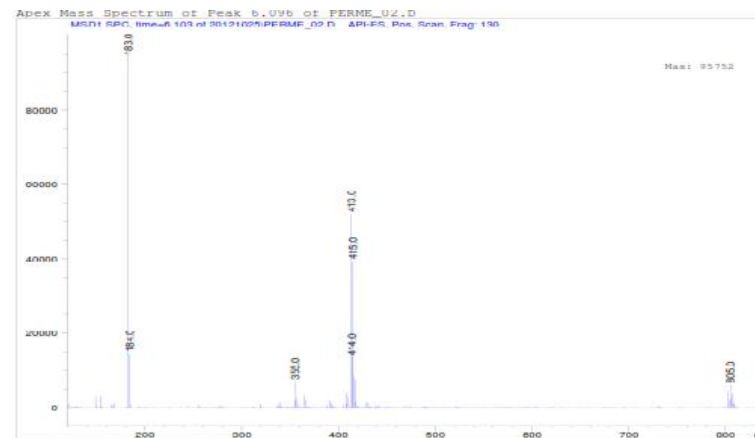
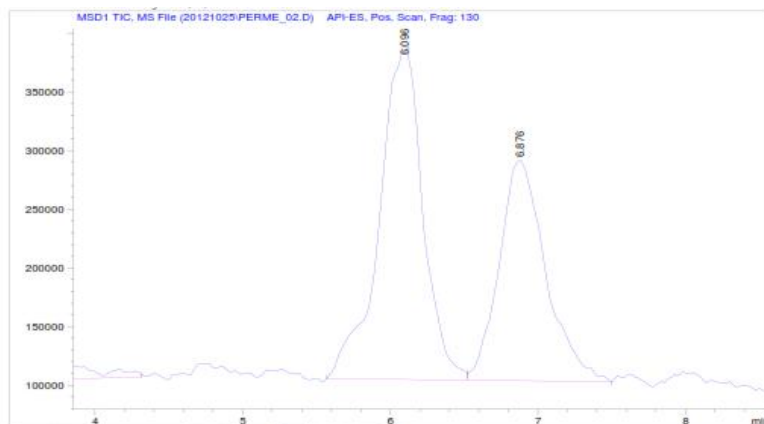


Figura 4.2.2.3: Cromatograma y Espectro de masas de la Permetrina, en ausencia de MeOH, utilizando ACN en la fase móvil, con temperatura del gas de secado de 300°C y energía de impacto electrónico: 130 eV

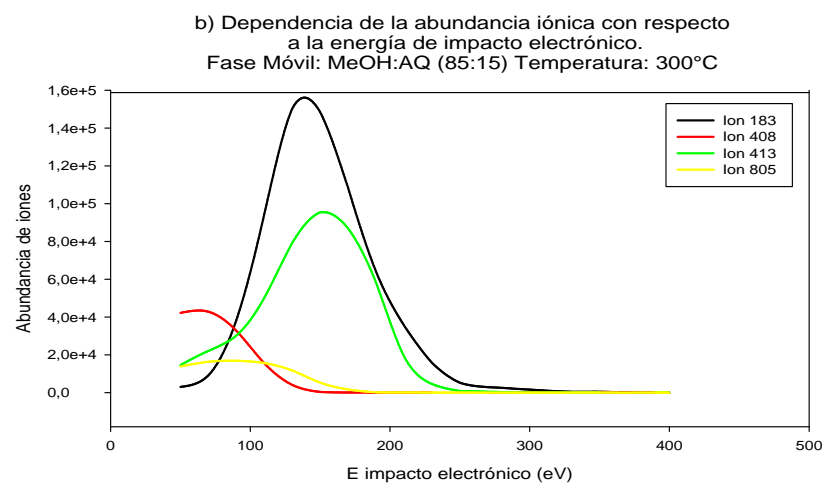
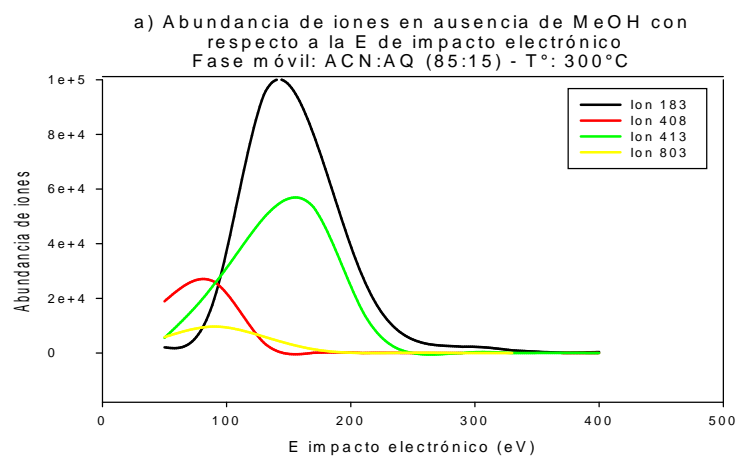


Figura 4.2.2.4: Dependencia de la población iónica frente a la Energía de Impacto electrónico, en ausencia y en presencia de MeOH.

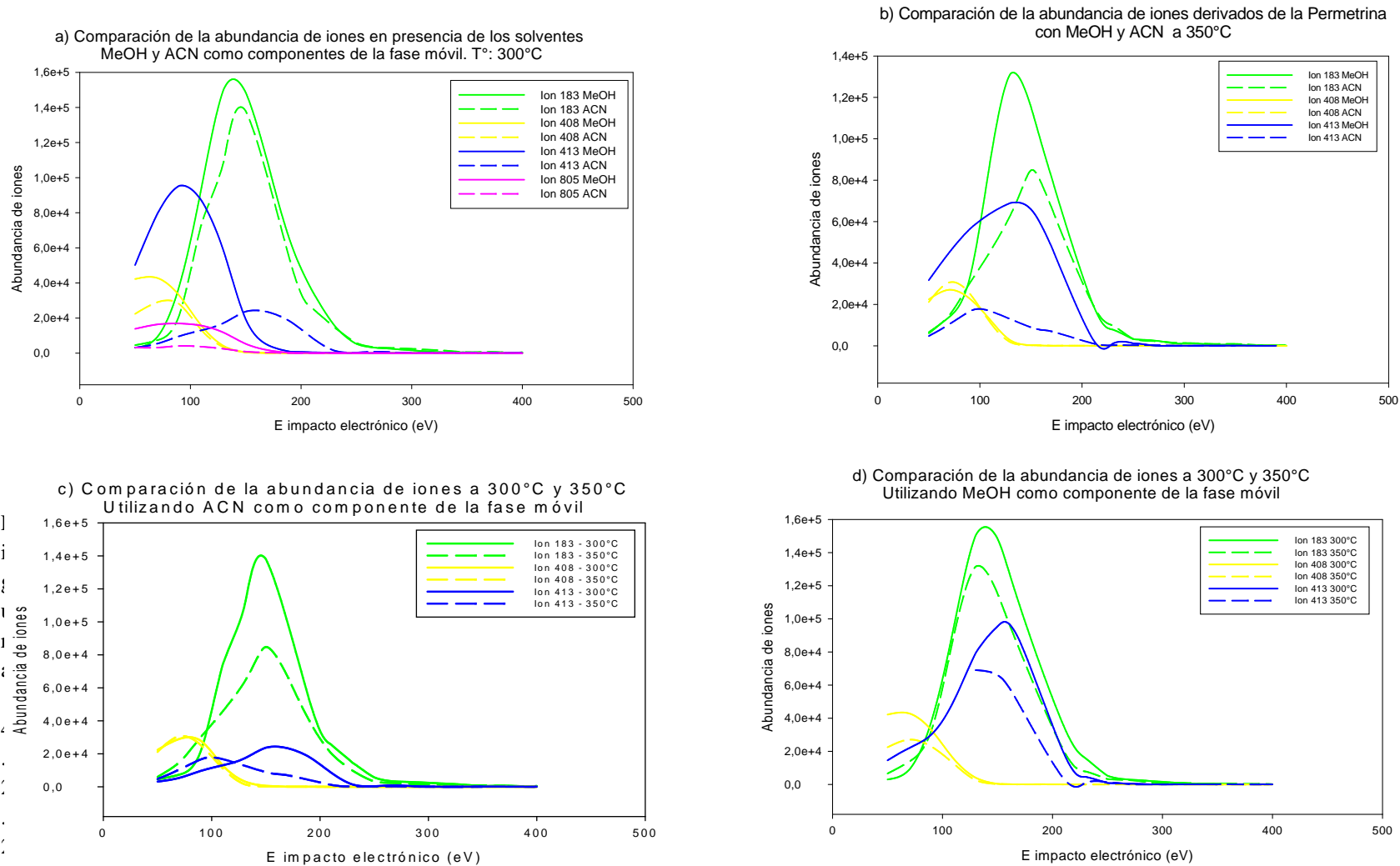


Figura 4.2.2.5: Comparación de la relación de la abundancia de iones con la energía de impacto electrónico, variando la composición de la fase móvil utilizada y la temperatura del sistema.

4.2.3 Tetrametrina

La caracterización espectrométrica de la Tetrametrina en modo scan, bajo las diferentes condiciones experimentales resulta en la detección principalmente de cuatro iones característicos (Figuras 4.2.3.1 y 4.2.3.3). A bajas energías de impacto electrónico se registran principalmente los iones $[M+H]^+$ y $[2M+Na]^+$. Posteriormente, al ir aumentando la energía de impacto electrónico, también se hacen importantes el ión aducto $[M+Na]^+$ y el fragmento iónico $[164]^+$.

En todos los casos se observa una marcada predominancia en la abundancia del ión de relación $m/z=354$ correspondiente al aducto del ión molecular con Na $[M+Na]^+$, con relación a los demás iones. También a muy bajas energías de impacto electrónico y a 300°C , puede detectarse el ión $[349]^+$ correspondiente a $[M+NH_4]^+$. Este ión es prácticamente insignificante a 350°C , utilizando tanto MeOH como ACN, como componentes de la fase móvil.

Para todos los iones, la abundancia observada es mayor en presencia de MeOH, que utilizando ACN en la fase móvil (Figura 4.2.3.5 a y b). Esta diferencia es particularmente importante para los iones formados con Na, tanto para el ión $[2M+Na]^+$ como el $[M+Na]^+$, a las dos temperaturas de estudio (300 y 350°C).

En cuanto a la influencia de la temperatura (Figura 4.2.3.5 c y d), en la abundancia de los iones, no se observa demasiada diferencia, sobre todo en presencia de ACN en la fase móvil. Con MeOH, la diferencia se acentúa para los iones de Na, $[M+Na]^+$ y $[2M+Na]^+$, correspondiendo a la mayor temperatura, 350°C , los mayores valores de abundancia de iones.

Se realizó además un estudio comparativo en presencia y ausencia de MeOH como solvente en la preparación del estándar, observándose que en ausencia de MeOH los iones $[M+Na]^+$ y $[2M+Na]^+$ incrementan sus abundancias absolutas de manera significativa. Para los iones $[M+H]^+$ y el fragmento $[164]^+$, las diferencias no son significativas (Figuras 4.2.3.2 y 4.2.3.4).

El ión fragmento $[164]^+$ es el más importante en términos de abundancia con respecto a los iones hijo, y corresponde al carbocatión resultante de la separación de

la molécula del ácido, dejando la carga positiva sobre el resto N-metil-1-ciclohexeno-1,2-dicarboximida del alcohol. Las estructuras se muestran en la sección correspondiente al análisis computacional.

Con la fuente de ionización APCI en modo positivo, los principales iones detectados fueron el correspondiente al ion molecular protonado ($m/z=331$) y el ion resultante de la pérdida de una $m/z=17$, probablemente resultante de la pérdida de una molécula de OH a partir de la molécula original padre ($m/z=314$).

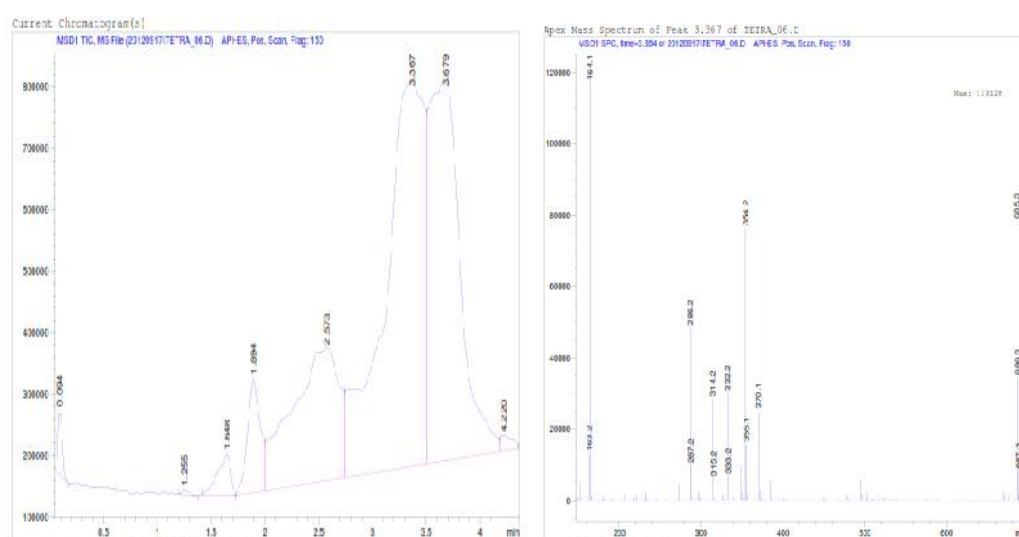


Figura 4.2.3.1: Cromatograma y Espectro de masas de la Tetrametrina, utilizando ACN en la fase móvil, con temperatura del gas de secado de 300°C y energía de impacto electrónico: 150 eV

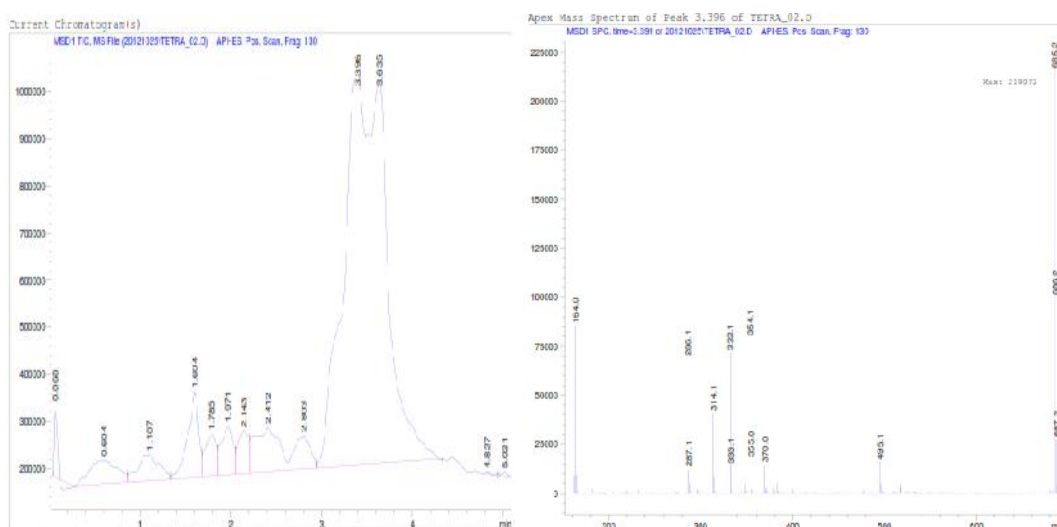


Figura 4.2.3.2: Cromatograma y Espectro de masas de la Tetrametrina, en ausencia de MeOH, utilizando ACN en la fase móvil, con temperatura del gas de secado de 300°C y energía de impacto electrónico: 130 eV.

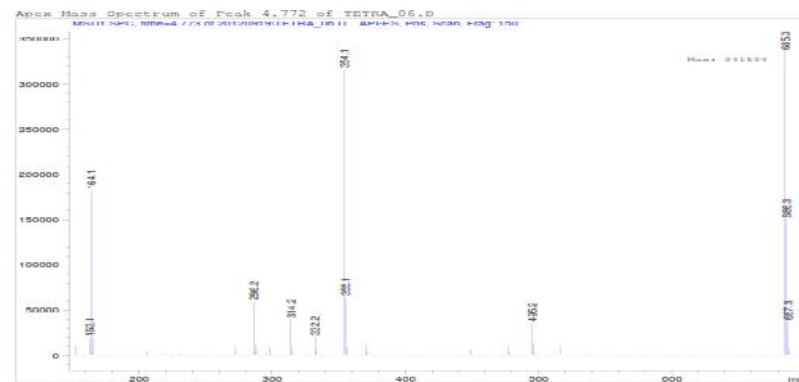
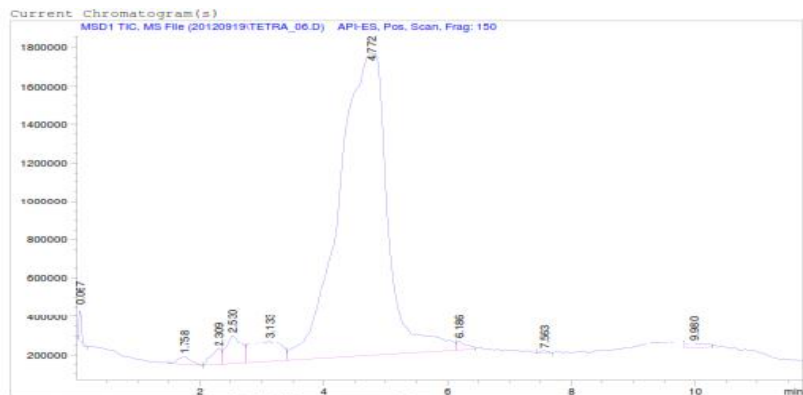


Figura 4.2.3.3: Cromatograma y Espectro de masas de la Tetrametrina, utilizando MeOH en la fase móvil, con temperatura del gas de secado de 350°C y Energía de impacto electrónico: 150 eV

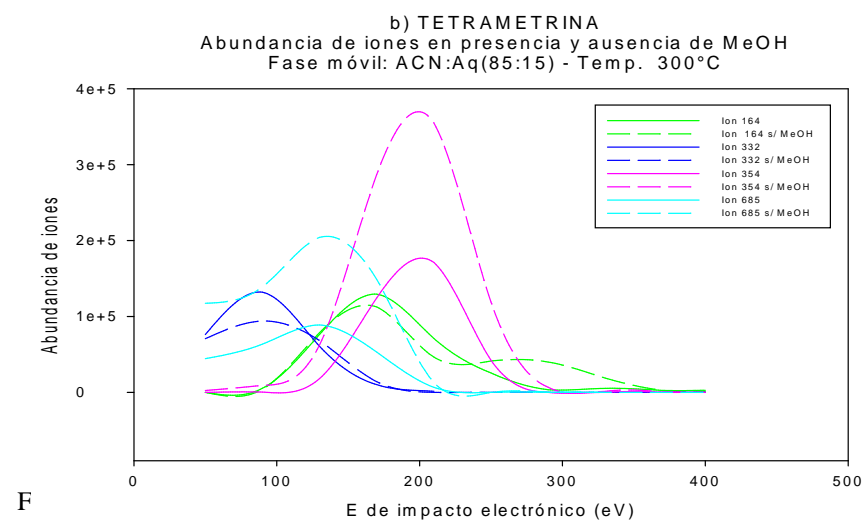
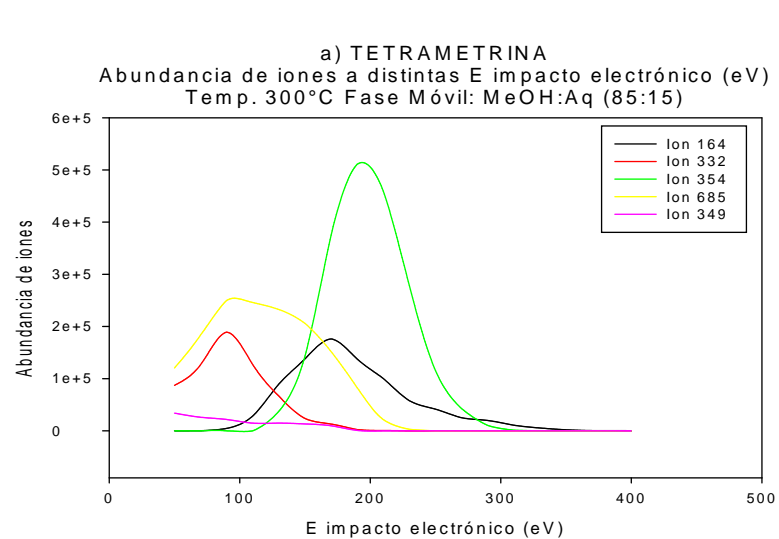


Figura 4.2.3.4: Dependencia de la población iónica frente a la energía de impacto electrónico, en ausencia y en presencia de MeOH.

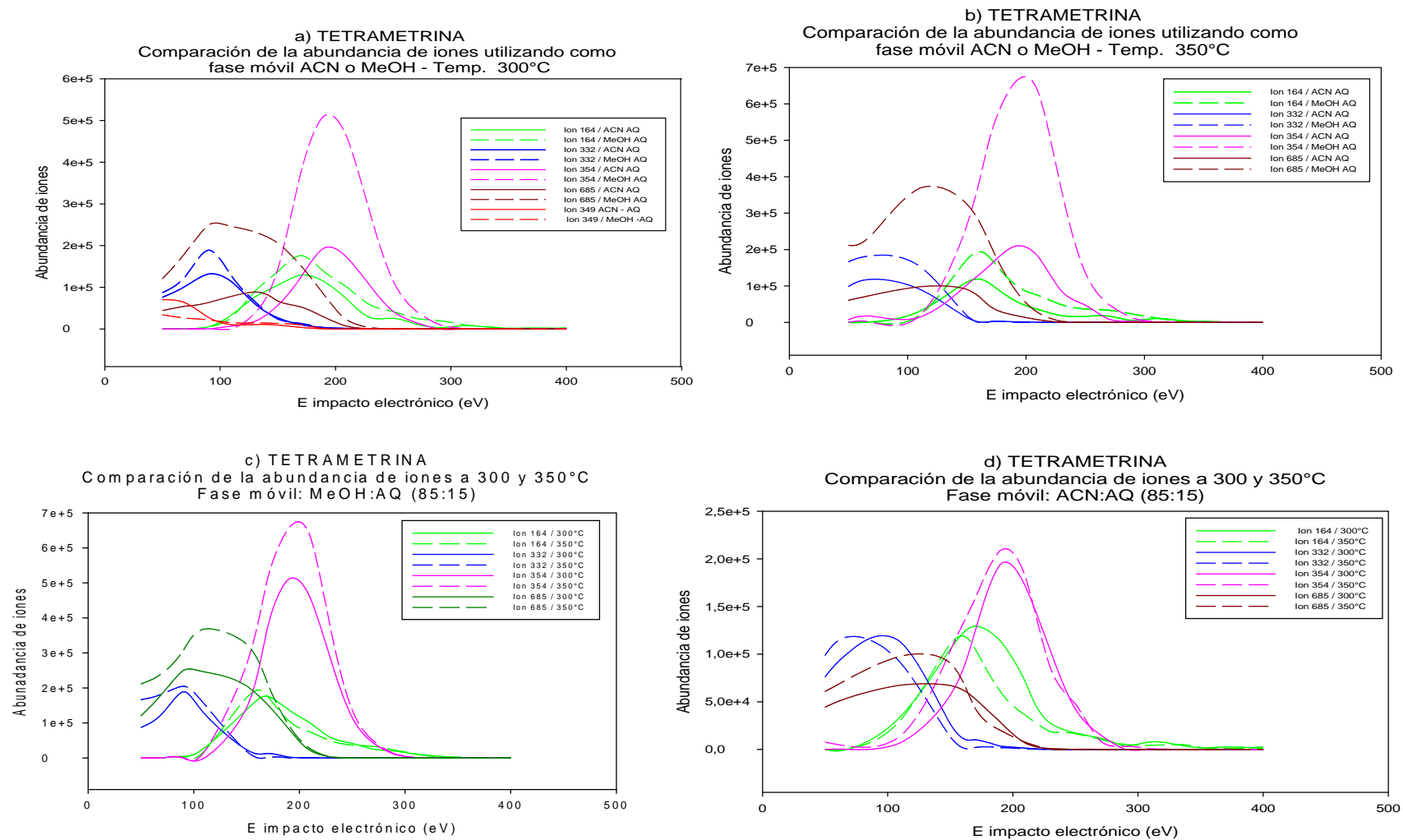


Figura 4.2.3.5: Comparación de la relación de la abundancia de iones con la energía de impacto electrónico, variando la composición de la fase móvil utilizada y la temperatura del sistema.

4.2.4 Fenotrina

Se observa que en todas las condiciones experimentales estudiadas, tres son los iones que se detectan de forma importante; el ión molecular protonado $[M+H]^+$, el aducto del ión molecular con el catión Na^+ $[M+Na]^+$ y el fragmento iónico $[183]^+$ (Figuras 4.2.4.1 y 4.2.42). En presencia de MeOH como componente de la fase móvil de la cromatografía y a $300^\circ C$, también se detecta, pero en menor abundancia al dímero del ión molecular formando un aducto con Na^+ $[2M+Na]^+$. A $350^\circ C$ este ión se muestra con muy baja abundancia.

Con MeOH como fase móvil, a bajas E impacto electrónico, el ión molecular protonado predomina en abundancia. Al ir aumentando la energía de ionización, los iones correspondientes al aducto con Na^+ y al fragmento $[183]^+$, se hacen más importantes en abundancia, pero en igual proporción que el ión $[M+H]^+$. Con ACN como componente de la fase móvil de la columna cromatográfica, los iones $[M+H]^+$ y $[183]^+$, son los predominantes en abundancia con relación al aducto con sodio. Con 90 eV de energía de impacto electrónico el ión protonado es el más importante, y a 150 eV el fragmento iónico es el más importante.

Por lo tanto, haciendo una comparación de la influencia del solvente en la fase móvil, existe una gran diferencia en la abundancia en que se presenta el ión $[M+Na]^+$; en presencia de MeOH este ion es mucho más importante de lo que se observa en presencia de ACN, lo que también se observa para el ión $[2M+Na]^+$ a $300^\circ C$. En la abundancia de los otros iones, el $[M+H]^+$ y $[183]^+$, no se observa una diferencia muy marcada por el solvente, siendo la tendencia de mayor abundancia con MeOH, tanto a 300 como a $350^\circ C$ (Figura 4.2.4.3 a y b).

Con respecto a la temperatura (Figura 4.2.4.3 c y d), prácticamente no se observan diferencias en la abundancia de ninguno de los iones considerados, excepto para el caso del dímero aducto con Na^+ $[2M+Na]^+$, que a $300^\circ C$ se observa con mayor abundancia que a $350^\circ C$.

Con la fuente de ionización APCI, los iones que se detectan mayoritariamente son coincidentes con los que se detectan con ESI positivo, excepto que no hay

formación del aducto $[M+Na]^+$. Es decir corresponden al ión molecular protonado $[M+H]^+$ y el fragmento $[183]^+$.

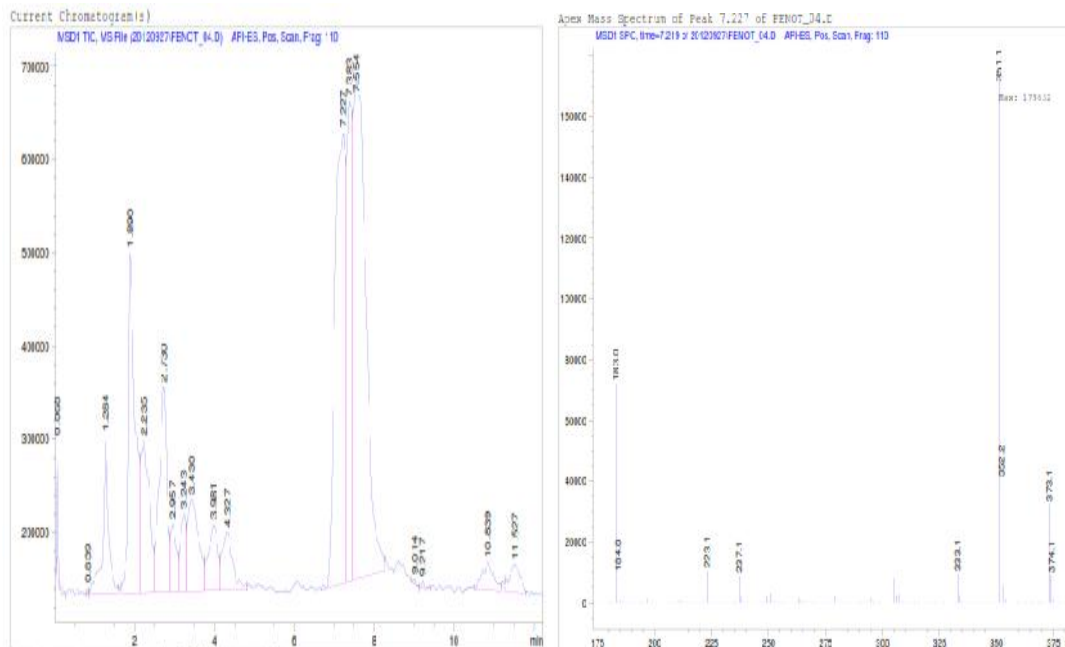


Figura 4.2.4.1: Cromatograma y Espectro de masas de la Fenoterina, utilizando ACN en la fase móvil, con temperatura del gas de secado de 300°C y energía de impacto electrónico: 110 eV

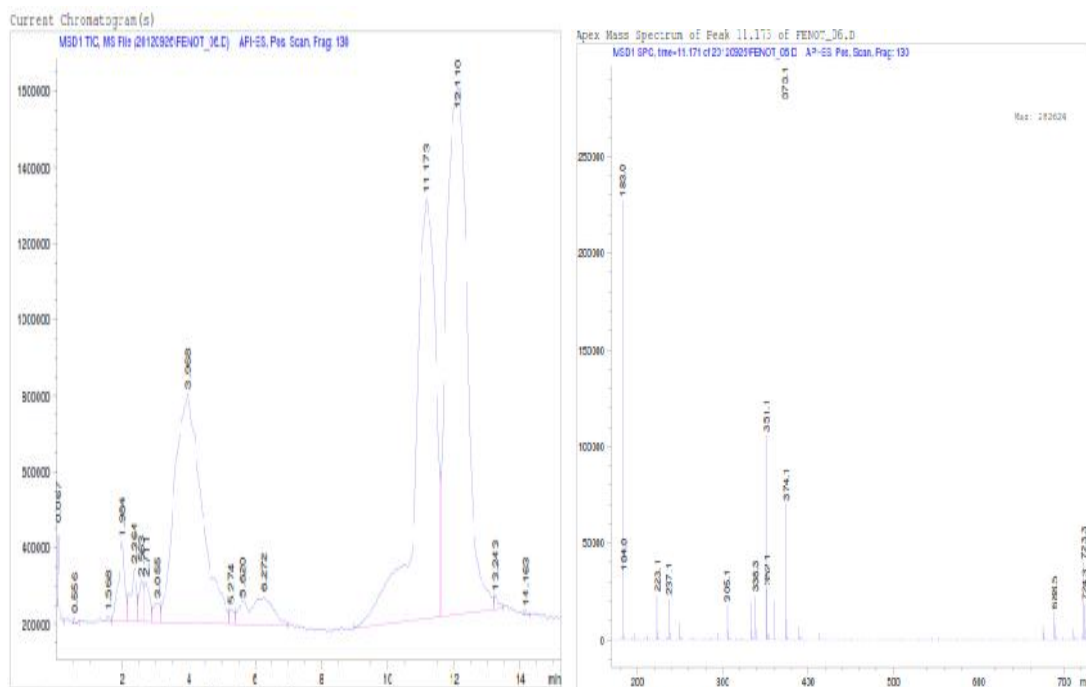


Figura 4.2.4.2: Cromatograma y Espectro de masas de la Fenoterina utilizando MeOH en la fase móvil, con temperatura del gas de secado de 300°C y energía de impacto electrónico: 130 eV

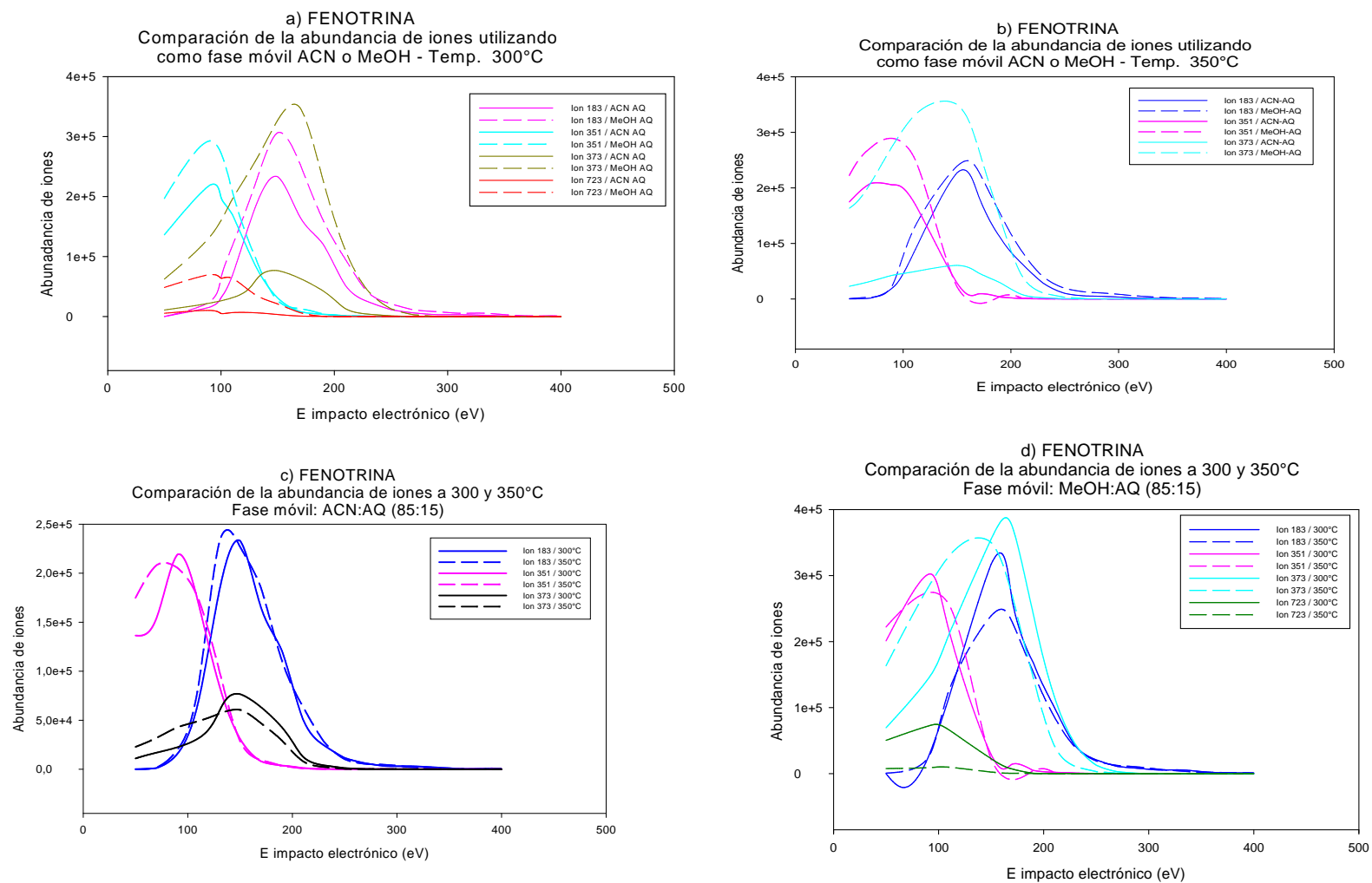


Figura 4.2.4.3: Comparación de la relación de la abundancia de iones con la energía de impacto electrónico, variando la composición de la fase móvil utilizada y la temperatura del sistema.

4.2.5 Alletrina

Los iones detectados con mayor importancia en las condiciones experimentales estudiadas son el ion molecular protonado $[M+H]^+$ ($m/z=303$), el aducto con Na^+ $[M+Na]^+$ ($m/z=325$) y los fragmentos iónicos $[169]^+$ ($m/z=169$), y $[123]^+$ ($m/z=123$). Según las condiciones de temperatura y solvente en la fase móvil, la abundancia de estos iones va variando.

Utilizando ACN como componente de la fase móvil (Figura 4.2.5.1), se observan con igual importancia en la abundancia, que de forma sucesiva con la energía de impacto electrónico, se presentan el ion $[M+H]^+$, $[169]^+$ y $[M+Na]^+$. El fragmento $[123]^+$ también es importante pero en menor medida en el mismo rango de energía de impacto electrónico en que se presenta el aducto $[M+Na]^+$. A $350^\circ C$ se observa que el ion $[M+H]^+$ es ligeramente más abundante que los demás iones, a bajas energías de impacto electrónico, y que el aducto $[M+Na]^+$ se presenta ligeramente disminuido con respecto al ensayo a $300^\circ C$. Para los fragmentos $[169]^+$ y $[123]^+$, no se observan diferencias muy significativas en la abundancia en que se presentan, a las temperaturas de ensayo.

Con MeOH como componente de la fase móvil del sistema cromatográfico (Figura 4.2.5.2), además de los iones ya mencionados, también se observa la formación del dímero aducto con Na^+ $[2M+Na]^+$ ($m/z=627$), siendo más importante en abundancia a $300^\circ C$, mientras que a $350^\circ C$ su abundancia es prácticamente insignificante. Este efecto de la temperatura también es observado para el ión $[M+Na]^+$, que a $300^\circ C$ predomina de forma muy importante en abundancia, con respecto a los demás iones, disminuyendo notoriamente su abundancia a $350^\circ C$. Sin embargo, los fragmentos iónicos considerados, $[169]^+$ y $[123]^+$, y el ión $[M+H]^+$ aumentan ligeramente en abundancia a $350^\circ C$. El efecto de la temperatura sobre la abundancia iónica puede observarse en la Figura 4.2.5.5 c y d.

Considerando la influencia de los dos solventes utilizados en la composición de la fase móvil del sistema cromatográfico (Figura 4.2.5.3 a y b), se observa que en presencia de MeOH la abundancia de todos los iones considerados se incrementa notoriamente con respecto a lo que se observa con ACN. Este efecto se observa tanto

a 300 como a 350°C, siendo de particular importancia la gran diferencia observada en la abundancia del ion $[M+Na]^+$, que a 300°C en presencia de MeOH se incrementa notablemente con respecto a la abundancia observada con ACN.

Con la fuente APCI, el ion detectado con mayor abundancia es el $[303]^+$, aunque también se presentan algunos iones de fragmentación, sus abundancias están muy por debajo del ión molecular protonado.

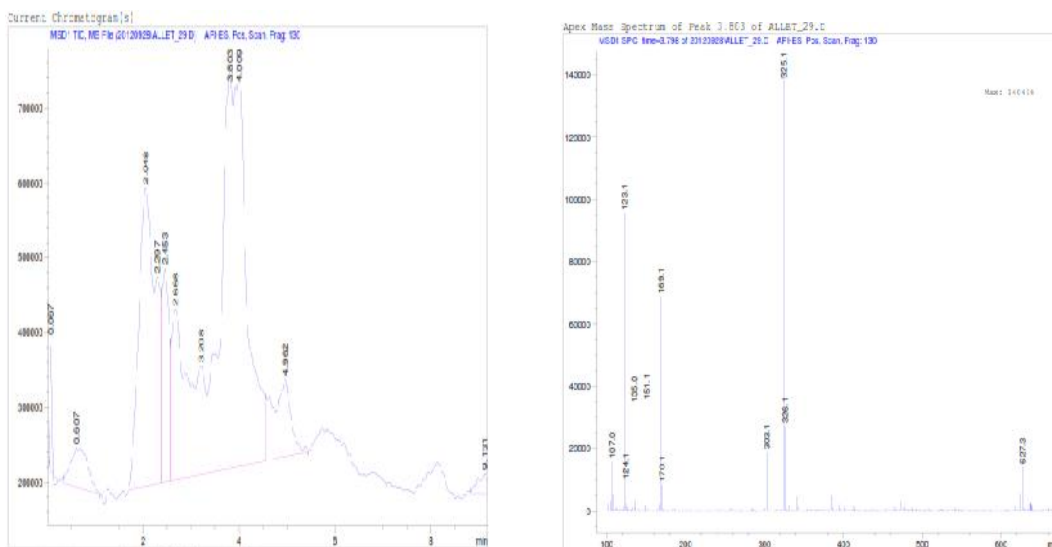


Figura 4.2.5.1: Cromatograma y Espectro de masas de la Alletrina, utilizando ACN en la fase móvil, con temperatura del gas de secado de 300°C y Energía de impacto electrónico: 130 eV

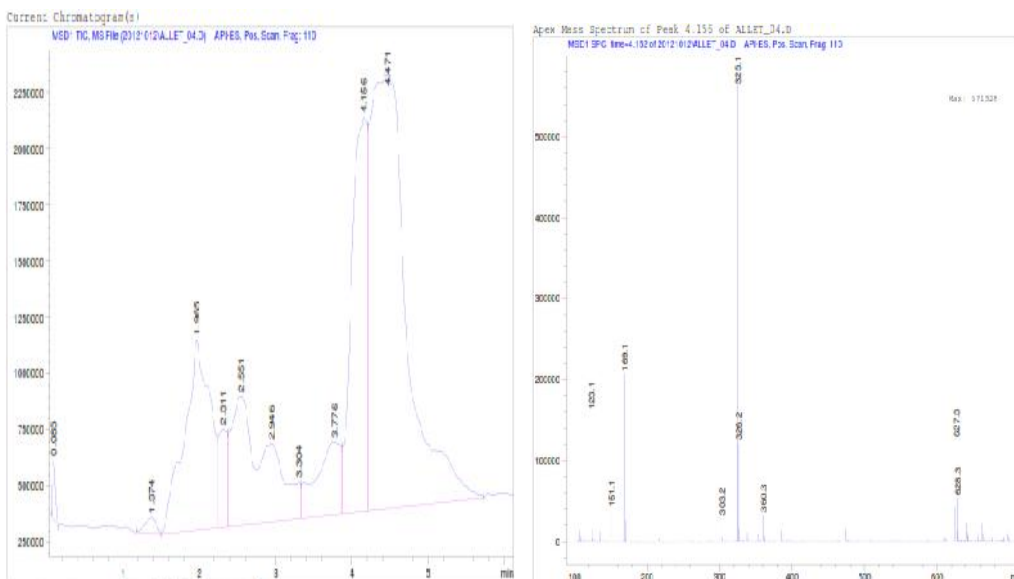


Figura 4.2.5.2: Cromatograma y Espectro de masas de la Alletrina utilizando MeOH en la fase móvil, con temperatura del gas de secado de 300°C y Energía de impacto electrónico: 130 eV

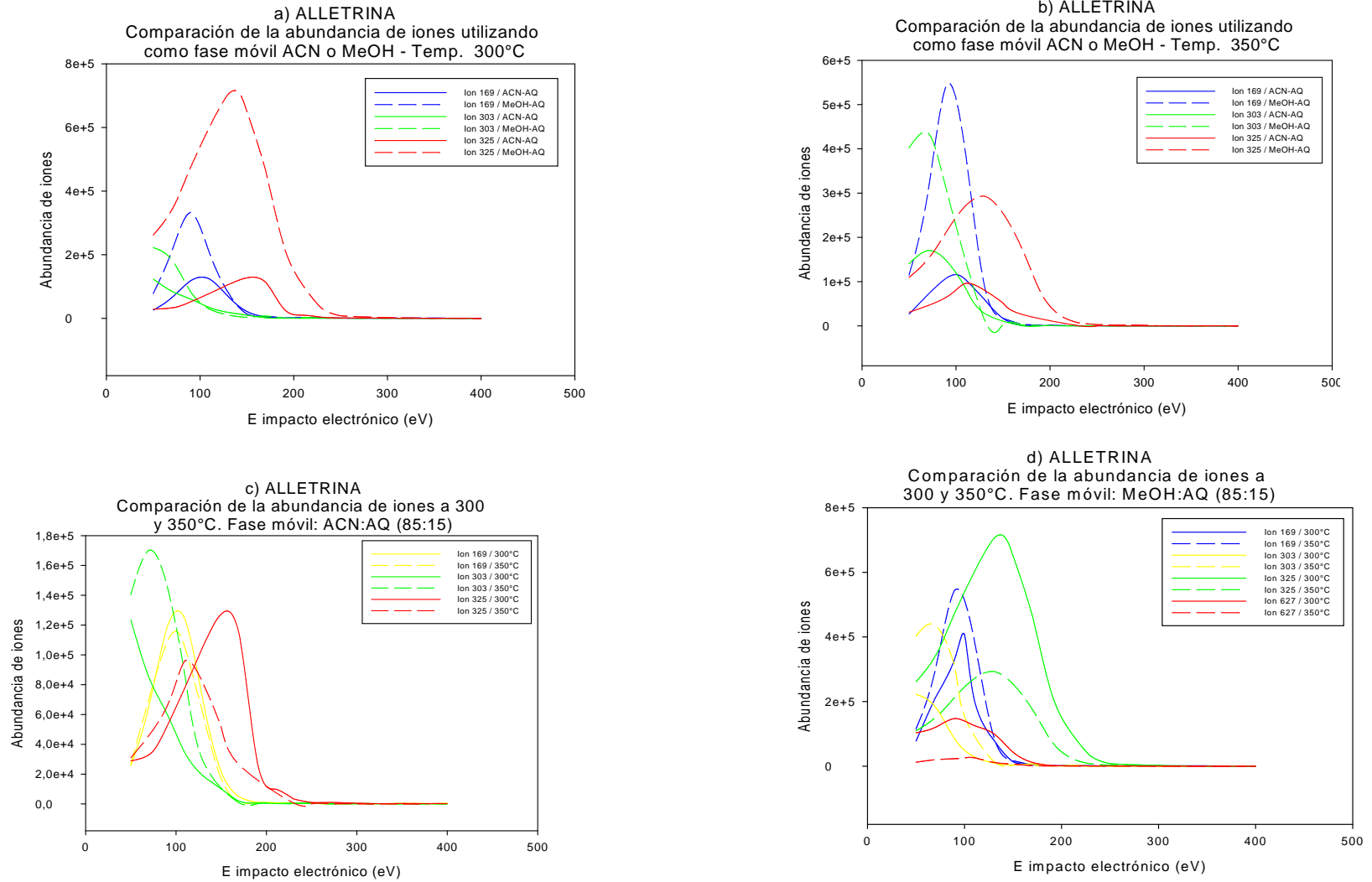


Figura 4.2.5.3: Comparación de la relación de la abundancia de iones con la energía de impacto electrónico, variando la composición de la fase móvil utilizada y la temperatura del sistema.

4.2.6 Lambda Cialotrina

El comportamiento ante el estudio por espectrometría de masas de la molécula de Lambda Cialotrina es muy similar al observado para la Cipermetrina. Lo cual es de esperarse debido a la similitud estructural de ambas moléculas.

Utilizando ACN como componente principal de la fase móvil del sistema cromatográfico (Figura 4.2.6.1), se observa la predominancia, en cuanto a abundancia en la población de iones, de dos iones característicos que corresponden a la relación m/z de 482 y 240. Estos iones serían los correspondientes a los aductos que se forman entre el ión molecular protonado y el fragmento iónico de $m/z=208$, respectivamente, con una molécula del solvente MeOH, utilizado como disolvente en la disolución del estándar. Estos dos iones se forman a energías de impacto electrónico por debajo de 250 eV, por encima de esta energía los fragmentos iónicos que se forman son numerosos y difíciles de identificar.

En cuanto a la influencia que podría ejercer la temperatura del gas de secado en la población iónica, bajo estas condiciones experimentales, no se observa que haya diferencia en la abundancia de los dos iones bajo observación, a las dos temperaturas utilizadas para el ensayo (300 y 350°).

Con la utilización de MeOH en la fase móvil del sistema cromatográfico (Figura 4.2.6.3 a), además de los iones correspondientes a los $m/z=240$ y $m/z=482$, también se forman otros iones secundarios correspondientes al ion molecular protonado ($m/z=450$) y a los aductos entre el ión molecular y los cationes Na^+ ($m/z=472$) y NH_4^+ ($m/z=467$). Sin embargo, estos iones se encuentran en abundancia muy baja con respecto a los iones 240 y 482, excepto el correspondiente al aducto con Na^+ , que se presenta con una abundancia importante similar a los iones 240 y 482. La temperatura del gas de secado ejerce influencia en la abundancia en que se presentan los principales iones, es decir los correspondientes al $m/z=482$, $m/z=240$ y $m/z=472$, presentándose estos con mayor abundancia a 350°C. Los otros iones secundarios no presentaron diferencias significativas en su abundancia con respecto a la variación de la temperatura del gas de secado (Figura 4.2.6.4 c y d).

El solvente utilizado en la fase móvil del sistema cromatográfico tiene una clara influencia en las poblaciones iónicas, observándose que en presencia de ACN la abundancia de los iones que se han considerado, se presentan en mayor cantidad que en presencia de MeOH, esto se observa tanto a 300 como a 350°C (Figura 4.2.6.4 a y b).

Suprimiendo el MeOH como disolvente en la preparación de la solución del estándar de la Lambda Cialotrina (Figura 4.2.6.2 y Figura 4.2.6.3 b), se observa que el ión más importante en cuanto a abundancia corresponde al aducto entre el ion molecular y el catión NH_4^+ , de relación $m/z=467$. También se presentan otros iones, pero con mucha menor abundancia, entre ellos el aducto del ion molecular con Na^+ y el fragmento iónico 225, que corresponde probablemente al fragmento ácido, resultante de la escisión del enlace éster. En el espectro de masas el ión 225 se observa con el fragmento $m/z=227$, que corresponde la abundancia de la molécula que tiene el isótopo ^{37}Cl , por lo que se verifica que el ión corresponde a esta porción de la molécula. Con respecto a la influencia de la temperatura, la abundancia de los iones es ligeramente mayor a 300°C.

Con la fuente APCI, al igual que con la Cipermetrina, la formación de iones características se fuerza a obtenerla con el agregado del NH_4^+ , con lo que los iones más importantes en cuanto a la abundancia que aparecen en el espectro corresponden al aducto del ión molecular unido al ión NH_4^+ $[449 + 18]^+$ y al fragmento $[213]^+$. Este ultimo ión corresponde a la escisión del enlace éster de la molécula y a la pérdida grupo CN del fragmento correspondiente al alcohol aromático.

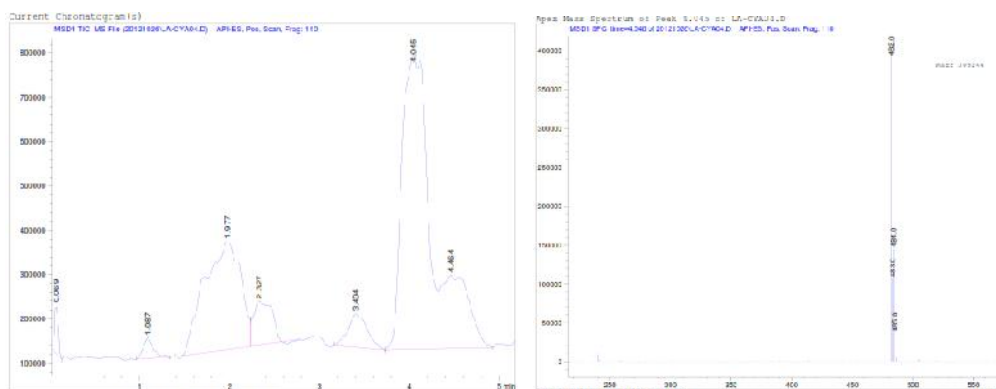


Figura 4.2.6.1: Cromatograma y Espectro de masas de la Lambda Cialotrina, utilizando ACN en la fase móvil, con temperatura del gas de secado de 300°C y energía de impacto electrónico: 110 eV

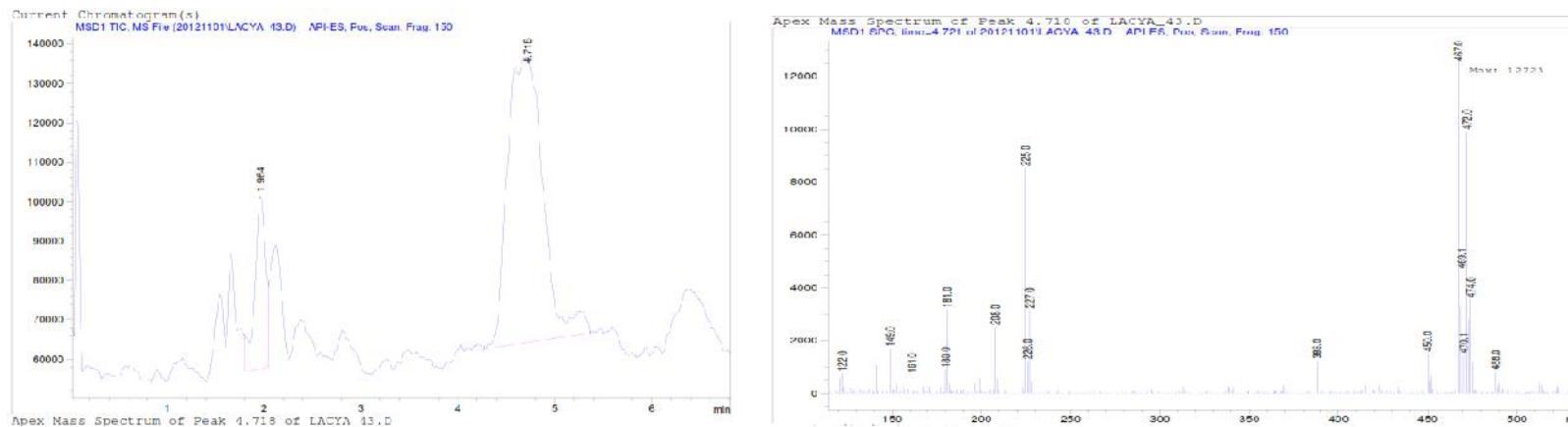


Figura 4.2.6.2: Cromatograma y Espectro de masas de la Lambda Cialotrina, en ausencia de MeOH, utilizando ACN en la fase móvil, con temperatura del gas de secado de 300°C y energía de impacto electrónico: 150 eV

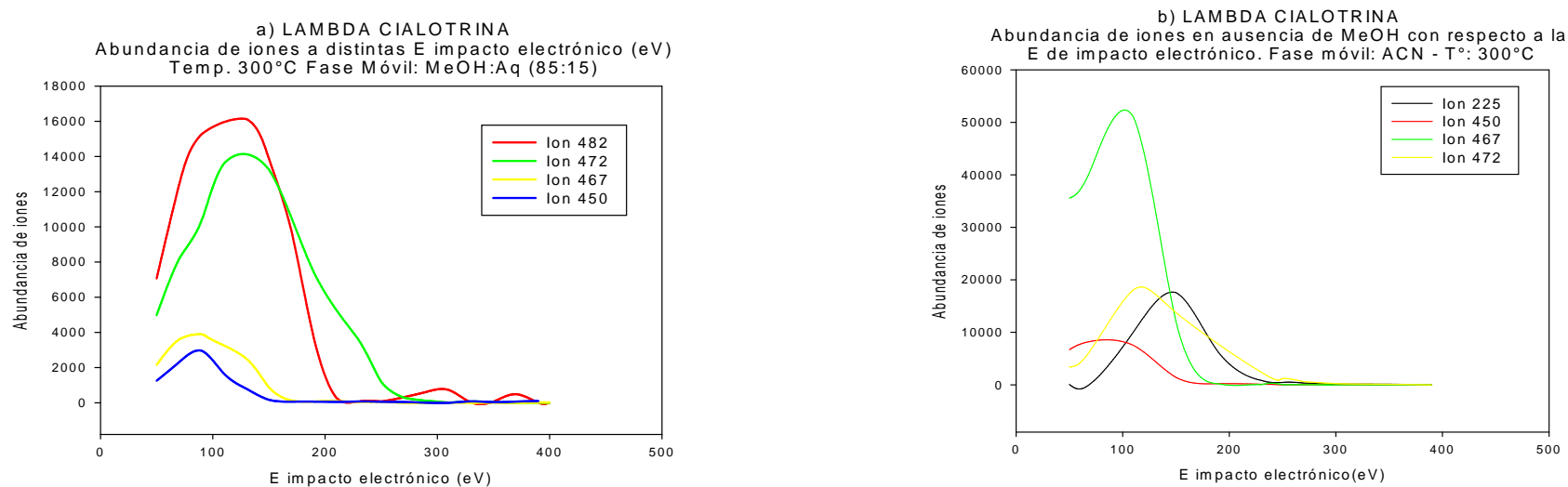


Figura 4.2.6.3: Dependencia de la población iónica frente a la energía de impacto electrónico, en presencia y en ausencia de MeOH.

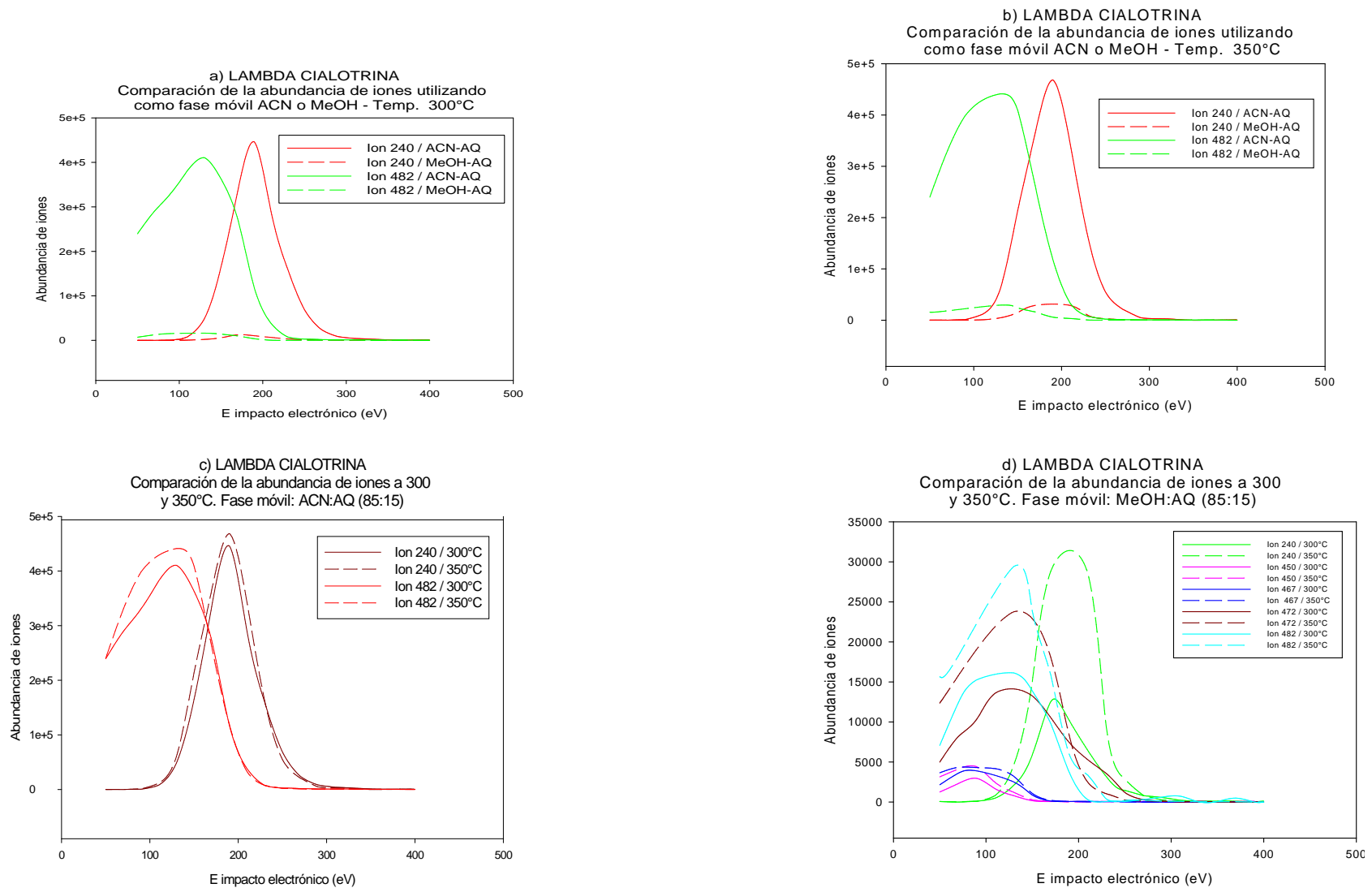


Figura 4.2.6.4: Comparación de la relación de la abundancia de iones con la energía de impacto electrónico, variando la composición de la fase móvil utilizada y la temperatura del sistema.

4.2.7 Optimización del método analítico

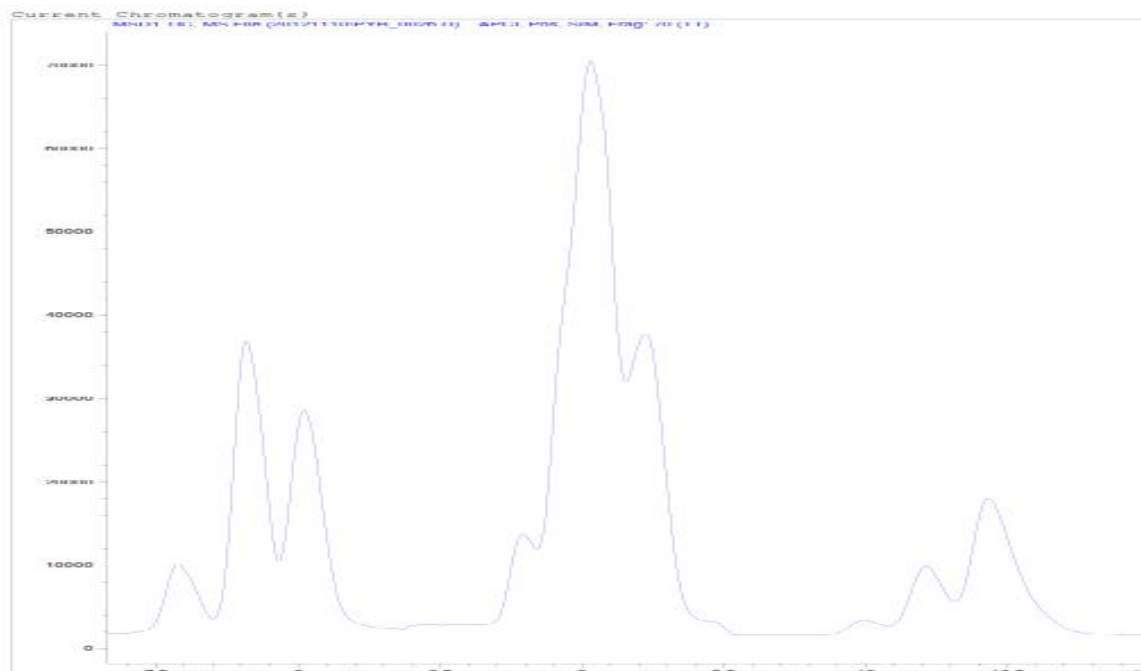
Para la optimización del método analítico, se realizaron determinaciones en modo SIM, ajustando los tiempos de detección de cada ión, pudiéndose identificar tres grupos de intervalos de tiempo, correspondientes a la elución en el cromatograma de dos compuestos en cada uno de los grupos. Se realizaron lecturas de mezclas conteniendo diversas concentraciones, desde concentraciones correspondientes a 10 ppm de cada componente en la mezcla hasta 0,1 ppm.

Con la fuente de ionización APCI (Figura 4.2.7.1 a), utilizando la fase móvil ternaria MeOH: H₂O/CH₃COOH: H₂O/AcNH₄⁺ en gradiente, para todos los rangos de concentración se obtuvo una muy buena detección para la Tetrametrina y la Alletrina, que se monitorearon en el primer grupo en el intervalo de tiempo de 6 a 8,4 minutos. También para la Fenotrina se obtuvo una buena detección del estándar, aun en las concentraciones más bajas que fueron estudiadas. Esta molécula se monitoreó en el tercer grupo a un intervalo de tiempo de 9,5 a 10,8 minutos, junto con la molécula de Permetrina. Sin embargo, para este último compuesto, a la concentración más baja de estudio, 0,1 ppm, se logró una detección muy pobre. En el grupo 2, a un intervalo de tiempo de 8,5 a 9,5 minutos se estudió a la Cipermetrina y a la Lambda Cialotrina. Para estos compuestos la detección también fue bastante pobre, aún a las concentraciones más altas.

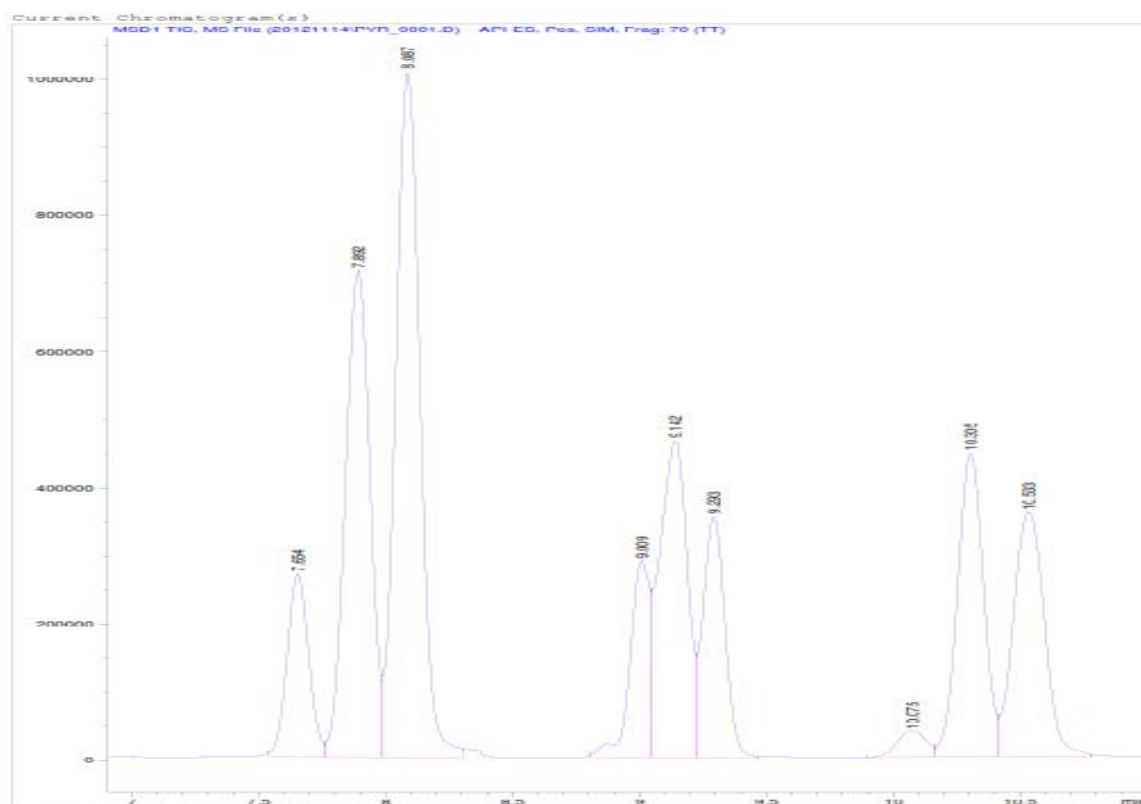
Con la fuente ESI, se obtuvo que utilizando como fase móvil la mezcla ternaria en gradiente de concentración, constituida por MeOH: H₂O/ CH₃COOH: H₂O/AcNH₄⁺, se obtuvieron mejores separaciones cromatográficas de la mezcla de los 6 piretroides estudiados (Figura 4.2.7.1 b). Además se lograron también mejores detecciones de cada uno de los iones detectados en el modo SIM del espectrómetro de masas, aún las más bajas concentraciones de mezcla consideradas en el estudio (10 ng/ml). Esta comparación hecha, considerando los resultados obtenidos con la fuente de ionización APCI.

La Lambda Cialotrina y la Permetrina, son los piretroides para los que se obtuvo la detección más pobre, lográndose una buena determinación de sus iones característicos hasta una concentración de la mezcla de 1 mg/ml. Los valores de

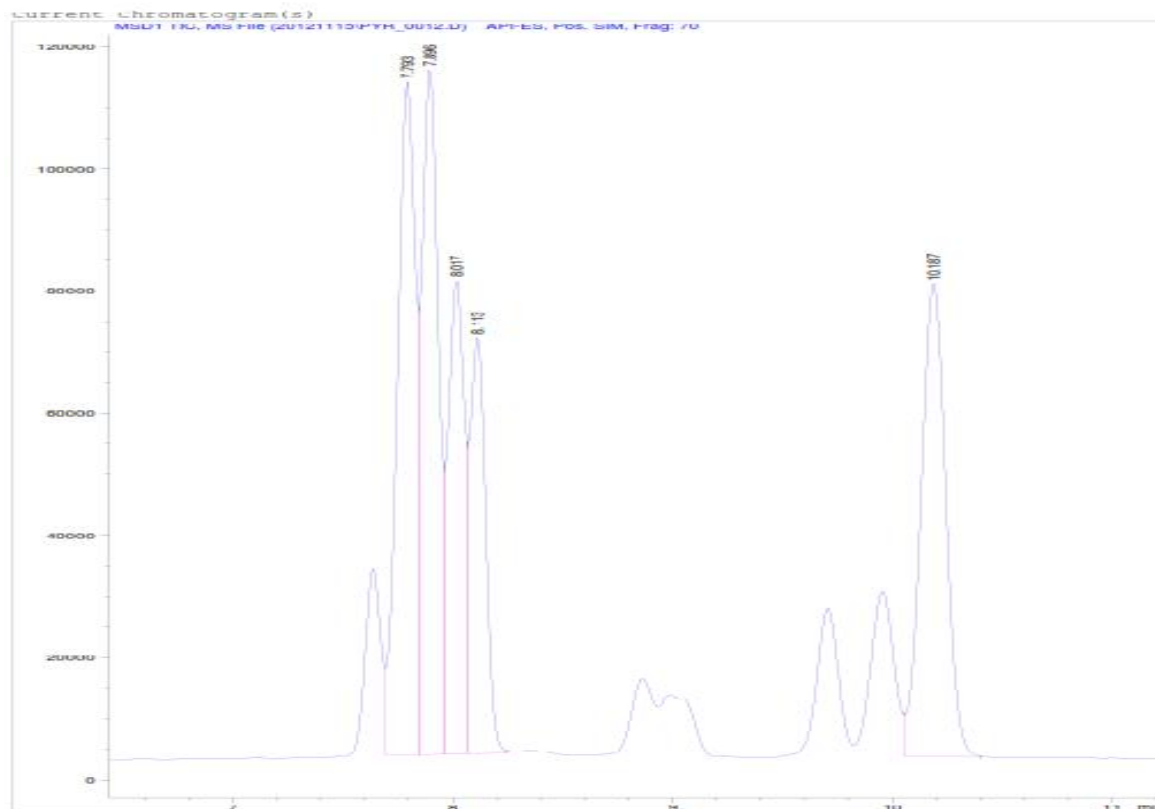
detección en esta concentración, con la fuente ESI, fueron comparables a los valores obtenidos con la fuente APCI de esta misma concentración.



a) Fuente APCI, Concentración 10 ppm



b) Fuente ESI, concentración 10 ppm



c) Fuente ESI, en ausencia de MeOH, concentración 1 ppm

Figura 4.2.7.1: Cromatograma característico de la mezcla de los 6 piretroides considerados en el estudio: a) Fuente APCI, Concentración 10 ppm; b) Fuente ESI, concentración 10 ppm; c) Fuente ESI, en ausencia de MeOH, concentración 1 ppm

4.3 Estudio QSAR – QSPR de moléculas de la familia de los piretroides

4.3.1 Energía y estabilidad molecular

4.3.1.1. Energía de los orbitales

A partir de las geometrías optimizadas de cada una de las moléculas de piretroides consideradas en sus formas neutras, empleando el nivel de teoría B3LYP y el conjunto de bases 6-31G (dp), se obtuvieron los valores de las energías correspondiente al orbital molecular más alto ocupado con electrones (HOMO) y al orbital molecular más bajo desocupado (LUMO) y de estos valores, la diferencia de energía HOMO-LUMO.

En la Tabla 4.3.1.1 se listan los resultados correspondientes a las energías de los orbitales moleculares y su diferencia, para cada una de las moléculas de piretroide en estudio.

Las energías E_{HOMO} y E_{LUMO} son consideradas descriptoras de carga en estudios QSAR – QSPR, y están asociadas a la reactividad de un compuesto. La E_{HOMO} indica la susceptibilidad de una molécula hacia el ataque por electrófilos, mientras que la E_{LUMO} expresa la tendencia de la molécula a ser atacada por nucleófilos. Así para nucleófilos fuertes la E_{HOMO} es baja mientras que para nucleófilos suaves es alta, por otra parte la E_{LUMO} para electrófilos fuertes es alta y para suaves es baja.

La diferencia de energías HOMO – LUMO ($E_{\text{H-L}}$) está relacionada con la estabilidad química de los compuestos, de tal manera que una alta diferencia energética indica una mayor estabilidad de un compuesto hacia una reacción química, especialmente al tratarse de reacciones radicalarias (Duchowicz, 2005).

Tabla 4.3.1.1: Energías HOMO, LUMO y $E_{\text{H-L}}$ de las estructuras de los piretroides en sus formas neutras, optimizadas con un nivel de teoría B3LYP /6-31G (d,p)

Molécula	E_{HOMO} kcal/mol	E_{LUMO} kcal/mol	$E_{\text{H-L}}$ kcal/mol
Cipermetrina	-143,8691	-22,9355	-120,9336
Permetrina	-139,9032	-13,2969	-126,6063
Tetrametrina	-137,2740	-54,6561	-82,6179
Fenotrina	-136,5335	-8,3710	-128,1625
Alletrina	-141,7110	-32,3920	-109,3184
L-Cialotrina	-145,9462	-24,5984	-121,3478

4.3.1.2 Potenciales de Ionización

El potencial de ionización es definido como la cantidad de energía requerida para remover un electrón de la molécula, calculada como la diferencia de energía entre el catión y la molécula neutra. Esto es:

$$PI [M] = E[M^{\bullet+}] - E[M] \quad (4.1)$$

donde:

PI [M] representa el potencial de ionización de la molécula [M],

E [M^{•+}] es la energía electrónica del catión radical [M^{•+}] y,

E [M] es la energía electrónica de la molécula neutra [M].

La energía de cada una de las moléculas (neutra e iónica) es obtenida a partir de los cálculos llevados a cabo con el funcional híbrido B3LYP y el conjunto de base 6-31G (d,p). La energía electrónica obtenida es corregida con el valor de la energía del punto cero (ZPE), dato también obtenido del cálculo teórico llevado a cabo, y que considera los efectos de la vibración molecular que persisten aun a 0 K. A su vez los valores de la ZPE son escalados con un factor correspondiente al nivel de cálculo utilizado (factor de escala: 0,9804), de tal manera a eliminar los errores sistemáticos conocidos (Foresman et al., 1996).

Los resultados del PI [M] y de las E [M^{•+}] y E [M] se presentan en la Tabla 4.3.1.2

Tabla 4.3.1.2: Energías electrónicas de las estructuras de los piretroides, optimizadas con el nivel de teoría B3LYP/6-31G (d,p), en sus formas neutras y de catión radical, y potencial de ionización resultante para cada molécula

Molécula	E[M ^{•+}] kcal/mol	E[M] kcal/mol	PI [M] kcal/mol
Cipermetrina	-1286353,774	-1286525,815	172,041
Permetrina	-1228482,115	-1228649,754	167,639
Tetrametrina	-686562,178	-686727,357	165,178
Fenotrina	-700987,325	-701149,412	162,087
Alletrina	-605334,513	-605504,982	170,469
L-Cialotrina	-1209434,550	-1209609,528	174,978

4.3.1.3 Afinidad Protónica

La afinidad protónica es definida como la energía liberada cuando un protón es agregado a un sistema, calculando la diferencia de energía entre el sistema de interés y la misma molécula con un protón adicional. Esto es:

$$AP [M] = E [M] - E [M+H]^+ \quad (4.2)$$

donde:

AP [M] es la afinidad protónica de [M].

E [M] es la energía electrónica de la molécula neutra [M], y

E [M+H]⁺ es la energía electrónica de la molécula protonada [M+H]⁺.

De la misma manera que en el cálculo del PI [M], la energía de cada una de las moléculas (neutra e iónica) se obtiene a partir de los cálculos llevados a cabo con el funcional híbrido B3LYP y el conjunto de base 6-31G (d,p), realizando la respectiva corrección con el valor de ZPE, que a su vez fue escalado con el factor 0,9804, correspondiente al nivel de teoría utilizado en los cálculos (Foresman, et. al., 1996).

Los resultados de la AP [M] y de las E [M] y E [M+H]⁺ se presentan en la Tabla 4.3.1.3

Tabla 4.3.1.3: Energías electrónicas de las estructuras de los piretroides, optimizadas con el nivel de teoría B3LYP/6-31G (d,p), en sus formas neutras y protonadas, y potencial de ionización resultante para cada molécula.

Molécula	E [M] kcal/mol	E [M+H] ⁺ kcal/mol	AP [M] kcal/mol
Cipermetrina	-1286525,815	-1286667,678	141,861
Permetrina	-1228649,754	-1228806,520	156,765
Tetrametrina	-686727,357	-686887,825	160,468
Fenotrina	-701149,412	-701301,447	152,035
Alletrina	-605504,982	-605648,407	143,425
L-Cialotrina	-1209609,528	-1209748,459	138,931

4.3.2 Relación entre la energética molecular y resultados experimentales de espectrometría de masas

Para un conjunto de hormonas esteroideas, Marino (2009) estableció la distribución de iones formados en la cámara del espectrómetro de masas como variables descriptivas de distintas propiedades, biológicas o fisicoquímicas, al contener información energética como estructural de las moléculas. De esta manera el autor describe a la distribución de iones en el espectrómetro de masas, como un descriptor molecular empírico, cuya formación mantiene una relación estrecha con propiedades intrínsecas de las moléculas (Marino, 2009).

De igual forma, en este trabajo se intenta correlacionar propiedades energéticas y biológicas de las moléculas de piretroides, de las que se tiene información a partir del modelado teórico molecular obtenido a través de cálculos computacionales llevados a cabo, con la distribución de los distintos iones que tiene lugar en la cámara de ionización del espectrómetro de masas.

Para realizar esta evaluación se determina la correlación existente entre las características energéticas de las moléculas de los piretroides, incluyendo la diferencia energética de los orbitales HOMO – LUMO (E_{H-L}), el potencial de ionización de las moléculas (PI [M]) y la afinidad protónica (AP [M]) con la distribución de las especies iónicas que se da en la cámara de ionización del espectrómetro de masas.

Los posibles iones que pueden formarse en el proceso de ionización del espectrómetro de masas de presentan en la Tabla 4.3.2.1.

Tabla 4.3.2.1: Probables iones a ser detectados en el espectrómetro de masas

Molécula	MM	$[M+H+32]^+$	$[M+H]^+$	$[M+Na]^+$	$[M+NH_4]^+$	$[2M+Na]^+$	$[Frag.]^+$
Cip	415	448	416*	438	433	853*	240 / 181**
Per	390	423*	391*	413	408	803	183
Tet	331	364*	332	354	349	685	164
Fen	350	383*	351	373	368*	723	183
All	302	335*	303	325	320*	627	169-123
LCia	449	482	450	472	467	921*	240 / 225**

(MM: Masa molar de la molécula neutra; $[M+H+32]^+$: aducto de la forma protonada de la molécula con una molécula de MeOH; $[M+H]^+$ molécula protonada; $[M+Na]^+$: aducto de la molécula neutra con el ion Na^+ ; $[M+NH_4]^+$: aducto de la molécula neutra con el ion NH_4^+ ; $[2M+Na]^+$: aducto de la forma dimérica de la molécula con el ion Na^+ ; $[Frag.]^+$: principal/es fragmento/s observado/s en intensidad para la molécula considerada. Cip: Cipermetrina; Per: Permetrina; Tet: Tetrametrina; Fen: Fenotrina; All: Alletrina; L Cia: Lambda Cialotrina; * No se observa la formación de estos iones para la molécula considerada; ** Principales fragmentos iónicos formados en presencia y en ausencia de MeOH, respectivamente)

Para el estudio de correlación, se planteó una distribución iónica expresada en porcentaje, de las distintas especies moleculares que se forman o que podrían formarse en la cámara de ionización del espectrómetro de masas con las siguientes condiciones experimentales: fase móvil ACN: Ac. Fórmico 0,5% en Agua en

proporción 85:15, energía de ionización 150 eV, modo Scan positivo, Temperatura del gas de secado 300°C, Fuente: ESI.

El balance iónico se obtuvo expresando la intensidad absoluta de cada especie molecular iónica considerada, en porcentaje, con respecto a la suma total de las formas iónicas que se presentan en las condiciones experimentales detalladas previamente.

La distribución en porcentaje de las especies iónicas que han sido detectadas en el espectrómetro de masas para cada molécula de piretroide estudiada experimentalmente, se muestra en la Tabla 4.3.2.2.

Tabla 4.3.2.2: Distribución iónica en porcentaje (%) con respecto al total de iones formados en el espectrómetro de masas

Molécula	$[M+H]^+$	$[M+Na]^+$	$[M+NH_4]^+$	$[2M+Na]^+$	$[Frag.]^+$
	<i>Intensidad iónica en %</i>				
Cipermetrina	0,0	75,3	16,5	0,0	8,2
Permetrina	0,0	36,4	0,3	0,0	63,3
Tetrametrina	8,1	31,1	0,0	38,7	22,1
Fenotrina	9,1	22,5	0,0	0,0	68,4
Alletrina	4,3	55,0	0,0	0,0	40,7
L-Cialotrina	4,1	39,6	34,6	0,0	21,7

La correlación entre los parámetros energéticos y la distribución de los iones formados en el espectrómetro de masas, se llevó a cabo mediante un análisis de regresión lineal multivariable, en donde el porcentaje de distribución de los iones corresponde a las variables descriptivas. Esto, con el fin de fortalecer la hipótesis de que los iones formados en la cámara se relacionan tanto con la energía de la molécula como con la estructura (Marino, 2009).

El mejor modelo de correlación, se obtiene comparando los resultados de la correlación lineal de los parámetros energéticos dependientes, con cada una de las variables independientes (descriptores), y con todas las combinaciones posibles de las mismas. La elección del mejor modelo se realiza según el valor más óptimo del coeficiente de correlación ajustado para cada operación posible. Los cálculos se llevaron a cabo con la planilla electrónica de Microsoft Office Excel 2007.

A continuación se presentan los mejores modelos obtenidos para cada una de las variables dependientes, junto con los valores de los parámetros estadísticos correspondientes:

$$1) \quad E_{H-L} = -40,425201 - 0,657005479x[M+Na]^+ - 1,044658145x[M+NH_4]^+ - 0,989234657x[Frag.]^+ \\ r=0,9566 \quad S=7,8876 \quad F=7,1781$$

$$2) \quad PI[M] = 164,7204899 - 0,270483857x[M+H]^+ + 0,077212441x[M+Na]^+ + 0,212572647x[M+NH_4]^+ \\ r=0,9264 \quad S=2,8037 \quad F=4,0382$$

$$3) \quad AP[M] = 171,449696 - 1,18901917x[M+H]^+ - 0,40052763x[M+Na]^+ + 0,28697076x[2M+Na]^+ \\ r=0,9976 \quad S=1,1358 \quad F=68,0862$$

Para la correlación entre la brecha energética HOMO – LUMO (E_{H-L}), la dependencia que se observa es principalmente con respecto a la capacidad de formación de aductos con los iones Na^+ y NH_4^+ , y también con respecto a la capacidad de fragmentación de la molécula que tiene lugar en las condiciones estudiadas. En cambio para el modelado de los valores de PI [M] y AP [M], intervienen principalmente la capacidad de protonación y de formación de aductos con el ión Na^+ , tanto de la forma $[M+Na]^+$, como la especie dimérica $[2M+Na]^+$.

Al aplicar estos modelos de predicción de cada parámetro energético (variables dependientes) con respecto a la distribución porcentual de las especies iónicas que se presentan en el espectrómetro de masas experimentalmente, los valores residuales que se presentan para cada parámetro son mínimos, como puede verse en la Tabla 4.3.2.3. Este cálculo es útil como estimativo de la validez del modelo teórico propuesto. Sin embargo, la validación del modelo de predicción debe ser realizada con un conjunto de moléculas estructuralmente similares a las utilizadas como conjunto de prueba, pero diferente, y es lo que se llama conjunto de validación. El último paso no fue realizado en este estudio.

Tabla 4.3.2.3: Residuos de los parámetros energéticos obtenidos por predicción a partir del modelado tipo QSAR - QSPR

Molécula	Residuo - E_{H-L}	Residuo - PI[M]	Residuo - AP[M]
	kcal/mol		
Cipermetrina	-5,68733365	-2,00103535	0,57103451
Permetrina	0,66582494	0,04420548	-0,10549042
Tetrametrina	0,10225661	0,24722245	2,8422E-14
Fenotrina	-5,29106551	-1,90896671	0,41704992
Alletrina	7,50392287	2,66470646	-0,88259401
L-Cialotrina	2,70639473	0,95386768	0,57103451

Los errores relativos porcentuales de los resultados obtenidos por predicción a partir de los modelos propuestos, se muestran en la Tabla 4.3.2.4.

Tabla 4.3.2.4: Error relativo porcentual de los parámetros energéticos obtenidos por predicción a partir del modelado tipo QSAR - QSPR

Molécula	Residuo E_{H-L}	Residuo PI[M]	Residuo AP[M]
	Error Relativo Porcentual		
Cipermetrina	4,7029	-1,1631	0,4025
Permetrina	-0,5229	0,0264	-0,0673
Tetrametrina	-0,1238	0,1497	0,0000
Fenotrina	-4,1284	-1,1777	0,2743
Alletrina	-6,8643	-1,5632	-0,6154
L-Cialotrina	-2,2303	-0,5451	0,4110

Como consecuencia de estos resultados, se refuerza la hipótesis planteada anteriormente en el estudio de las correlaciones existentes entre las propiedades, tanto biológicas como fisicoquímicas, de una familia de compuestos, con la tendencia de los mismos hacia la formación de ciertos iones en el espectrómetro de masas, donde las reacciones competitivas dependen de la energía de cada molécula y de la distribución espacial de los átomos (Marino, 2009).

4.3.3 Lipofilicidad (log P) y Factor de Bioconcentración

El coeficiente de partición o coeficiente de reparto octanol – agua (K_{ow}/P_{ow}), se emplea habitualmente para expresar la hidrofobicidad de un compuesto, donde el octanol se utiliza como solvente al asumirse que puede simular a los tejidos lipídicos

de un organismo (Duchowicz, 2005), o al material lipídico de la biota y al material orgánico presente en partículas y sedimentos, al tratarse el estudio de la transferencia de un compuesto entre compartimientos ambientales (Figueroa y Dávila, 2004).

El coeficiente de partición octanol –agua (P) es una propiedad física, y está dada por la relación entre la concentración del químico en la fase octanol y la concentración en la fase acuosa, de un sistema de dos fases en equilibrio. Debido a que los valores medidos se encuentran en un rango que va desde menos de 10^{-14} a valores mayores a 10^{+8} , el logaritmo de P (log P) es lo que se usa habitualmente para caracterizar esta propiedad (US EPA 2012).

Por otra parte, la bioconcentración es el proceso donde la concentración de un químico en un organismo acuático, alcanza un nivel que es superior a la concentración presente en el medio circundante (agua), a través de rutas diferentes a la correspondiente a la de la dieta. La bioconcentración se refiere a una condición, generalmente obtenida bajo condiciones de laboratorio, donde el químico es absorbido desde el agua a través de las vías respiratorias y/o de la piel solamente.

El grado de bioconcentración química es usualmente expresado como Factor de Bioconcentración (BCF), que es la relación de la concentración del químico en el organismo (C_B) y la concentración en el agua (C_W):

$$BCF = C_B / C_W \quad (4.3)$$

Como la concentración del químico en el organismo (C_B) es normalmente expresado en unidades de gramo del compuesto por kg del organismo expuesto, el BCF tiene unidades de L/kg.

Se ha establecido una correlación entre el BCF y la relación de solubilidad de la sustancia en octanol y agua, expresado como $\log K_{ow}$. En general, las medidas experimentales de bioconcentración llevan mucho tiempo y dinero, y no son posibles de realizar para una gran cantidad de compuestos químicos. Es por ello, que la estimación de los valores de BCF a partir de modelos tipo QSAR constituye una alternativa muy interesante, y puede ser realizada con la utilización de descriptores

como los valores de K_{ow} , determinados tanto experimentalmente o de forma estimativa (Pavan et al., 2006)

En el apartado 4.3.2 se describió la correlación entre la distribución de los iones en el espectrómetro de masas y las propiedades energéticas de las moléculas en estudio. Teniendo en cuenta que tanto las propiedades fisicoquímicas como biológicas de una molécula, pueden ser descritas en términos de modelos de correlación, en función a la energética de tal molécula, y que la distribución de los iones en el espectrómetro de masas resulta directamente como una consecuencia de la energía molecular, es posible establecer una correlación entre las propiedades o actividades de esta molécula en función a su comportamiento en el espectrómetro de masas en términos de distribución iónica.

En este trabajo se obtuvieron los resultados de la correlación entre el valor de $\log K_{ow}$ y el de $\log BCF$ con respecto a la distribución de iones. Los valores de $\log K_{ow}$ y $\log BCF$ fueron obtenidos a partir del programa EPI Suite (Programa de Estimación de Interface para Windows), específicamente a través de los sub - programas individuales: KOWWIN v 1.68 y BCFBAF v 3.01., respectivamente (US EPA 2012). El programa EPI Suite (última versión: 4.11 noviembre 2012) fue diseñado y difundido por la EPA, abarcando tanto parámetros fisicoquímicos como ecotoxicológicos.

Los mejores modelos de correlación obtenidos, se muestran a continuación, junto con los parámetros estadísticos (r, S y F) para cada caso.

- 1) $\log P = 8,0167 - 0,0147[M+Na]^+ - 0,0198[M+NH_4]^+ - 0,0522[2M+Na]^+$
 $r=0,9726 \quad S=0,2936 \quad F=11,6459$
- 2) $\log BCF = 1,9644 - 0,0204[M+H]^+ + 0,0257[M+NH_4]^+ + 0,0103[Frag]^+$
 $r=0,9175 \quad S=0,2221 \quad F=3,5485$

Los valores de error relativo porcentual resultantes de la predicción del valor de $\log P$ y $\log BCF$ para cada molécula que ha sido estudiada, a partir de los modelos de correlación propuestos, se resumen en las Tablas 4.3.3.1 y 4.3.3.2, respectivamente.

Tabla 4.3.3.1: Estimación del valor de log P según el modelo propuesto y su error relativo porcentual.

Molécula	log P*	Pronóstico log P	Error relativo Porcentual
Cipermetrina	6,3752	6,5836	-3,2686
Permetrina	7,4267	7,4758	-0,6612
Tetrametrina	5,5406	5,5406	0,0000
Fenotrina	7,5367	7,6860	-1,9815
Alletrina	7,5154	7,2084	4,0854
L-Cialotrina	6,8500	6,7502	1,4569

*US EPA O of PP. 2012

Tabla 4.3.3.2: Estimación del valor de log BCF según el modelo propuesto y su error relativo porcentual.

Molécula	log BCF*	Pronóstico log BCF	Error relativo Porcentual
Cipermetrina	2,61	2,47	5,22
Permetrina	2,65	2,62	0,97
Tetrametrina	2,06	2,03	1,60
Fenotrina	2,60	2,48	4,47
Alletrina	2,05	2,30	-12,00
L-Cialotrina	2,93	3,00	-2,23

*US EPA O of PP. 2012

Estos resultados hacen suponer que la distribución de iones en la cámara de ionización del espectrómetro de masas guarda una buena correlación con propiedades fisicoquímicas, energéticas e incluso biológicas, de una familia de compuestos.

5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1 Conclusiones

A través de cálculos computacionales se logró obtener la geometría optimizada de cada una de las moléculas de piretroides que han sido incluidas en el estudio, y así también, de la gran mayoría de las formas iónicas cuya formación puede detectarse experimentalmente por espectrometría de masas.

Se obtuvieron parámetros geométricos y energéticos de las formas estructurales neutras optimizadas con los funcionales híbridos B3LYP, B3PW91, B98 y B97-2, utilizando en todos los casos el conjunto de bases 6-31G (d,p). Las formas iónicas fueron estudiadas con el nivel de teoría B3LYP/6-31G (d,p). Los datos geométricos obtenidos computacionalmente y que fueron contrastados con valores experimentales disponibles, como para el caso de la molécula de Cipermetrina, presentaron una buena concordancia.

Del estudio teórico computacional realizado puede concluirse que se observa una relación entre la estabilidad de las estructuras optimizadas obtenidas por modelado computacional, y las estructuras que pueden ser detectadas en el espectrómetro de masas. Por estos resultados puede suponerse que la utilización de herramientas computacionales para la predicción de formas iónicas que pueden ser seguidas dentro de una familia química en una metodología analítica por espectrometría de masas, puede resultar muy ventajosa.

Además, cada molécula de piretroide fue evaluada de manera individual experimentalmente mediante la utilización de métodos de cromatografía líquida con detector de espectrometría de masas, utilizando fuentes de ionización a presión atmosférica, particularmente ESI y APCI. Se realizaron variaciones de diversas

condiciones experimentales analíticas, lo que finalmente permitió obtener una metodología optimizada para el análisis cuantitativo de matrices ambientales.

La metodología analítica propuesta para la determinación de una mezcla de compuestos de la familia de los piretroides a través un sistema de separación por cromatografía líquida asociada a un detector de espectrómetro de masas resultó ser bastante robusta y de buena sensibilidad para gran parte de los compuestos que han sido estudiados.

Con la fuente de ionización ESI se lograron los mejores resultados de detección. Excepto para el compuesto Lambda Cialotrina, todos los demás compuestos estudiados pudieron ser determinados de manera óptima con las condiciones experimentales propuestas en el apartado 4.2.7.

La temperatura del sistema no tuvo mayor incidencia en la detección de los iones seguidos en el proceso analítico, excepto para algunos casos aislados. Por lo que finalmente en la optimización del método fue utilizada una temperatura intermedia a las estudiadas durante la realización de este trabajo.

La influencia del solvente utilizado como eluyente en la cromatografía líquida si tuvo una clara influencia en la determinación de los distintos analitos. Para la Cipermetrina y la Lambda Cialotrina, las mayores abundancias iónicas se obtuvieron en presencia de ACN, mientras que para las moléculas de Permetrina, Fenotrina, Alletrina y Tetrametrina, con el solvente MeOH, se tuvieron los resultados más óptimos.

Finalmente, el agregado de un dopante al medio de reacción contribuyó a forzar la formación de iones que pudieran ser seguidos con mayor facilidad y compensar en ese caso, la influencia del solvente de la fase móvil. El dopante utilizado fue acetato de amonio, induciéndose por tanto a la formación de iones $[M+NH_4]^+$, detectados con facilidad para algunas especies.

Finalmente, se propuso un modelo de correlación tipo QSAR, obteniéndose que es posible relacionar la distribución de los iones que tiene lugar en la cámara de

ionización de un espectrómetro de masas, con propiedades fisicoquímicas, energéticas y de actividad biológica, para una misma familia de compuestos.

5.2 Recomendaciones

El estudio teórico – computacional, servirá de base para dar continuidad al trabajo presentado en la presente tesis, con la aplicación de métodos computacionales más complejos, como también, para lograr un estudio más acabado, sobre todo, en lo que se refiere a la estabilidad energética de cada una de las formas iónicas.

De esta manera se podría lograr de manera efectiva la predicción de probables rutas o mecanismos que pueden tener lugar en el proceso de ionización por impacto electrónico de un espectrómetro de masas, para moléculas pertenecientes a familias químicas, cuyo análisis resulte ser de interés ambiental. Con esto se podrá lograr una mejor interpretación de los espectros de masas, además de permitir hacer el seguimiento de aquellos iones, cuya formación en el espectrómetro de masas resulte ser más probable por sus características de estabilidad energética, dadas a conocer por un estudio previo teórico computacional.

Experimentalmente, podrían realizarse estudios complementarios de un mayor número de variables analíticas, como otros parámetros instrumentales y con otros solventes o de diversas mezclas de ellos. Además también se podrían realizar la optimización de métodos analíticos de extracción de los analitos en matrices ambientales, seguida por la técnica optimizada de cuantificación, y de esta manera obtener datos como los valores de límite de detección y límite de cuantificación.

En el estudio de tipo QSAR podrían verificarse el comportamiento de la distribución iónica obtenida bajo distintas condiciones experimentales con un mayor número de variables predictivas. De esta manera se obtendría correlaciones matemáticas del comportamiento experimental de una familia de compuestos con parámetros relativos a aspectos de estabilidad energética, propiedades fisicoquímicas y de comportamiento toxicológico, tanto ambiental como biológico.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALCAMI, M.; MO, O.; YÁÑEZ, M. 2002. Computational chemistry: A useful (sometimes mandatory) tool in mass spectrometry studies. *Mass Spectrometry Reviews* 20:195–245.
- ALONSO, M.B.; FEO, M.L.; CORCELLAS, C.; VIDAL, L.G.; BERTOZZI, C.P.; MARIGO, J.; SECCHI, E.R.; BASSOI, M.; AZEVEDO, A.F.; DORNELES, P.R.. 2012. Pyrethroids: A new threat to marine mammals? *Environment International* 47:99–106.
- CLAYCAMP, H.G.; SUSSMAN, N.B.; MACINA, O.; ROSENKRANZ, H.S. 1999. Artificial neural networks as statistical tools in SAR/QSAR modeling. Technical report SS-99-01. Panel 3:112–115.
- CRAMER, C.J. 2005. *Essentials of Computational Chemistry: Theories and Models*. John Wiley y Sons, Ltd. Minneapolis, 618 p.
- DUCHOWICZ, P.R. 2005. *Aplicaciones fisicoquímicas y biológicas de la teoría QSPR-QSAR*. Tesis doctoral. Facultad de Ciencias Exactas. Universidad Nacional de La Plata. La Plata, 264 p.
- ERIKSSON, L.C.W.; JOHANSSON, E.; KETTANEH - WOLD, N. 2006. *Multi- and Megavariate Data Analysis*. MKS Umetrics AB, Umeá, 425 p.
- FIGUERUELO, J.E.; DÁVILA M.M. 2004. *Química física del ambiente y de los procesos medioambientales*. Reverte. Barcelona, 591 p.
- FLEET, I.A.; TETLER, L.W.; MONAGHAN, J.J. 1993. Study of the major fragmentation pathways of cypermethrin and related synthetic insecticides using tandem mass spectrometry. *Organic Mass Spectrometry*. 28:626–634.
- FLEET, I.A.; MONAGHAN, J.J. 1997. Tandem mass spectrometric study of the major fragmentation pathways of some non-ester pyrethroid insecticides having alkane, alkene and ether central linkages. *Journal of Mass Spectrometry* 32:984–991.
- FORESMAN, J.B.; FRISCH, A.E. 1996. *Exploring chemistry with electronic structure methods*. Gaussian, Inc. Pittsburgh, 302 p.
- FRISCH, M. J.; TRUCKS, G. W.; SCHLEGEL, H. B.; SCUSERIA, G. E.; ROBB, M. A.; CHEESEMAN, J. R.; SCALMANI, G.; BARONE, V.; MENNUCCI, B.; PETERSSON, G. A.; NAKATSUJI, H.; CARICATO, M.; LI, X.; HRATCHIAN, H. P.; IZMAYLOV, A. F.; BLOINO, J.; ZHENG, G.; SONNENBERG, J. L.; HADA, M.; EHARA, M.; TOYOTA, K.; FUKUDA, R.; HASEGAWA, J.; ISHIDA, M.; NAKAJIMA, T.; HONDA, Y.; KITAO, O.; NAKAI, H.; VREVEN, T.; MONTGOMERY, JR., J. A.; PERALTA, J. E.;

OGLIARO, F.; BEARPARK, M.; HEYD, J. J.; BROTHERS, E.; KUDIN, K. N.; STAROVEROV, V. N.; KOBAYASHI, R.; NORMAND, J.; RAGHAVACHARI, K.; RENDELL, A.; BURANT, J. C.; IYENGAR, S. S.; TOMASI, J.; COSSI, M.; REGA, N.; MILLAM, J. M.; KLENE, M.; KNOX, J. E.; CROSS, J. B.; BAKKEN, V.; ADAMO, C.; JARAMILLO, J.; GOMPERTS, R.; STRATMANN, R. E.; YAZYEV, O.; AUSTIN, A. J.; CAMMI, R.; POMELLI, C.; OCHTERSKI, J. W.; MARTIN, R. L.; MOROKUMA, K.; ZAKRZEWSKI, V. G.; VOTH, G. A.; SALVADOR, P.; DANNENBERG, J. J.; DAPPRICH, S.; DANIELS, A. D.; FARKAS, Ö.; FORESMAN, J. B.; ORTIZ, J. V.; CIOSŁOWSKI, J.; FOX, D. J. 2009. Gaussian 09, Revision A.1, Gaussian, Inc., Wallingford CT

- GROSS, J.H. 2004. Mass Spectrometry: A Textbook. Springer, Berlin Heidelberg, 518 p.
- HLADIK, M.L.; SMALLING, K.L.; KUIVILA, K.M. 2009. Methods of analysis - Determination of pyrethroid insecticides in water and sediment using gas chromatography/mass spectrometry. US Geological Survey. Techniques and Methods 5 - C2, 18 p.
- HOFFMANN, E. DE; STROOBANT, V. 2007. Mass Spectrometry: Principles and Applications. John Wiley y Sons Ltd., West Sussex, 489 p.
- JENSEN, F. 2007. Introduction to Computational Chemistry. John Wiley y Sons Ltd. West Sussex, 624 p.
- KATRITZKY, A.R.; LOBANOV, V.S.; KARELSON, M. 1995. QSPR: the correlation and quantitative prediction of chemical and physical properties from structure. Chem. Soc. Rev. 24:279–287.
- LEVINE, I.N.; 2001. Química cuántica 5/e. Pearson Educación S. A. Madrid, 736 p.
- MARINO, D.J.G. 2009. Estudio teórico experimental sobre respuestas biológicas a compuestos orgánicos de relevancia ambiental. Tesis doctoral. Facultad de Ciencias Exactas. Universidad Nacional de La Plata. La Plata, 211 p.
- MAUCK, W.L.; OLSON, L.E.; MARKING, L.L. 1976. Toxicity of natural pyrethrins and five pyrethroids to fish. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 4:18–29.
- MCKIM, J.M.; BRADBURY, S.P.; NIEMI, G.J. 1987. Fish acute toxicity syndromes and their use in the QSAR approach to hazard assessment. Environ Health Perspect 71:171–186.
- MCLAFFERTY, F.W.; TURECEK, F. 1993. Interpretation of Mass Spectra. University Science Books. Sausalito, 371 p
- PAULA, A.D.; PAULA, J.D. 2007. Química Física. Ed. Médica Panamericana. Buenos Aires, 1.184 p.

- PATTENDEN, G.; CROMBIE, L.; HEMESLEY, P. 1973. The mass spectra of the pyrethrins and related compounds. *Organic Mass Spectrometry* 7:719–735.
- PAVAN, M.; WORTH, A.P.; NETZEVA, T.I. 2006. Review of QSAR models for bioconcentration. JRC report EUR EN I-21020. Italy, 142 p.
- RICHARDSON, S.D. 2000. Environmental Mass Spectrometry. *Anal Chem* 72:4477–4496.
- SCHLEIER, J.J.; PETERSON, R.K.D. 2011. CHAPTER 3 Pyrethrins and Pyrethroid Insecticides. en LOPEZ, O.; FERNANDEZ - BOLAÑOS, J. G. *Green Trends in Insect Control*. Royal Society of Chemistry. Bozeman, pp 94 - 131
- KATRITZKY A.R.; KARELSON, M.; LOBANOV V.S. 1997. QSPR as a means of predicting and understanding chemical and physical properties in terms of structure. *Pure and Appl. Chem.* 69:245 - 248.
- SZABÓ, A.; OSTLUND, N.S. 1996. *Modern Quantum Chemistry: Introduction to Advanced Electronic Structure Theory*. Courier Dover Publications. Nueva York, 480 p.
- TAKÁTS, Z.; WISEMAN, J.M.; COOKS, R.G. 2005. Ambient mass spectrometry using desorption electrospray ionization (DESI): instrumentation, mechanisms and applications in forensics, chemistry, and biology. *J. Mass Spectrom.* 40:1261–1275.
- US EPA O of PP. 2012. EPA/OPPT/Exposure Assessment Tools and Models/Estimation Program Interface (EPI) Suite Version 3.12 (August 17, 2004). Available from: <http://www.epa.gov/opptintr/exposure/pubs/episuite.htm>
- US EPA O of PP. 2011. Pyrethroids and Pyrethrins | Pesticides | US EPA.
- YOUNG, D. 2001. *Computational Chemistry: A Practical Guide for Applying Techniques to Real World Problems*. John Wiley y Sons, Inc. 408 p.