



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

Estudi dels insecticides Piretroides en mostres biològiques i humanes

Cayo Corcellas i Carramiñana

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tdx.cat) i a través del Dipòsit Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX ni al Dipòsit Digital de la UB. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX o al Dipòsit Digital de la UB (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tdx.cat) y a través del Repositorio Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR o al Repositorio Digital de la UB. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR o al Repositorio Digital de la UB (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tdx.cat) service and by the UB Digital Repository (diposit.ub.edu) has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized nor its spreading and availability from a site foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository is not authorized (framing). Those rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.

Estudi dels insecticides Piretroides en mostres ambientals i humanes

Cayo Corcellas i Carramiñana



UNIVERSITAT DE
BARCELONA



CSIC

CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS

Facultat de Química

Departament d'Enginyeria Química i Química Analítica

Programa de Doctorat: Química Analítica del Medi Ambient i la Pol·lució

TESIS DOCTORAL

Estudi dels insecticides Piretroides en mostres ambientals i humanes

Memòria presentada per optar al títol de Doctor

per la Universitat de Barcelona per

Cayo–Eduard Corcellas i Carramiñana

Sota la direcció de:

Ethel Eljattar Esebag

Científica Titular, IDAEA-CSIC

Damià Barceló Culleres

Professor d'investigació IDAEA-CSIC

La Dra. Ethel Eljarrat Esebag, el Prof. Damià Barceló Culleres, Científica titular i Professor de Investigació respectivament del Departament de Química Ambiental del Institut de Investigacions Ambientals i Estudis de l'Aigua del Consell Superior de Investigacions Científiques, i el Dr. Francisco Javier Santos Vicente, Professor titular del Departament d'Enginyeria química i química analítica de la Universitat de Barcelona,

FAN CONSTAR,

Que el present treball d'investigació titulat "**Estudi dels insecticides Piretroides en mostres ambientals i humanes**" ha estat realitzat sota la nostra direcció/tutela pel Sr. **Cayo-Eduard Corcellas i Carramiñana** en el Departament de Química Ambiental del IDAEA-CSIC i que tots els resultats presentats són fruit de les experiències realitzades pel citat doctorant.

I per a que així consti, expedim i signem el present certificat.

Barcelona, 1 de juny de 2017

Dra. Ethel Eljarrat

Codirectora

Prof. Damià Barceló

Codirector

Dr. Frco. Javier Santos

Tutor

No pots seguir el camí fins que no et converteixes en el camí

Buda

Només una cosa torna un somni impossible: la por a fracassar

Paulo Coelho

Agraiments

Agraïments.

Per començar aquest apartat, primer cal complir amb les formalitats. Així doncs, agraeixo als directors de tesis, al tutor, a la universitat i al CSIC per la oportunitat que m'han donat per fer aquesta tesi.

I ara sí, comencem amb el que toca. Òbviament, a qui primer he d'agrair és a la meva família: la meva mare i la meva germana. Crec que no cal donar gaires explicacions, ma mare que sempre m'ha recolzat i empès a fer el que vull, malgrat que amb 33 anys segueixo sense feina, sense projecte de futur i la meva única aspiració és poc més que passar un mes més. Tot i així allà està ella amb el seu "però neen! Que ja tens pèls a la... aix és que em fas dir unes coses...". Gràcies. I a la meva germana, perquè està. No cal més, segurament les coses més importants de la vida no necessiten de res més, simplement ser-hi i la resta són floritures que de vegades volem donar-li, però ens sobren. Amb ella no sobra res. Mil gràcies també.

I als amics que m'han acompanyat durant aquesta tesi. Amics, companys, gent que ha anat i ha vingut, gent que, per sort o per desgràcia ha desaparegut, gent que ha sigut molt important i fins i tot gent que no ho ha estat tant, a tots ells gràcies. I sobretot, gràcies als que havien de marxar i ho han fet. Però com que aquesta part de la tesis és la única realment important, la que s'escriu perquè sabem que serà llegida, seré una mica més precís.

Primer a tota la colla d'amics que s'ha anat format com una de les millors que es pot aconseguir. A tots els Barna-culs: Alba, Anto, Carmen, Diego, Lluna, Marc, Parra, Valber i Virginia. M'ajuden, m'acompanyen, em distreuen i sobretot fan que sigui una miqueta més feliç. S'acostuma a dir que ningú no és imprescindible, que sempre podràs trobar algú altre... és mentida. Vosaltres sou imprescindibles i potser poden haver més amics, gent que en moments sigui més propera o que s'allunyi una mica, però tots vosaltres sou imprescindibles per mi.

Seria injust, també, no recordar els companys de feina. Dit així sembla com menys important, però potser és de la gent que més ha influït en aquesta tesi. Giselle, Paqui, Aleksandra, Kike, Jaume, tot gent que ja ha marxat del CSIC i, potser, poc a poc també de la meva vida (espero que no hagin marxat lluny) però que sense ells el meu pas pel CSIC no hagués valgut la pena. Evidentment, hi ha més gent del CSIC que encara hi són i a que es mereixen estar aquí, Marga, Òscar, Dani, Marianne, Gabriella, Josep i Marta, Núria (una chica de verdad que le gusta el pollo frito), Jenny, Mar, i tants altres que no nombro perquè me'n

deixaré algun de important i un cop imprès segur que me'n penedeixo d'oblidar-me'l. A tots ells moltes gràcies per amenitzar les meves jornades, distreure'm quan havia de treballar (sí, Ethel, és su culpa si no trabajé más) i sobretot ensenyar-me que per "xocar-te" un dia amb una bici ja guanyes una fama totalment falsa!

Hi ha algú que mai no m'oblidaria en uns agraïments com cal. Algú amb qui he compartit de tot, riures i plors, ens hem apuntat junts a esport, hem compartit llit, secrets que no oloren si els guardes en un armari, ... i encara després de tot ens tirem al coll quan ens veiem. Dra. Boschi gràcies per creuar-te en la meva vida.

I com no agrair a la música tota la llibertat que m'ha donat. Començar a cantar amb The New Zombis va ser una experiència rara, maca però rara. Ho feia fatal, però allà em van aguantar. Són molt grans tots. Podria citar noms concrets que m'han marcat més que d'altres, Bleiki, Bambi, Álvaro potser són dels que més moments importants podria citar, però no és just per la resta. Tots fan que cada assaig, cada concert, cada moment junts sigui especial. Fins i tot aquells que potser semblarien més allunyats, amb qui menys relació tinc, em fan viure moments únics i especials (ni que sigui donant material criticable, jejeje).

Però no puc parlar de música sense fer referència a la "querida". Els que van començar com Holly Family (apuntava maneres el nom), van ampliar-se cap a bé com a Good Vibes i seleccionem un grup VIP de Guachis, amb qui no hi haurà Fornication, però sí que molt de guachi guachi. Amb ells no es pensa. Saben com fer inoblidables moments absurds, fer que dies i setmanes horribles acabin a dalt de tot, sense arribar a fer un Klevin (per favor!), però amb una sensació inesperada de saber que estàs vivint moments irrepitibles que et marquen.

Ja per anar acabant, gràcies a tota la gent random que passa per la meva vida, ara per exemple se m'acut Cris Fdez i Sergio Carneado, però segur que aquí me'n deixo mil. Gent que apareixen, i que tenen una importància que no ho sembla. Serien com els personatges secundaris d'una peli, aquells que molta gent ni recorda el nom però que són claus en l'argument global i van apareixent de tant en tant per donar sentit a tot plegat. Per entendre'ns, els Rafiki de la vida.

Crec que em deixo algú... ah no, sólo es un detallito final sin importancia. Noelia. Nos conocimos y sudaste un poco de mí, confiesa, creo que no te caía muy bien y, la verdad, a mí me importaba más bien poco. Pero antes de irte algo cambió. Y empezamos con sms y llamadas (qué tiempos aquéllos sin whaps) y visitas que hacías cada poco tiempo para ver a tus amigos del CSIC, y llegó whats app y ya no hay día que no me cuentes tus mierdas. Y yo las

mías claro. Y luego, si nos vemos, al 2º día discutimos, pero qué más da, si somos insoportables. Tú hipocondriaca, paranoica y bipolar, y yo... la mejor persona del mundo mundial, perfección y humildad personificada, (ironía grande, aclaración por si alguien que no sabe de qué va el tema lo lee). Pero bueno, cada uno con sus defectos, nos complementamos bien. Que igual somos un poco obsesivos y acosadores, sí, ¿y qué? Que muchos me dicen que eres una amiga imaginaria porque no paro de hablar de ti y nunca te conocen, pues también. Pero no hay nada mejor que una amistad así. Si tengo que decir qué te agradezco y por qué, no puedo. No hay nada concreto, es simplemente todo. Te debo mucho pero es algo que no se paga (por suerte, porque como soy catalán...). Me has acompañado en momentos de todo tipo, buenos, malos, da igual, siempre. Y espero que esto continúe siendo así muchos años más. (Por cierto, sí, tu nombre está ahí puesto con calzador porque no lo iba a poner, pero entonces me matas, así que toma ahí lo tienes en medio de dos frases sin sentido).

Índex

Índex.

| | |
|--|----|
| Resum (Summary)..... | 7 |
| Sigles, acrònims i abreviacions..... | 13 |
| Capítol 1: Introducció..... | 19 |
| 1.1 Els insecticides..... | 21 |
| 1.2 Els piretroides..... | 23 |
| 1.2.1 Estructura..... | 24 |
| 1.2.2 Isomeria..... | 25 |
| 1.2.3 Propietats fisico-químiques..... | 27 |
| 1.3. Toxicitat dels piretroides..... | 31 |
| 3.1 Toxicitat vs. Isomeria..... | 36 |
| 1.4. Metabolització dels piretroides..... | 37 |
| 1.5. Legislació..... | 39 |
| 1.6. Mètodes d'anàlisi de piretroides..... | 40 |
| 1.6.1 Preparació de mostres..... | 41 |
| 1.6.2 Tècniques cromatogràfiques..... | 44 |
| 1.6.3 Detecció i determinació..... | 47 |
| 1.7. Presència ambiental i comportament..... | 51 |
| 1.7.1 Contaminació a l'aigua, el sòl i l'aire..... | 54 |
| 1.7.2 Mostres alimentàries..... | 57 |
| 1.7.3 Bioacumulació en fauna silvestre..... | 59 |
| 1.7.4 Exposició humana..... | 60 |
| Capítol 2: Objectius..... | 63 |
| 2.1. Objectius generals i específics..... | 65 |
| 2.2. Estructura de la tesi..... | 66 |

| | |
|--|-----|
| Capítol 3: Metodologia analítica..... | 67 |
| 3.1. Introducció..... | 69 |
| 3.2. Determinació quantitativa dels piretroides..... | 71 |
| 3.2.1 Condicions instrumentals del detector MS-MS..... | 71 |
| 3.2.2 Mètode definitiu per a la determinació de piretroides..... | 73 |
| 3.3. Adaptació de la metodologia a diferents matrius..... | 74 |
| 3.4. Determinació enantiomèrica dels piretroides..... | 75 |
| Publicació 1: <i>Enantiomeric-selective determination of pyrethroids: application to human samples</i> | 77 |
| 3.5. Discussió de resultats..... | 89 |
| Capítol 4: Bioacumulació en biota salvatge..... | 93 |
| 4.1. Introducció..... | 95 |
| 4.2. Medi terrestre..... | 96 |
| 4.2.1 Piretroides en ous d'aus salvatges..... | 98 |
| Publicació 2: <i>Pyrethroid insecticides in wild bird eggs from a World Heritage Listed Park: A case study in Doñana National Park (Spain)</i> | 99 |
| 4.2.2 Anàlisi de mostres de l'Antàrtida..... | 119 |
| 4.2.3 Discussió de resultats..... | 119 |
| 4.3. Medi aquàtic..... | 121 |
| 4.3.1 Piretroides en biota d'ecosistemes d'aigua dolça..... | 122 |
| Publicació 3: <i>First report of pyrethroid bioaccumulation in wild river fish: A case study in Iberian river basins (Spain)</i> | 123 |
| 4.3.2 Piretroides en biota d'ecosistemes marins..... | 136 |
| 4.3.2.1 Determinació en dofins del Plata..... | 136 |
| Publicació 4: <i>Pyrethroids: A new threat to marine mammals?</i> | 137 |
| 4.3.2.2 Determinació en dofins comuns..... | 147 |

| | |
|---|-----|
| Publicació 5: <i>Tissue Distribution of pyrethroid insecticides in mediterranean common dolphin</i> | 149 |
| 4.3.3 Discussió de resultats..... | 177 |
| 4.3.3.1 Exposició a piretroides..... | 177 |
| 4.3.3.2 Preses de mostra per a la determinació de piretroides | 180 |
| 4.4. Discussió global de bioacumulació a la biota salvatge..... | 182 |
| Capítol 5: Exposició en humans..... | 185 |
| 5.1. Introducció..... | 187 |
| 5.2. Piretroides en llet materna..... | 189 |
| Publicació 6: <i>Pyrethroid in human breast milk: occurrence and nursing Health risk evaluation</i> | 191 |
| 5.3. Estudi de la toxicitat en cèl·lules hepàtiques..... | 199 |
| 5.3.1. Planificació de l'estudi..... | 200 |
| 5.3.2 Mètodes d'assaig i resultats..... | 205 |
| 5.4. Discussió de resultats..... | 205 |
| Capítol 6: Conclusions..... | 209 |
| 6.1. General conclusions..... | 211 |
| 6.2. Future studies..... | 215 |
| Capítol 7: Bibliografia..... | 217 |

Summary

Summary.

The present thesis is a compilation of publications. Under this summary, all sections are briefly described and publications included in each one are related.

From 2012 to 2017 the present thesis was carried out under the supervision of Dr. Ethel Eljarrat and Prof. Damià Barceló. The aim of this work was to understand the behaviour of pyrethroid insecticides in environment.

Pyrethroids are very common pesticides. The use of PYRs is widespread around the globe. They are very common in agricultural and livestock sectors but also they are used for domestic purposes, as well for disease control programmes to ensure Public Health, controlling mosquito vectors of diseases such as dengue and malaria. Over 11500 tonnes of pyrethroids were quantified in Spain 2007 just in retail sales products (INE, 2015).

Pyrethroids are semi-synthetic compounds, derived from the natural pyrethrins. These last ones are the active compounds of pyrethrum, an extract of *Chrysanthemum* spp. flowers. They are related with chrysanthemum acid. Pyrethroids are different functional esters derived from this acid. In the acidic part, they generally present a propyl ring in their structure, which give to them 2 chiral centres. They can contain a cyano group in the α' position of the alcohol part. If it is the case, they are classified as Type II pyrethroid. In case the cyano group is missing, they are considered as Type I pyrethroid. This cyano group adds a third chiral center to the pyrethroid structure.

Uses of pyrethroids and their levels in food is regulated by international organizations like UE, FAO and FDA. Some pyrethroids such as bifenthrin are banned in agriculture almost all European countries but most pyrethroids are allowed (EC, 2014). Their toxicology in non-target organisms is relatively low because most of mammals, birds, fungus and bacteria, among others can metabolize them. However, in aquatic ecosystems pyrethroid toxicology is a problem because zooplankton and fishes are very sensible to these insecticides.

Nonetheless, recent studies about non-lethal doses of pyrethroids described endocrine disruptions, fat accumulation and carcinogenic behaviour in mice, worms and other animal laboratory species (Bassil et al., 2007; Yuanxiang Jin et al., 2012; L. L. Li et al., 2017; P. Y. Shen et al., 2017). Moreover, different toxic effects are been described for different isomers and enantiomers of pyrethroids. Generally, cis isomers used to be less metabolizable and more toxic (Y. Jin et al., 2016; R. Lavado, J. W. Li, J. M. Rimoldi, & D. Schlenk, 2014; S.-Y. Zhang et al., 2008).

Pyrethroids are been detected in environmental samples such as water, sediments and even dust. Given that they are lipophilic molecules, they used to be found in bigger proportion in sediments with high TOC (total organic carbon) than in water. Though, there are reports of pyrethroids in water, usually linked to particulate. In atmosphere, they used to be present in the dust deposition more than in air fraction. Besides, their presence in matrices such as river water depends on the temporal proximity of their dump.

In organic samples, levels of pyrethroids have been reported usually in food matrices, both animal and vegetal tissues. Usually levels were under the legal recommendations even when some higher levels were found in food from Ghana or Tanzania markets (Blankson, Osei-Fosu, Adeendze, & Ashie, 2016; Mahugija, Khamis, & Lugwisha, 2017). Nevertheless, until the start of this thesis there were no reports about pyrethroid levels in wild fauna.

About human exposure, some authors had been able to describe levels of pyrethroids in breast milk samples of exposed populations (Bouwman, Sereda, & Meinhardt, 2006). However, metabolites of pyrethroids were also evaluated in human urine and blood (Olsson et al., 2004; Ostrea et al., 2009).

More extended information about pyrethroids is described in the [Chapter 1](#) of this thesis.

In this context, this thesis was begun in order to understand the pyrethroid behaviour in environment, specifically in biota. This work pretended to demonstrate and explain bioaccumulation, biomagnification and even transport of pyrethroids in they were. Characterization of pyrethroids in all samples in order to describe potential isomer or enantiomero-selectivity was included in this thesis plan. Furthermore, human exposure to pyrethroids was another important issue. Finally, some toxicological studies were needed to fill some toxic information gaps. All specific objectives are further explained under [Objectives](#) section.

First of all, we needed to increase the number of pyrethroids included in analytical methodology. The best choice to pyrethroid analyses was gas chromatography with mass spectroscopy in tandem. Previously, the group had optimized a 12 pyrethroid method analyses with negative ion ionization but, at the end of these thesis, the method was able to determine 19 different pyrethroids and one organophosphate pesticide (chlorpyrifos) simultaneously.

Besides, a completely new method was performed to discriminate enantiomers. For the first time, one analytical method was able to separate all enantiomers of a pyrethroid: the tetramethrin. For five more pyrethroids, this new method discriminate all *cis* enantiomers and clearly categorize *cis* and *trans* isomers of bifenthrin, cyfluthrin, cyhalothrin, cypermethrin and permethrin. All these isomers and enantiomers of the six pyrethroids were determined in one run.

Both instrumental analyses requires the same sample treatment, which was adjust to each different matrix as needed, i.e., commercial insecticides, eggs of different bird species, fish, dolphin tissues and breast milk.

These analytical requirements and improvements accomplished are described in [Chapter 3](#). Besides, in this chapter, the first publication of this compilation ([Publication 1](#)) is included.

In the [Chapter 4](#), results of determination of pyrethroids in biota are described. Three different media were separately studied and discussed: terrestrial, river and sea waters.

Under terrestrial fauna, we analysed bird eggs from Natural Reserve of Doñana. There, a lot of migratory protected birds nest. It made that our study had a high ecological value. We found that 96% of eggs sampled presented pyrethroid residues. The higher values were described in gulls. Analyses with stable isotopes of N and C didn't let us describe biomagnification either refuse it completely. However, diet seemed to be the main way of exposure. This study was published and here is included as [Publication 2](#). A first attempt to find pyrethroids in Antarctic fauna showed that pyrethroids presumably could not be transported long distances, as expected due to their physico-chemical properties.

In the river water study, we analysed different edible fish species of four Iberian rivers. In all samples we found pyrethroids at levels higher than in terrestrial samples (bird eggs). It was of highly interest because fishes are very sensible to levels of pyrethroids in water. However, similar pattern of isomeraselective behaviour was described. Concretely, *cis* isomers were more present than *trans*, except for the case of tetramethrin pyrethroid. However, it is known that for this pyrethroid *trans* isomer is commercially enhanced, which meant that higher concentration of *trans* isomers in this pyrethroids was probably due to exposure. This study was published and here it is reported as [Publication 3](#).

[Publications 4](#) and [5](#) reported levels of pyrethroids in dolphin tissues. Even when these studies considered different dolphin species, results showed a different exposure to

pyrethroids. In Brazil, they seemed to be more exposed to permethrin and cypermethrin whereas in Spain coast, dolphins presented more permethrin and tetramethrin. Results showed a distinct metabolic balance of pyrethroids through dolphin life. High loads are received at the beginning of their lives and, when they reach sexual maturity, these mammals seem to degrade/metabolize pyrethroids. Maternal transfer of these compounds was also evaluated through the analysis of breast milk and placenta samples. Pyrethroids were detected in both matrices, and for the first time, a study shows mother-to-calf transfer of pyrethroids by both gestational and lactation pathways in dolphins. Moreover, these studies reported for the first time distribution of pyrethroids in different tissues of the same individual i.e., blubber, brain, breast milk, kidney, liver and muscle. They showed a general diffusion of pyrethroids in all body. It was clear that pyrethroids were lipophilic compounds and that they had some preference for lipid tissues. However, pyrethroid could be linked to some proteins and their solubility in not fatty tissues increased. This fact made us to recommend not expressing the levels of pyrethroid in lipid weight basis but in dry weight.

[Chapter 5](#) describe human exposure to pyrethroids. In it, last published article of the thesis can be found, [Publication 6](#). This publication is an international monitoring of human breast milk. Pyrethroids were found in 100% of samples, of general population. Relations among pyrethroid levels and offspring were described even when deeper studies on this should be necessary. Besides, a risk evaluation for breastfed babies was carried out and discussed.

Finally, in this last chapter, a human cell toxicology study is described. It was performed in Universität des Saarlandes in a three months stage. However, a bacterial infection of laboratory invalidated all analyses and there were no time to repeat them.

At the end of thesis, the [Conclusions](#) section is found. In it all discussions are summarized and general conclusions of all these studies related together.

Sigles,

acrònims i abreviacions

Sigles, acrònims i abreviacions

3PBA – àcid 3-fenoxibenzoic.

ADI – Ingesta diària acceptable (de l'anglès, Acceptable Daily Intake).

CE – Energia de col·lisió (de l'anglès, Collision Energy).

CI – Ionització química (de l'anglès, Chemical Ionization).

DBCA – Àcid 3-2,2-diclorovinil-2,2-dimetilciclopropano-1-carboxilic.

DCCA – àcid 3-2,2-diclorovinil-2,2-dimetilciclopropano-1-carboxilic.

DDT – 1,1,1-Tricloro-2,2-bis(4-clorofenil)-età (de l'anterior nomenclatura, dicloro-difenil-tricloroetà).

DT_x – Temps de degradació (de l'anglès "degradation time") on X indica el percentatge de substància degradada.

EC₅₀ – Concentració mitjana de màxim efecte (de l'anglès, half maximum Effect Concentration).

ECD – Detector de captura d'electrons (de l'anglès, Electron Capture Detector).

EF – Factor enantiomèric (de l'anglès, Enantiomeric Factor).

EI – Ionització electrònica (de l'anglès, Electronic ionization).

FAO – Organització de les Nacions Unides per l'Alimentació i l'Agricultura.

FDA – Food and Drug Agency.

FMIP – Impressió molecular fluorescent de polímers (de l'anglès, Fluorescence Molecularly Imprinted Polymers).

FPBA – àcid 4-fluoro-3-fenoxibenzoic.

GC – Cromatografia de gasos.

K_{ow} – Coeficient de repartició octanol-aigua.

LC – Cromatografia líquida.

LC₅₀ – Concentració mitjana letal (de l'anglès, half Lethal Concentration).

LLE – Extracció líquid líquid (de l'anglès, Liquid-Liquid Extraction).

LOD – Límit de detecció (de l'anglès, Limit Of Detection).

LOQ – Límit de quantificació (de l'anglès, Limit Of Quantification).

m/z -- Relació massa/càrrega.

MASE – Extracció assistida amb microones (de l'anglès, Microwave-Assisted Solvent Extraction).

MIP – Impressió molecular de polímers (de l'anglès, Molecularly Imprinted Polymers).

MMIP – Impressió molecular magnètica de polímers (de l'anglès, Magnetic Molecularly Imprinted Polymers).

MRL – Límit màxim residual (de l'anglès, Maximum Residue Level).

MS – Espectrometria de masses (de l'anglès Mass Spectrometry).

MS-MS – Espectrometria de masses en tàndem.

MSPD – Dispersió en matriu sòlida (de l'anglès, Matrix Sòlid-Phase Dispersion).

NCI – Ionització química d'ions negatius (de l'anglès, Negative Chemical Ionization).

NOAEL – Dosi d'efecte advers no observable en algun ésser viu (de l'anglès, No Observable Adverse Effect Level).

PBS – solució tampó de fosfat (de l'anglès, Phosphate Buffer Solution).

PLE – Extracció amb líquids pressuritzats (de l'anglès, Pressured Líquid Extraction).

POP – Pol·luents Orgànics Persistents.

ppb – parts per bilió anglosaxó, 10^{-9} .

ppm – parts per milió, 10^{-6} .

QIT – Quadrupol acoblat a una trampa iònica (de l'anglès, Quadrupole Ion Trap).

QqQ – Triple quadrupol.

QuEChERS – Acrònim de ràpid, senzill, barat, efectiu, robust i segur (de l'anglès, Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, Safe).

R – Ratio.

SBSE – Extracció absorbent amb agitació magnètica (de l'anglès, Stir-Bar Sorptive Extraction).

SFE – Extracció amb fluids supercrítics (de l'anglès, Supercritical Fluid Extraction).

SPE – Extracció sòlid líquid (de l'anglès, Solid-Liquid Extraction).

SPME – Microextracció en fase sòlida (de l'anglès, Sòlid-Phase MicroExtraction).

SVOC – Compostos orgànics semi-volàtils (de l'anglès Semi Volatile Organic Compound).

TDI – Ingesta diària tolerable (de l'anglès, Tolerable Daily Intake).

TOC – Carboni orgànic total (de l'anglès, Total Orgànic Carbon).

TOF – temps de vol (de l'anglès Time Of Flight).

UAEE – Extracció d'emulsions assistida per ultra sons (de l'anglès, Ultrasounds-Assisted Emulsification Extraction).

UF – Factor d'incertesa (de l'anglès Uncertainty Factors).

Capítol 1

Introducció

1.1. Els insecticides.

Els insecticides són biocides emprats en molt diferents àmbits amb la finalitat d'eradicar o reduir poblacions d'insectes no desitjats en determinats entorns. Els usos més comuns són els agrícoles i ramaders on gran quantitat d'artròpodes poden malmetre collites i transmetre malalties entre el bestiar. De manera similar, s'empren també en l'àmbit de Salut Pública per a controlar vectors de malalties humanes. Finalment, l'ús domèstic dels insecticides també ha sigut molt habitual en les darreres dècades, ja sia a jardins i interiors, sobre mascotes i fins i tot per al control de paràsits humans.

Tenint present tots aquests usos, la indústria dels insecticides ha desenvolupat diferents compostos sintètics o semi-sintètics amb la finalitat de millorar i potenciar l'activitat insecticida així com combatre resistències que els potencials organismes diana han anat adquirint amb els anys.

Durant les dècades dels 50 i 60 els pesticides organoclorats van ser els més populars en tots els àmbits possibles arreu del món. Malgrat això, amb el pas del temps, van començar a emergir estudis on es va relacionar alguns d'ells amb problemes mediambientals. Arrel d'aquests, es va començar a elaborar tractats internacionals per tal de reduir la producció, l'ús i l'abocament al medi ambient de determinats contaminants. Actualment, la Convenció d'Estocolm regula un llistat de compostos químics anomenats Pol·luents Orgànics Persistents (POPs) l'ús del qual és il·legal en la majoria de països, excepte en casos especials (UNEP & FAO, 2014).

Degut a les legislacions derivades d'aquests acords, sorgeixen nous compostos químics per tal de satisfer les necessitats de les societats actuals. Ara bé, avui dia les demandes són més exigents i la cerca del "insecticida ideal" és contínua. Els candidats formen part de diferents famílies de compostos, com ara els carbamats, els nicotinoïdes, els piretroides o inclús de les famílies dels organoclorats i organofosforats. D'aquestes famílies els piretroides són una de les més prometedores.

Els organofosforats són molècules orgàniques que contenen fòsfor. Actuen inhibint certes colinesterases dels insectes i provocant-li la mort per disfunció neuronal. Aquesta inhibició és irreversible, a diferència d'altres insecticides que també actuen de manera parasimpaticomimètica. Alguns dels representants d'aquest grup són el paration, altament tòxic i actualment prohibit i el malation, substituït de l'anterior.

Els insecticides carbamats són derivats de l'àcid carbàmic (NH_2COOH). Aquest grup actua de forma molt similar als organofosforats però el seu enllaç amb l'acetilcolinesterasa o d'altres proteases similars és reversible de tal manera que els seus efectes tòxics són menors, tot i que, de vegades, importants. L'aldicarb és un exemple de carbamat d'ús restringit per la seva toxicitat.

Els neonicotinoids són derivats de la nicotina, l'efecte insecticida de la qual és força conegut. Aquesta família de compostos també actuen sobre el sistema nerviós tant d'insectes com de mamífers. De la mateixa manera, la nicotina actua estimulants el sistema nerviós degut a la seva natura agonista sobre els receptors d'acetilcolina. Sobre els insectes, que tenen menor nombre d'aquests receptors en el sistema nerviós central, produeix un bloqueig dels "sites" produint paràlisi per sobreestimulació. La toxicitat d'aquests compostos és més baixa que la dels citats anteriorment. Actualment, el imidacloprid és el més utilitzat d'aquesta classe.

Els organoclorats són espècies químiques que es caracteritzen per tenir un gran nombre d'àtoms de clor en la seva estructura. Acostumen a bloquejar o alterar el normal funcionament dels canals de sodi de les cèl·lules nervioses dels insectes. Tot i això, certs insectes, com ara alguns tipus de mosquits, han desenvolupat certa resistència als insecticides que actuen d'aquesta manera. Alguns dels pesticides d'aquest grup són el DDT, el mirex, l'aldrina i el lindà. L'ús agrícola de molts d'ells està prohibit en la majoria de països i són classificats com a POPs. Val a dir, però, que en l'ús farmacèutic i control de plagues amb repercussions per a la Salut Pública alguns d'ells encara es fan servir. Clars exemples d'això poden ser el DDT que alguns països d'Àfrica, on la malària és encara prevalent, es pot continuar emprant; i el lindà que per al tractament de polls i sarna la FDA (Food and Drug Agency) aprova el seu ús.

Els piretroides tenen un mecanisme d'acció que afecta principalment a cèl·lules nervioses. En insectes, aquests compostos alteren, i poden arribar a bloquejar, els canals de sodi cel·lulars, impeding així la correcta sinapsi entre cèl·lules nervioses provocant, per exemple, l'efecte conegut com de "múltiples descàrregues" (de l'anglès *repetitive firing*). Els efectes a nivell organisme pot ser des de paràlisi fins a la mort. Aquest mecanisme, és el mateix, o molt similar, al dels insecticides organoclorats, com per a aquets, també s'han descrit certes resistències per part d'alguns insectes. L'adaptació a aquest tipus d'insecticides sovint inclou una reacció conductual coneguda com *knock down*, la qual consisteix en un estat de paràlisi temporal després del qual el insecte es capaç de recuperar-se.

Els piretroides es caracteritzen per una sèrie de característiques que s'aniran discutint al llarg d'aquesta introducció. Ara bé, cal saber que la seva eficàcia en organismes diana és força

elevada, això és, que la dosi letal sobre la població de individus que es vol eliminar és baixa. Això no obstant, es consideren relativament específics, és a dir, que en general la toxicitat per la resta d'organismes, humans inclosos, acostuma a ser baixa, amb algunes excepcions que ja es comentaran més endavant. A més, es consideren letàrgics però no persistents, raó per la qual poden romandre temps suficient en el medi com per dur a terme el seu objectiu però, amb el temps, es (bio)degraden. Finalment, una raó també prou important per fer dels piretroides uns insecticides desitjables és el baix cost de producció. Amb totes aquestes característiques esmentades, els piretroides són una de les famílies d'insecticides més emprada a tots nivells.

1.2. Els piretroides.

L'extracte de flors de piretre (*Chrysanthemum cinerariifolium*), i d'algunes altres espècies del mateix gènere, és un insecticida i repel·lent natural mundialment conegut des de principis del segle XIX, i fins i tot s'ha documentat el seu ús a la Xina fa més de 2000 anys. Durant els últims anys, països com Kenya i Tanzània han produït milers de tones l'any d'aquest insecticida natural.

Els principis actius d'aquest extracte són uns compostos anomenats piretrines. A partir d'aquestes, s'han sintetitzat d'altres molècules d'estructura molt similar. Els nous compostos derivats s'anomenen piretroides. L'avantatge d'aquests productes sintètics o semi-sintètics és que posseeixen una activitat insecticida superior, ja sigui gràcies a una persistència més elevada en el medi, una selectivitat major de l'organisme diana o fins i tot una toxicitat superior.

Actualment, als EEUU, es comptabilitzen una aplicació anual d'unes 900 tones de permetrina i 450 tones de cipermetrina, dos dels piretroides més comuns, només en usos agrícoles i domèstics. De fet, d'aquestes quantitats, més del 70% de la permetrina i del 85% en el cas de la cipermetrina s'empren en l'àmbit domèstic. Però la indústria dels piretroides no només es limita als EEUU. A Alemanya, per exemple, al 2009 es van etiquetar unes 100 tones de piretroides com a ingredient actiu en productes protectors de les plantes (Pfeil, 2014). D'aquests, els piretroides d'ús domèstic més comú varen ser la β -ciflutrina, la λ -cihalotrina, l'etofenprox, la bifentrina, l' α - i la ξ -cipermetrina, la deltametrina, l'esfenvalerat i la teflutrina. Per últim, no es pot menysprear l'ús per a la Salut Pública d'aquests compostos. En tot el món, es calcula que anualment s'empren unes 520 tones de piretroides dins els programes de control de vectors de malalties com ara malària, dengue, etc (Pfeil, 2014).

Cal esmentar, que també en l'ús agrari i ramader s'empren els piretroides, tot i que el seu ús és regulat per les legislacions vigents, sobretot per les normatives europees i americanes. Com és d'esperar, la majoria de països compleixen aquestes normatives però estudis recents realitzats països com Ghana o Tanzània demostren que els nivells de residus de piretroides en aliments vegetals dels seus mercats poden arribar a ser superiors als de la normativa europea (Blankson et al., 2016; U.S. EPA, 2011; Mahugija et al., 2017), la qual deu ser, per tant, més restrictiva (EC, 1991). Tot i així, un cop avaluat el risc d'aquests nivells per al consumidor, tenint en compte la ingesta real de cada aliment, és difícil trobar casos on els nivells acumulats de piretroides consumits es puguin considerar no segurs i, només considerant el pitjor dels escenaris possibles, en el qual els consumidors s'alimenten bàsicament dels productes més contaminats (Z. X. Li et al., 2016).

Un altre dels usos habituals dels piretroides és en aquicultura. En les darreres dècades l'ús de piscifactories ha augmentat considerablement i, en dades de 2012, la FAO (Organització de les Nacions Unides per l'Alimentació i l'Agricultura) estimava que el 42% del peix consumit a nivell mundial provenia d'aquest tipus de procediment tecnològic, el que suposa uns 66,6 milions de tones l'any (FAO, 2014). El fet de tenir molts peixos confinats en un espai reduït implica la necessitat de productes com ara antibiòtics i pesticides per tal d'evitar malalties i propagació d'epidèmies dins el piscicultiu. En aquest sentit, els piretroides juguen un important paper ja que, com a insecticides que són, s'ha comprovat la seva eficàcia en la cria del salmó, per exemple. Estudis recents han demostrat que el medi contigu a aquestes piscifactories s'hi acumulen residus de piretroides (SEPA, 2007; Tucça et al., 2017). En el cas de la salmonicultura, és molt habitual l'ús de la cipermetrina i la deltametrina, raó per la qual en sòls propers i en organismes o altres cultius confrontants, com ara de musclos, s'hi ha demostrat la presència d'aquests piretroides (Gowland et al., 2002; Tucça et al., 2017).

1.2.1 Estructura.

Les piretrines naturals són èsters derivats de l'àcid crisantèmic. La [figura 1](#) mostra l'estructura d'aquest àcid ([Figura 1a](#)) i la seva relació amb l'anomenada piretrina I ([Figura 1b](#)). Com ja s'ha comentat, els piretroides són productes derivats d'aquestes molècules. Malgrat que l'estructura bàsica dels piretroides és semblant, es diferencien dos grups, els de tipus I i els de tipus II. Aquests últims es caracteritzen per tenir un grup ciano a la posició α del grup alcohol·lic de l'èster, mentre que els piretroides tipus I no tenen aquest grup. A la [Figura 1c](#) i [1d](#) se'n mostren les estructures generals més comunes d'aquestes molècules.

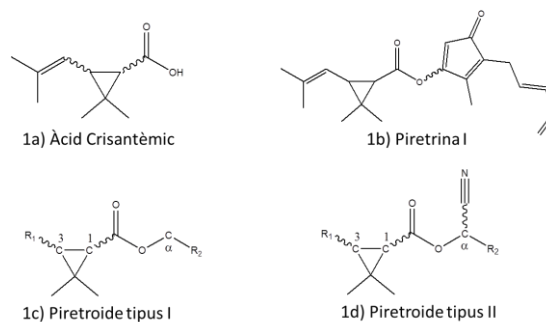


Figura 1: Estructures relacionades amb els compostos estudiats.

Val a dir, però, que hi ha una sèrie de piretroides de nova generació que tot sovint han perdut l'anell propílic característic de l'estructura de l'àcid crisantèmic bàsic. Tot i això, aquests es poden continuar classificant com a piretroides de tipus I o II segons si contenen el grup ciano en la posició concreta esmentada. Per exemple, el fenvalerat, el flucitrinat i el fluvalinat, que es consideren tipus II, o el halfenprox i el etofenprox que podrien considerar-se tipus I, com es pot comprovar a la [Taula 1.1](#) (els dos últims els hem considerat a part perquè han perdut completament les seves propietats isomèriques).

L'estructura química de cada piretroide i, com a conseqüència, el tipus de piretroide, té efectes importants en el isomerisme i la toxicitat, entre d'altres, d'aquestes molècules. Per tant, a continuació s'aprofundirà més en el tema.

1.2.2 Isomeria.

Els isòmers són estructures moleculars diferents sobre una mateixa composició elemental. Això pot donar casos de molècules que tot tenint la mateixa fórmula empírica tinguin propietats completament diferents. De isomeria n'hi ha de diferents tipus, però principalment podem diferenciar la isomeria estructural i l'estereoisomeria. La primera es refereix a compostos químics diferents que comparteixen una mateixa fórmula empírica mentre que l'estereoisomeria es dona com a variacions d'un mateix compost químic. La isomeria que ens interessa estudiar en el cas dels piretroides és aquesta última ja que d'un mateix piretroide es coneixen diferents isòmers amb propietats lleugerament diferents, tot i pertànyer a un mateix compost.

L'estereoisomeria, al seu torn, també té diverses causes, principalment dues. Una és la que provoca la isomeria geomètrica. Aquesta es presenta quan una estructura rígida (com ara un doble enllaç o un anell cíclic) té substituents diferents, és a dir, no es repeteixen. Depenent de la disposició dels substituents es parla de isòmers *cis* i de isòmers *trans* dins aquesta classificació. La segona causa de estereoisomeria és la quiralitat. Quan un àtom tetravalent,

com ara el de carboni, té 4 substituents diferents aquest carboni es diu que és quiral. Això és perquè l'estructura resultant de la seva imatge especular no és superposable a la seva estructura original. Dit d'una altra manera, depenent de la disposició espacial dels substituents es tracta d'un isòmer o d'un altre. Aquest tipus d'isomeria s'anomena isomeria òptica o enantiomeria i provoca sempre dos isòmers diferents, un la imatge especular de l'altre, que s'anomenen enantiòmers o parell enantiomèric per a referir-se a ambdós alhora.

La nomenclatura dels centres quirals i dels enantiòmers poden ser diferents segons els criteris emprats. Segons l'activitat òptica, es poden classificar en enantiòmers (+) o (-) segons si polaritzen el pla de la llum en sentit horari o antihorari. Tot i així, donat que en el cas dels piretroides tenim diversos centres quirals, preferim un altre tipus de nomenclatura. La que en la present tesi farem servir és la nomenclatura R/S. En aquesta cada centre quiral, per definició, té dues formes possibles, la R i la S. Aquest s'assigna segons l'ordre dels substituents del carboni quiral. Primer, cal donar un ordre de prioritats als substituents assignant-ho segons les regles de Cahn-Ingold-Prelog, relacionades amb el nombre atòmic dels àtoms que el conformen. El substituent amb menor prioritats se situa a la banda contrària a l'observador i els altres 3 substituents queden directament exposats. Si per seguir l'ordre de prioritats en sentit creixent d'aquests tres substituents cal seguir el sentit horari el centre quiral és R (Rectus, del llatí dreta) mentre que si el sentit a seguir és antihorari es tracta d'un centre S (Sinister, del llatí esquerra).

Com es pot comprovar a la [figura 1](#), l'estructura general dels piretroides inclou un anell propílic, que és una estructura rígida, provocant isomeria geomètrica. En aquest cas parlem de isòmers *cis* i *trans* de piretroides concrets segons la orientació dels substituents (per exemple, *cis*-bifentrina o *trans*-tetrametrina). Com que els dos àtoms de carboni implicats en aquesta isomeria també són quirals, els piretroides presenten, a més, enantiomeria. És a dir, cada piretroide *cis* i cada piretroide *trans*, en realitat, està format per un parell enantiomèric. D'aquesta manera, parlem de 4 isòmers diferents, sabent que són dos parells enantiomèrics, per a un piretroide on tota la seva isomeria sigui donada només per l'anell propílic. Aquest és el típic cas d'un piretroide tipus I (veure [Figura 1c](#)).

Nogensmenys, els piretroides tipus II tenen encara un tercer centre quiral. Això implica que per a cadascun dels 4 isòmers ja esmentats tenim possibilitat de que el tercer centre quiral tingui 2 disposicions diferents, és a dir, un piretroide tipus II té un total de 8 isòmers o 4 parells enantiomèrics. Generalitzant més, la combinatòria diu que el nombre d'isòmers òptics d'una molècula quiral és igual a 2^n , on n es el nombre de centres quirals. Així doncs, els piretroides

tipus I, que tenen dos centres quirals, tenen 4 isòmers, com ja s'ha justificat i, evidentment, els tipus II, que tenen 3 centres quirals, tenen 8 isòmers, com també s'ha vist. Vist amb aquesta fórmula i entenent la procedència i la diferència entre isòmers, d'altres piretroides que no s'ajusten a l'estructura general com ara el halfenprox o fins i tot el fenvalerat, que no té l'anell propílic, també es pot saber de forma ràpida el nombre d'isòmers geomètrics i òptics que tenen.

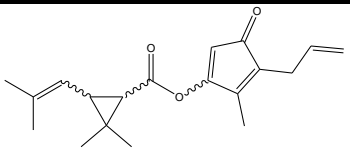
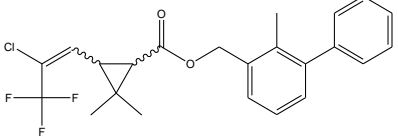
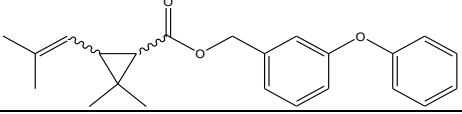
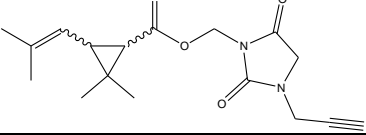
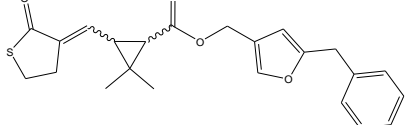
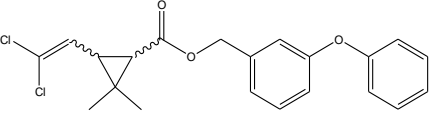
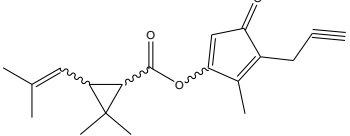
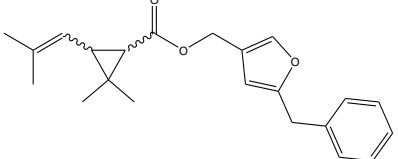
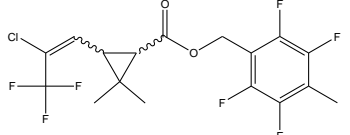
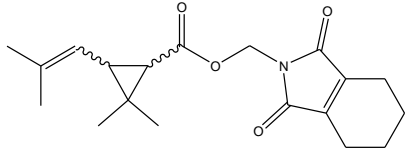
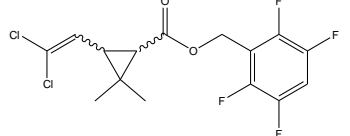
Sovint, per diferenciar si ens referim a isòmers enantiomèrics o a la suma d'isòmers en general, en aquesta tesi farem servir el terme "diastereoisòmer" o "diastereòmer" per a referir-nos a tots aquells isòmers no necessàriament enantiomèrics, mentre que reservarem el mot "enantiòmer" a la seva definició estricta, és a dir per fer referència únicament a la distinció d'isòmers que formen parells enantiomèrics i són, doncs, imatges especulars.

Per a fer referència a enantiòmers concrets de piretroides hi ha diferents tipus de nomenclatura. Exceptuant els parells enantiomèrics amb nom propi (com ara l'esbiotrina i l'esfenvalerat que són parells enantiomèrics corresponents a la fixació d'un carboni quiral de l'al·letrina i del fenvalerat respectivament en el seva posició S) generalment, es prefereix una nomenclatura completa en la que s'indica la posició de cada centre quiral. Un exemple podria ser, la (1-S,3-R) – tetrametrina o la (1-R,3-R, α -S) – ciflutrina. Com aquesta nomenclatura és molt feixuga, tot sovint en aquesta tesi es farà una petita simplificació segons la qual els enantiòmers esmentats serien el (1S,3R) de la tetrametrina i el (1R,3R, α S) de la ciflutrina.

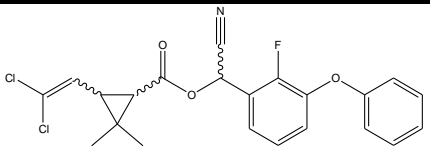
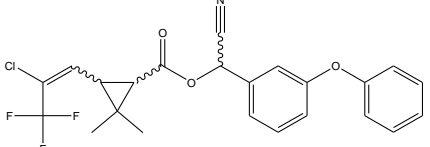
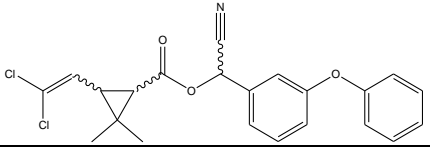
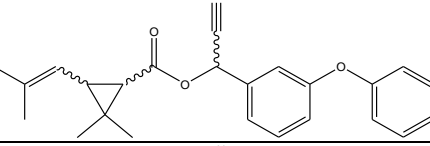
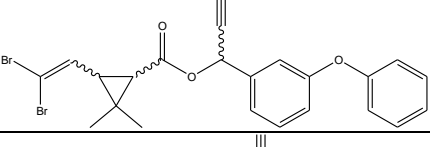
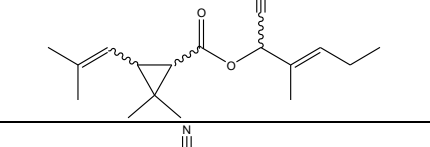
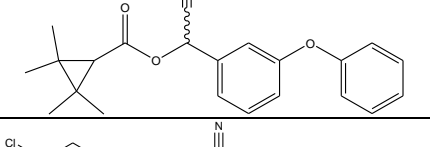
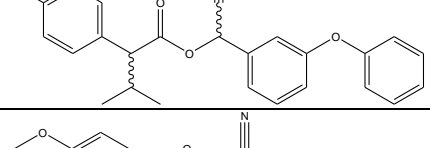
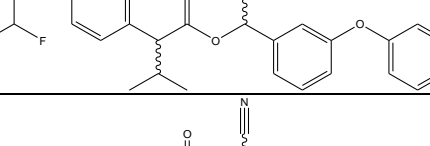
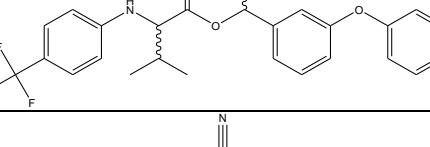
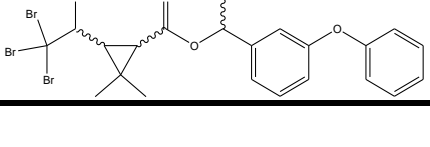
1.2.3 Propietats físico-químiques.

En l'estudi de tota substància és bàsic conèixer les seves propietats físico-químiques per tal d'entendre i, en alguns casos predir, el seu comportament dins el sistema estudiat. La [Taula 1.1](#), ens mostra algunes d'aquestes propietats que tot seguit es desenvolupen. Tot i que a la taula no s'indiquen tots els piretroides coneguts (la família dels piretroides és encara en expansió i sorgeixen de nous contínuament), s'hi inclouen aquells més importants tant per l'ús que se'n fa com per la quantitat d'estudis trobats a la bibliografia. Derivat d'això, tots aquells piretroides que s'estudien en aquesta tesi s'inclouen a la taula.

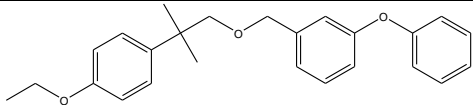
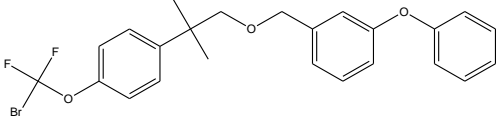
Taula 1.1: Classificació dels piretroides, estructura i propietats físico-químiques bàsiques (dades extretes de (UH, 2011)).

| Piretroides Tipus I | Estructura Molecular | N. parells enantiomèrics | Pes molecular (g mol ⁻¹) | log K _{ow} | Solubilitat en aigua (mg L ⁻¹) | DT ₅₀ (dies) |
|---------------------|---|--------------------------|--------------------------------------|---------------------|--|-------------------------|
| Al-letrina |  | 4 | 302.4 | 4.96 | 10 ⁻⁴ | 60 |
| Bifentrina |  | 2 | 422.9 | 6.6 | 10 ⁻³ | 26 |
| Fenotrina |  | 2 | 350.5 | 6.01 | 9.7·10 ⁻³ | 1 |
| Imiprotrina |  | 2 | 318.4 | 2.43 | 93.5 | 5 |
| Kadetrina |  | 2 | 396.5 | - | - | - |
| Permetrina |  | 2 | 391.3 | 6.10 | 0.2 | 13 |
| Pral-letrina |  | 4 | 300.4 | 4.49 | 8.03 | - |
| Resmetrina |  | 2 | 338.4 | 5.43 | 10 ⁻² | 30 |
| Teflutrina |  | 2 | 418.7 | 6.40 | 1.6·10 ⁻² | 37 |
| Tetrametrina |  | 2 | 331.4 | 4.60 | 1.83 | 3 |
| Transflutrina |  | 2 | 371.2 | 5.46 | 5.7·10 ⁻² | - |

Taula 1.1: Classificació dels piretroides, estructura i propietats físico-químiques bàsiques (dades extretes de (UH, 2011))(continuació).

| Piretroides Tipus II | Estructura | N. parells enantiomèrics | Pes molecular (g mol ⁻¹) | log K _{ow} | Solubilitat en aigua (mg L ⁻¹) | DT ₅₀ (dies) |
|----------------------|---|--------------------------|--------------------------------------|---------------------|--|-------------------------|
| Ciflutrina |  | 4 | 453.3 | 6.00 | 6.6·10 ⁻³ | 33 |
| Cihalotrina |  | 4 | 449.9 | 6.80 | 4·10 ⁻³ | 57 |
| Cipermetrina |  | 4 | 416.3 | 5.30 | 9·10 ⁻³ | 60 |
| Cifenotrina |  | 4 | 375.5 | 6.62 | 10 ⁻² | - |
| Deltametrina |  | 4 | 505.2 | 4.60 | 2·10 ⁻⁴ | 13 |
| Empentrina |  | 4 | 274.4 | 6.21 | 0.11 | - |
| Fenpropatrina |  | 1 | 349.4 | 6.04 | 3.3·10 ⁻¹ | 34 |
| Fenvalerat |  | 2 | 419.9 | 5.01 | 10 ⁻³ | 44 |
| Flucitrat |  | 2 | 541.5 | 4.70 | 0.5 | 60 |
| Fluvalinat |  | 2 | 502.9 | 3.85 | 2·10 ⁻³ | 4 |
| Tralometrina |  | 4 | 665.0 | 5.00 | 8·10 ⁻² | 3 |

Taula 1.1: Classificació dels piretroides, estructura i propietats físico-químiques bàsiques (dades extretes de (UH, 2011)) (continuació).

| Altres piretroides | Estructura | N. parells enantiomèrics | Pes molecular (g mol ⁻¹) | log K _{OW} | Solubilitat en aigua (mg L ⁻¹) | DT ₅₀ (dies) |
|--------------------|---|--------------------------|--------------------------------------|---------------------|--|-------------------------|
| Etofenprox |  | 0 | 376.5 | 6.90 | 2.25·10 ⁻² | 11 |
| Halfenprox |  | 0 | 477.3 | 7.70 | 5·10 ⁻⁵ | 10 |

K_{OW}: coeficient de partició octanol-aigua.

DT₅₀: Temps de degradació mig.

Tot i que al referir-se als piretroides cal matisar que hom es refereix a un conjunt molt nombrós i relativament heterogeni de compostos, es pot generalitzar sobre algunes de les seves propietats físico-químiques bàsiques. Una de les que més ens afecta a la present tesi, és la seva hidrofobicitat. Tots els piretroides tenen coeficients de repartició octanol-aigua (K_{OW}) amb valors entre 10⁴ i 10⁷, aproximadament. Això implica que la seva afinitat serà major sempre amb les substàncies relativament apolars, amb els dissolvents orgànics i amb substrats biològics més que no pas amb aquelles substàncies més polars, dissolvents aquosos i substrats inorgànics, respectivament.

Una altra de les propietats que més importància té dins el context d'aquest estudi és la persistència en el medi ambient. Aquesta és clau a l'hora de legislar i normativitzar compostos que s'avoquen al medi ambient. Com a demostració d'aquest fet, es pot citar el cas d'altres compostos insecticides organoclorats com el DDT o el mirex que, a més de la seva toxicitat, la seva llarga persistència provocava grans problemes mediambientals que van promoure la seva substitució per altres tipus de insecticides i productes.

La persistència dels contaminants ambientals se sol relacionar amb el temps necessari per a degradar una quantitat específica de producte respecte de la inicial i es coneix com a temps de degradació (DT_x, de l'anglès "degradation time", on X indica el percentatge de substància degradada). Concretament, molts autors i autoritats parlen de la vida mitjana d'un compost referint-se al DT₅₀, és a dir, el temps en que la meitat del producte s'ha degradat. Les organitzacions internacionals consideren que una substància contaminant es pot considerar persistent si el seu DT₅₀ és superior a 90 dies. En el cas dels piretroides, però, és important remarcar que habitualment la seva vida mitjana és inferior als 3 mesos. De fet, alguns d'ells tenen DT₅₀ de pocs dies. La relativa fotosensibilitat d'aquests compostos i la seva fàcil hidrolització poden explicar el perquè als estudis de degradació es determinen un DT₅₀ tan

baixos. Amb tot, es conclou que, en la gran majoria de casos, els piretroides no es poden considerar com a substàncies persistents.

En contra d'aquests fets, estudis recents demostren la presència de piretroides en diferents matrius ambientals com ara aigües de riu i sediments (M. L. Feo, Ginebreda, Eljarrat, & Barcelo, 2010; Xue, Xu, & Jin, 2005) i fins i tot en humans (Bouwman et al., 2006; Channa et al., 2012) i animals (dell'Oro et al., 2014; Gowland et al., 2002). L'explicació més plausible és que degut al gran ús, tal vegada abusi, d'aquests productes, entren als ecosistemes a tal velocitat que no hi ha temps per a la seva degradació completa, de tal manera que sempre hi ha una quantitat més o menys residual de insecticida en el medi. Amb d'altres contaminants ambientals amb què s'ha demostrat aquest fet, s'ha considerat una nova classificació de pol·luents anomenats *pseudo*-POPs (Daughton, 2004). Aquests es caracteritzen per ser contaminants que es troben en el medi ambient de forma continuada, tot i que no compleixen amb els requeriments de persistència en el medi ambient per tal de ser considerats POPs. Un clar exemple d'aquests són alguns fàrmacs i productes de higiene personal (Bu, Shi, Yu, Huang, & Wang, 2016; Daughton, 2003). Els problemes que aquests presenten són diferents als dels POPs ja que sovint no tenen les mateixes propietats de bioaccumulació i biomagnificació, però degut a la seva interferència en el metabolisme dels éssers vius, ja sigui del propi compost o d'algun metabòlit, creen grans problemes als ecosistemes.

1.3. Toxicitat dels piretroides.

Com a biocides que són, els piretroides no són innocus per als ecosistemes. Evidentment, els insectes són els éssers més afectats per aquests compostos ja que són els organismes diana. En aquests, la interferència sobre els canals de sodi i, per tant, en el seu sistema nerviós, és tan efectiva que arriba a ser letal. Aquest efecte tan pot ser per la ingesta del producte com pel contacte directe amb el mateix. Això no obstant, tradicionalment es considera que els piretroides són insecticides força específics, és a dir, que a part dels organismes diana, afecta poc o gens a altres éssers, amb algunes excepcions.

Per a mesurar la toxicitat de les substàncies en els organismes s'utilitzen diferents paràmetres. Entre els més estudiats estan el EC_{50} (de l'anglès, half maximum effect concentration) i el LC_{50} (de l'anglès, half lethal concentration). El primer fa referència a la concentració a la qual la substància obté el 50% del resultat desitjat. El segon terme és la concentració a la qual una substància és letal per a la meitat de la població. Com que l'efecte esperat en un piretroide és que mati els invertebrats, per a insectes es parla de EC_{50} mentre que hom es refereix a LC_{50} quan es refereix a efecte sobre mamífers, per exemple, entenent,

però, que es tracta de dades completament equivalents. D'altres casos menys evidents, com ara amb crustacis aquàtics, els autors anomenen aquesta dada toxicològica dels piretroides com LC_{50} o EC_{50} depenent de l'objectiu de l'estudi. En la [Taula 1.2](#), es presenten valors d'aquestes dades de toxicitat per a 3 organismes diferents.

Com a excepció a l'especificitat biocida dels piretroides, és destacable la dels ecosistemes aquàtics. Els invertebrats d'aquests medis solen patir conseqüències mortals en contacte amb aquestes substàncies a concentracions baixes de piretroides en aigua (inferiors als $\mu\text{g L}^{-1}$) (Gowland et al., 2002). A més de l'efecte negatiu sobre l'ecosistema que això produeix, els propis peixos solen ser també força sensibles a l'efecte neurotòxic d'aquests contaminants, tot i que depèn de l'espècie i del piretroides concret que l'efecte sigui mortal (Amin & Hashem, 2012; Goulding, Shelley, Ross, & Kennedy, 2013; Richterova et al., 2014). Alguns piretroides com la bifentrina, a més, poden tenir efectes de disruptors endocrins per als peixos a nivells no letals (J. S. Li, Luo, Liu, Ruan, & Wang, 2017). Per posar un exemple de la diferència toxicològica entre espècies dins aquest ecosistema, segons la [Taula 1.2](#), el EC_{50} d'un crustaci com ara la puça d'aigua (*Daphnia Magna*) per a la cipermetrina és de $0,0003 \text{ mgL}^{-1}$; per a un altre crustaci com ara la gambeta anglesa (*Americamysis bahia*) el LC_{50} és de $0,005 \text{ mgL}^{-1}$; mentre que per a una truita irisada (*Oncorhynchus mykiss*) és de $0,39 \text{ mgL}^{-1}$. Ara bé, d'un piretroides a un altre, tot i ser de la mateixa família, els valors d'aquestes concentracions també són molt diversos i sovint un mateix piretroides per a una espècie pot ser més tòxic mentre que per a una altre la toxicitat disminueix. Per exemple, la tetrametrina és menys tòxica per a la puça d'aigua (EC_{50} de $0,045 \text{ mgL}^{-1}$) que no pas la cipermetrina esmentada abans, però per a la truita irisada és més letal la tetrametrina (LC_{50} de $0,016 \text{ mgL}^{-1}$).

Donat que aquest ecosistema és molt susceptible a la presència de piretroides, la legislació tant internacional com local fa referència a l'ús d'aquests insecticides. Per exemple, a Regne Unit, es limita la concentració de permetrina i ciflutrina a la columna d'aigua en $0,01$ i $0,001 \mu\text{gL}^{-1}$ respectivament (Cole, Codling, Parr, & Zabel, 1999).

En mamífers, però, la toxicitat d'aquests compostos és molt més baixa, generalment. Les concentracions de dosis de toxicitat aguda de piretroides acostumen a ser d'uns centenars de mil·ligrams per kilogram de pes corporal (UH, 2011). Això és degut a que habitualment els piretroides són fàcilment metabolitzables per les carboxilases i pels sistemes de destoxicació relacionats amb el citocrom P450 i excretats per la orina com a metabòlits directes o algun derivat glicosídic. Com a conseqüència, els efectes de toxicitat aguda, per exemple, en humans acostumen a descriure episodis d'urticària, problemes gàstrics o respiratoris i molt rarament

Taula 1.2: Toxicitat dels piretroides per a organismes aquàtics en mgL⁻¹ (dades extretes de (UH, 2011).

| Piretroides Tipus I | <i>Daphnia magna</i> EC ₅₀ (Custaci) | <i>Americamysis bahia</i> LC ₅₀ (Crustaci) | <i>Oncorhynchus mykiss</i> LC ₅₀ (Peix) |
|-------------------------|---|---|--|
| Al·letrina | 2.1·10 ⁻² | - | 19 |
| Bifentrina | 1.1·10 ⁻⁴ | 4·10 ⁻³ | 0.15 |
| Fenotrina | 4.3·10 ⁻³ | 2·10 ⁻⁵ | 2.7·10 ⁻³ |
| Imiprotrina | 5.1·10 ⁻² | - | 3.8·10 ⁻² |
| Kadetrina | - | - | - |
| Permetrina | - | 0.02 | 0.62 |
| Pral·letrina | 6.2·10 ⁻³ | - | 1.2·10 ⁻² |
| Resmetrina | 3.7·10 ⁻³ | - | - |
| Teflutrina | 7·10 ⁻⁵ | 5·10 ⁻⁵ | 6·10 ⁻⁵ |
| Tetrametrina | 4.5·10 ⁻² | - | 1.6·10 ⁻² |
| Transflutrina | - | - | - |
| Piretroides Tipus II | <i>Daphnia magna</i> EC ₅₀ (Custaci) | <i>Americamysis bahia</i> LC ₅₀ (Crustaci) | <i>Oncorhynchus mykiss</i> LC ₅₀ (Peix) |
| Ciflutrina | 1.4·10 ⁻⁴ | 0.0024 | 0.3 |
| Cihalotrina | 0.38 | - | 0.24 |
| Cipermetrina | 3·10 ⁻⁴ | 0.005 | 0.39 |
| Cifenotrina | 4.3·10 ⁻⁴ | - | 3.4·10 ⁻⁴ |
| Deltametrina | 5.6·10 ⁻⁴ | 0.0017 | 0.25 |
| Empentrina | 2·10 ⁻² | - | >1.7·10 ⁻³ |
| Fenpropatrina | 5.3·10 ⁻⁴ | - | 2.3·10 ⁻³ |
| Fenvalerat | - | 3.8·10 ⁻² | 7·10 ⁻² |
| Flucitrinat | 8.3·10 ⁻³ | 8.3·10 ⁻² | 0.32 |
| Fluvalinat | 7.4·10 ⁻² | 2.9·10 ⁻³ | - |
| Tralometrina | 3.8·10 ⁻⁵ | - | 1.6·10 ⁻³ |
| Altres piretroides | <i>Daphnia magna</i> EC ₅₀ (Custaci) | <i>Americamysis bahia</i> LC ₅₀ (Crustaci) | <i>Oncorhynchus mykiss</i> LC ₅₀ (Peix) |
| Etofenprox | 1.2·10 ⁻³ | - | 2.7·10 ⁻³ |
| Halfenprox | 3.1·10 ⁻⁵ | - | - |

inclouen convulsions i efectes neurotòxics en casos d'exposició directa i manipulació de grans quantitats de producte. Tot i així, donat que els tipus I i II es metabolitzen diferent, els quadres clínics per intoxicació per ambdós tipus de piretroides és diferent, a saber, amb el tipus I es provoquen tremolor fina, híper-excitabilitat, atàxia i, excepcionalment, convulsions i paràlisis; mentre que amb tipus II irritabilitat, hipersensibilitat a estímuls externs, convulsions i sialorrea, majoritàriament (San Román, 2003). Estudis recents demostren que a dosis relativament habituals de ingesta o contacte amb piretroides, el risc toxicològic és molt baix i els casos de intoxicació poc habituals (Chedik et al., 2017). Tot i així sí que de tant en tant es descriu algun cas rar d'intoxicació per piretroides.

D'altra banda, sí que s'han descrit problemes toxicològics puntuals en alguns mamífers. Un exemple molt evident d'aquest fet és la letalitat de la permetrina per als gats (*Felis silvestris catus*). L'explicació de la seva indefensió davant aquest efecte rau, probablement en la diferent via metabòlica que tenen els gats per a la destoxicació de substàncies estranyes. Com s'ha comentat, habitualment els mamífers compten amb enzims, generalment hepàtics, que glicosilen certes substàncies tòxiques. Els gats, però, no tenen una de comú anomenada uridinadifosfat glucuroniltransferasa. Per aquesta raó, el tòxic queda més temps en l'organisme de l'animal i produeix els efectes neurotoxicològics letals, sense que s'arribi a neutralitzar i eliminar via metabolització (Hollmann & Touster, 1962).

En altres vertebrats no mamífers, com ara les aus, sembla ser que els efectes toxicològics també són lleus i la toxicitat només es presenta a concentracions elevades. Per exemple, s'han descrit LC_{50} per a la ciflutrina de l'ordre dels grams per kilogram de pes corporal per a diverses espècies d'aus (Khan, Ahmad, & Khan, 2012). Malgrat això, també en aquest conjunt d'espècies trobem algunes de més sensibles. És el cas per exemple dels canaris (*Serinus canaria*). Els LC_{50} d'aquesta espècie per a la ciflutrina estan calculats entre els 68 i els 274 $mg\ kg^{-1}$ pes corporal (U.S. EPA, 2014).

Ara bé, en parlar de toxicitat no es pot oblidar fer referència a la toxicitat crònica també, és a dir a aquella toxicitat produïda per quantitats d'una substància inferiors a les dosis letals però amb la que l'organisme estudiat entra en contacte de forma repetida al llarg del temps. Aquesta toxicitat no sol ser letal a curt termini sinó que els seus efectes es manifesten perjudicant la salut del ésser viu en estudis a llarg termini. Exemples de substàncies on la seva toxicitat crònica és important estudiar són els disruptors endocrins i els carcinògens, per exemple.

Respecte d'aquest tipus de toxicitat, els piretroides encara estan sota estudi. En ratolins i rates hi ha estudis que demostren que l'exposició a piretroides provoca disminució en la fertilitat i possibles alteracions hormonals (Aouey et al., 2017; Yuanxiang Jin et al., 2012; Yuanxiang Jin et al., 2011; Pawar, Badgujar, Sharma, Telang, & Singh, 2017; Vardavas et al., 2016; S.-Y. Zhang et al., 2008).

Els treballs de toxicitat crònica o a llarg termini en humans, no solen ser conclouents. En part, es pot trobar una explicació d'aquesta ambigüitat dels resultats al tipus d'estudis realitzats en humans. Aquests solen ser estudis de casos i controls o de cohorts. Ambdós tipus tenen força limitacions ja que depenen de mesures indirectes de l'exposició al contaminant, i fins i tot és difícil de saber el compost que s'està avaluant amb exactitud. A més, en els estudis

de casos i controls, el biaix memorístic (*recall bias*) pot alterar significativament els resultats (Bassil et al., 2007). Tot i així, hi ha treballs que apunten a que alguns piretroids poden estar relacionats, per exemple, amb l'augment del nombre de casos de tumors cerebrals en nens (Pogoda & Preston-Martin, 1997) i el del nombre d'aberracions cromosòmiques en poblacions exposades (Sanborn et al., 2007). A més, els experts recomanen comprovar la relació de l'exposició humana a aquests insecticides amb la incidència de malalties coronàries (Han et al., 2017) i neuronals com ara el Parkinson (Hansen et al., 2017), així com l'efecte en edats infantils (Viel et al., 2017).

Recentment, a més, els estudis toxicològics inclouen la toxicitat del compost sobre cultius cel·lulars *in vitro*. Amb aquest tipus d'estudis s'han descrit, entre d'altres, efectes tòxics d'alguns piretroides com ara el fenvalerat en cèl·lules neuronals (Varro, Kovacs, & Vilagi, 2017) o en cèl·lules hepàtiques de ratolins i humans (Edward J. Scollon, Starr, Godin, DeVito, & Hughes, 2009).

Com a mesura de precaució els piretroides s'han inclòs en el llistat de la Unió Europea de substàncies sospitoses de ser disruptores endocrines (EC, 2005). Seguint la mateixa línia d'acció, l'EPA ja va classificar alguns d'ells com a possibles carcinògens humans, alguns d'ells tan comuns com ara la cipermetrina, la permetrina i la bifentrina (Cox, 1996).

Actualment s'estudien noves tècniques per tal de fer els piretroides més selectius i evitar la toxicitat en organismes no diana, respectant, d'aquesta manera, la biodiversitat dels ecosistemes i interferint de manera menys important sobre aquests. Un exemple d'aquestes noves tècniques és la hidrodispersió dels piretroides en nanogotes. Alguns autors apunten que aquesta tècnica podria inclús augmentar l'eficàcia dels piretroides sobre alguns mosquits i larves, és a dir, es podria emprar a dosis encara inferiors. A més, sembla que les nanogotes serien menys tòxiques per a la resta d'organismes no diana (Balaji, Sastry, Manigandan, Mukherjee, & Chandrasekaran, 2017).

1.3.1 Toxicitat vs. isomeria.

Per tal de finalitzar amb el tema de toxicitat dels piretroides, cal destacar que, com es pot veure a la [Figura 1](#), l'estructura d'aquests insecticides té diversos centres quirals, raó per la qual tenen factors isomèrics que cal tenir en compte. De fet, diversos estudis sobre toxicitat de piretroides centren els seus esforços en diferenciar l'isòmer concret que provoca els efectes adversos o, si és el cas, quina és la forma isomèrica més perjudicial per a l'ésser estudiat (Yuanxiang Jin et al., 2012; Y. Jin et al., 2016; S.-Y. Zhang et al., 2008). Per tant, doncs, és

important entendre bé la isomeria dels piretroides per tal de ser capaç de continuar aprofundint en la toxicitat.

De fet, és sabut que la toxicitat està íntimament lligada amb la isomeria i, per tant, cada isòmer té una capacitat toxicològica pròpia. Basant-se en això, la indústria dels piretroides crea les diferents mescles comercials amb isòmers d'un mateix piretroide i força vegades contenen només els isòmers més actius o una barreja d'aquests. D'altres mescles comercials, però, prefereixen les proporcions establertes dels diferents isòmers s'expliquen segons altres factors com ara la isomero-especificitat durant la síntesi.

L'explicació a per què determinats isòmers són més actius/tòxics pot ser, en part, a la facilitat de degradació enzimàtica dins l'organisme, que sovint es estèreo-selectiva (Huang, Fleming, Nishi, Redinbo, & Hammock, 2005). Estudis de toxicitat en ratolins, rates i microsomes d'aquests animals, o fins i tot d'humans, han demostrat que certs piretroides com la bifentrina i la permetrina acostumen a mostrar més toxicitat degut als seus isòmers *cis* que no pas als *trans* (Y. Jin et al., 2016; Tange et al., 2014; S.-Y. Zhang et al., 2008).

Tot i així, donat que els isòmers *cis* consten, en realitat, d'un parell enantiomèric, cal saber que també hi ha un dels enantiòmers més tòxic que l'altre. D'altres estudis se centren en demostrar-ho per als mateixos piretroides estudiats amb la isomeria geomètrica (Yuanxiang Jin et al., 2012; Y. Jin et al., 2016; X. Lu, 2013; L. Wang et al., 2007; M. Zhao et al., 2014), però també amb d'altres com ara la cipermetrina (Diao, Xu, Liu, Lu, & Zhou, 2011; Xu, Tu, Lou, Hong, & Zhao, 2010; Q. Zhang et al., 2012). En principi, observant els resultats d'aquests estudis sembla que els isòmers *S-cis* dels piretroides tipus I podrien ser els més tòxics, però no és fàcil de generalitzar ja que, per exemple, el isòmer més actiu de la tetrametrina és *trans*, concretament el (1R-3S)-tetrametrina. En cas de piretroides tipus II és més difícil encara generalitzar. Això, per tant, implica que depenent de cada piretroide i del metabolisme de cada ésser viu el isòmer més tòxic pot variar i cal estudiar cada cas en concret.

Altres estudis que estudien el catabolisme dels piretroides apunten tots cap a la mateixa direcció: els isòmers *trans* de la majoria de piretroides es metabolitzen més ràpidament que els *cis* però la proporció enantiomèrica depèn de cada espècie (Huang et al., 2005; Nakamura et al., 2007; Edward J. Scollon et al., 2009).

Estudis referents a la metabolització dels piretroides i dels efectes d'aquesta indiquen que la toxicitat dels seus metabòlits pot arribar a ser fins i tot més problemàtica que els compostos inicials. També en aquest cas, però, sembla que la toxicitat dels metabòlits provinents de

compostos *cis* és més alta que els *trans* donat el caràcter estrogènic i anti-andrògenic d'aquests productes (R. Lavado et al., 2014; Tange et al., 2014).

1.4. Metabolització dels piretroides.

Els piretroides són èsters que els mamífers i d'altres éssers vius poden metabolitzar per les rutes habituals detoxificants de xenobiòtics. Com que aquestes són molt variades i depenen de cada espècie, aquí només es presentarà la base general de la detoxificació en humans, sabent, però, que per a molts altres mamífers les rutes són equivalents. En altres organismes com ara bacteris o fongs, els piretroides poden servir de substrat nutritiu i les rutes són completament diferents.

En humans l'òrgan encarregat de la detoxicació és el fetge tot i que d'altres òrgans i teixits poden tenir –i de fet tenen- alguns dels enzims necessaris per tractar xenobiòtics. En el fetge, la detoxicació de xenobiòtics lipofílics se sol donar en dues fases. La primera tracta de produir metabòlits on es modifiquen alguns grups funcionals de la molècula augmentant la seva polaritat. Exemples d'aquestes modificacions poden ser la hidroxilació, la desaminació o N-oxidació. La segona fase tracta de conjuguar aquests metabòlits amb productes endògens de la cèl·lula, com ara grups metil, acetil, monosacàrids o aminoàcids. Amb aquesta addició, en la majoria de casos, la solubilitat augmenta encara més i els metabòlits es poden excretar via urinària sense gaires interferències més en l'organisme.

En la Fase I, per al cas dels piretroides, trobem dues rutes diferenciades. Una d'elles és mitjançant carboxilesterases. Com indica el seu nom, aquests enzims tenen la funció d'actuar sobre grups èster. La seva acció provoca l'aparició de dos metabòlits que corresponen a la formació de l'àcid carboxílic corresponent més l'alcohol. Per exemple, per al cas de la permetrina, les carboxilesterases donarien lloc als metabòlits coneguts com a àcid 3-2,2-diclorovinil-2,2-dimetilciclopropano-1-carboxílic (DCCA) i el 3-fenoxibenzol el qual, després d'una oxidació posterior, dóna lloc a l'àcid 3-fenoxibenzoic (3-PBA) (Sato & Hosokawa, 1998).

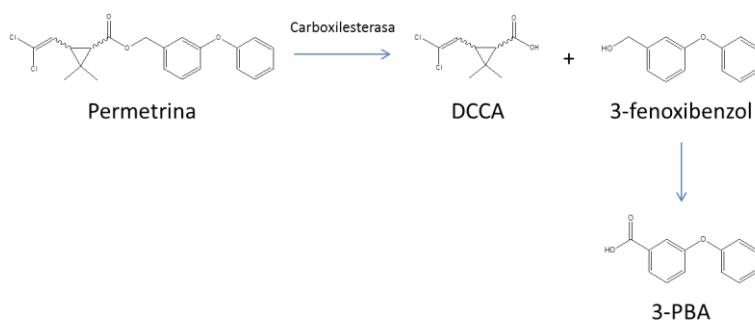


Figura 2: Metabolització de la permetrina mitjançant carboxilases i oxidació posterior de l'alcohol.

Generalment, hi ha diferents tipus de carboxilesterases. Les encarregades de tractar compostos xenobiòtics com els piretroides en humans solen ser les de tipus 1. Tot i que al fetge se'n troben en major quantitat, en mamífers els nivells en plasma d'aquests enzims sol ser relativament més elevat que en peixos o aus (Hosokawa, Maki, & Satoh, 1990). Aquesta podria ser una explicació senzilla i molt simplificada del perquè en peixos els piretroides presenten major toxicitat. Malgrat això, cal destacar que hi ha altres vies de metabolització que poden explicar aquest fet.

Val a dir, però, que les carboxilesterases es presenten com a diferents isoenzims, és a dir, el mateix enzim general que catalitza la mateixa reacció es pot sintetitzar amb diferents isoformes. La presència o proporció de determinats isoenzims pot variar segons factors com ara l'espècie i l'individu o fins i tot el sexe i l'edat (Cantalamessa, 1993; Hosokawa et al., 1990). Cada isoenzim pot tenir una activitat diferent respecte als isòmers de cada piretroide concret, i per tant, el fet de metabolitzar més o menys un determinat isòmer de piretroides concrets podria venir determinat no només per l'espècie estudiada sinó també per factors com ara si l'individu és adult, infant o lactant (Huang et al., 2005). Tot això afecta directament a la toxicitat que pugui presentar cada compost.

L'altra via de metabolització, encara en Fase I, és la hidroxilació mitjançant monooxigenases, concretament el citocrom P450. Aquest, bàsicament, hidroxila el piretroide. En l'exemple de la permetrina, la hidroxilació donaria lloc a la permetrina hidroxilada en la posició 4 del grup fenoxibenzílic. De fet, sovint les dues rutes metabòliques, mitjançant carboxilesterases i monooxigenases, són complementàries. Això dona productes secundaris com ara el 4-hidroxi-3-fenoxibenzol i el 4-hidroxi-3-fenoxibezaldehyd (Tange et al., 2014).. Aquests productes hidroxilats semblen tenir efectes com a disruptors endocrins en major mesura que no pas els no hidroxilats (R. Lavado, J. Li, J. M. Rimoldi, & D. Schlenk, 2014; R. Lavado et al., 2014; Tange et al., 2014).

1.5. Legislació.

Per tot el que s'ha esmentat, la legislació actual regula els nivells permesos de residus de piretroides en aliments. La [Taula 1.3](#), relata la permissivitat de la Unió Europea en front d'un llistat de piretroides força comuns. A més, també es relaciona amb el límit màxim residual de piretroide en el aliment (MRL, de l'anglès, maximum residue level), concretament en llet de vaca comercial. Per últim, aquesta taula també recull la ingesta diària acceptable (ADI, de l'anglès acceptable daily intake) de cada piretroide segons aquest organisme internacional.

Taula 1.3: Límits permesos a la UE per a diferents piretroides (EC, 2014).

| Piretroide | MRL (llet) (mg kg ⁻¹) | ADI (mg kg ⁻¹ bw day ⁻¹) | Permès a la UE |
|--------------------------------|--------------------------------------|--|----------------|
| Al·letrina | 0.01 | - | No |
| Bifentrina | 0.01 | 0.015 | No* |
| Bioal·letrina (S-Al·letrina) | 0.01 | - | No |
| Bioresmetrina (S-Resmetrina) | 0.01 | 0.03 | No |
| Ciflutrina | 0.02 | 0.003 | Sí |
| Ciflutrina (β-ciflutrina) | 0.02 | 0.003 | Sí |
| Cihalotrina | 0.01 | 0.005 | No |
| Cihalotrina (λ-cihalotrina) | 0.05 | 0.005 | Sí |
| Cipermetrina | 0.05 | 0.05 | Sí |
| Cipermetrina (z-cipermetrina) | 0.05 | 0.04 | Sí |
| Cipermetrina (α- cipermetrina) | 0.05 | 0.015 | Sí |
| Deltametrina | 0.05 | 0.01 | Sí |
| Esfenvalerat | 0.02** | 0.02 | Sí |
| Fenpropatrina | - | 0.03 | No |
| Fenvalerat | 0.02** | 0.0125 | No |
| Fenotrina | 0.05 | 0.07 | No |
| Flucitrinat | 0.05 | 0.02 | No |
| τ-fluvalinat | 0.05 | 0.005 | Sí |
| Permetrina | 0.05 | 0.05 | No |
| Piretrines | 0.05 | 0.04 | Sí |
| Resmetrina | 0.1 | 0.03 | No |
| Teflutrina | 0.05 | 0.005 | Sí |
| Tetrametrina | 0.01 | - | No |
| Tralometrina | 0.01 | - | No |

* Tot i que en la UE en general no és permès, hi ha països on sí ho és. ** Valor de la suma dels isòmers.

Aquest concepte ADI és força interessant per a l'estudi de substàncies no alimentícies que entren en la cadena alimentària en algun moment. Sovint es parla de TDI (de l'anglès, tolerable daily intake) quan el producte es un contaminant alimentari no aplicat intencionadament. Això podria ser el cas de la transferència d'additius plàstics de l'envàs a l'aliment. En cas d'additius alimentaris, residus de fàrmacs veterinaris i pesticides tradicionalment s'ha emprat més el terme ADI ja que hi ha una intencionalitat d'aplicar el producte a l'aliment, tot i que, en els últims anys, per als pesticides alguns autors prefereixen parlar de TDI. En qualsevol cas, en ambdós casos el valor és el mateix. Per a calcular-ho es determina la dosi d'efecte advers no observable en algun ésser viu (NOAEL, de l'anglès, no observable adverse effect level) i es divideix per un valor de seguretat (UF, de l'anglès uncertainty factors) el qual acostuma a ser d'entre 100 i 10000 depenent de l'espècie de l'organisme sobre el qual s'ha determinat el NOAEL, l'exactitud i la precisió del valor, etc.

En el nostre cas, faré servir el ADI com a llindar per tal de determinar la innocuïtat o no d'un producte alimentari pel que fa a la concentració de piretroides.

1.6. Mètodes d'anàlisi de piretroides.

A l'hora d'analitzar els piretroides cal tenir en compte les seves propietats químic-físiques. Com ja s'ha exposat es tracta de molècules orgàniques hidrofòbiques i preferentment lipofíliques. Això, ja indica en gran mesura el tipus de mostra on trobarem aquests compostos. Pel que fa a aigües i sòls inorgànics, la seva concentració en aquests serà baixa i si cal analitzar aquestes matrius precisarà metodologia molt sensible amb límits de detecció (LOD, de l'anglès limit of detection) i quantificació (LOQ, de l'anglès limit of quantification) molt baixos.

D'altra banda, donat que es tracta d'insecticides amb aplicació a les indústries agrària i ramadera, tot sovint les mostres seran matrius alimentàries més o menys greixoses. Aquestes matrius poden tenir un grau de complexitat molt més elevat que les primeres donada la seva heterogeneïtat, la diferent composició entre mostres similars i la presència de interferències que poden dificultar l'anàlisi. Per si fora poc, aquests mètodes han de ser capaços d'arribar a LOQs de l'ordre dels ppm (parts per milió, 10^{-6}) o fins i tot de pocs ppb (parts per bilió anglosaxó, 10^{-9}). Aquesta sensibilitat és la requerida per la legislació europea vigent ja que en el seu reglament inclou el valor per defecte de $0,01 \text{ mg kg}^{-1}$ com a MRL d'un aliment, essent més concret en determinats aliments (EC, 2005).

També cal esmentar, les mostres ambientals orgàniques. A més d'aigües i sòls, l'avaluació mediambiental pot incloure fauna i/o flora salvatge. Tot i que teòricament aquest tipus de mostra pot ser semblant a les matrius alimentàries, per la seva natura, és de preveure que aquests organismes estiguin menys exposats als pesticides que els de granja o horta i, per tant, en cas de presentar concentracions de piretroides, s'ha de suposar que els nivells seran inferiors als que es podrien trobar en poblacions exposades. Això implica, altre cop, mètodes molt sensibles i selectius.

Per tot això, s'entén que els autors hagin provat d'optimitzar molts mètodes diversos d'anàlisi de piretroides amb diferents mètodes de pre-tractament de mostra i preparativa, múltiples tècniques cromatogràfiques i fins i tot mètodes de detecció diversos. Tot seguit, en els pròxims subapartats, es detallaran i explicaran diversos mètodes d'anàlisi de piretroides en diferents matrius. Un cop tots aclarits, la [Taula 1.5](#) mostrarà un resum d'alguns dels mètodes més rellevants emprats en la literatura més recent (abans de començar l'apartat [1.7](#)).

1.6.1 Preparació de mostres

Donat que la majoria de mostres esmentades són complexes, la preparació de mostra més típica és una extracció per tal de descartar el contingut més hidrofílic de la mostra. Per fer-ho

habitualment s'empren tècniques d'extracció líquid líquid (LLE, de l'anglès liquid-liquid extraction) emprant dissolvents orgànics com ara l'hexà (Hx) (Corrion, Ostrea, Bielawski, Posecion, & Seagraves, 2005; Mekebri, Crane, Blondina, Oros, & Rocca, 2008), l'acetoneitril (ACN) (X. Wu, Zhang, Meng, Liu, & Ma, 2012), el diclorometà (DCM) (Mekebri et al., 2008), entre d'altres o fins i tot diferents mescles de dissolvents (Maria Luisa Feo et al., 2012; Ramesh & Ravi, 2004a), o mètodes d'extracció en fase sòlida (SPE, de l'anglès solid phase extraction) amb l'ús de sorbents com ara la sílice (Bouwman et al., 2006), l'alúmina (Esteve-Turrillas, Pastor, & de la Guardia, 2005) o el C18 (Maria Luisa Feo et al., 2012), entre d'altres. Algunes mostres que presenten més complexitat, requereixen diverses d'aquestes extraccions en sèrie o una extracció i una purificació. A més, els mètodes SPE es poden emprar de dues maneres diferents, una coneguda com a "catch and release" i l'altre com a "clean up". El primer consisteix en introduir la mostra en una fase sòlida, rentar amb un dissolvent que elimina impureses però permet que l'analit desitjat romangui a la fase sòlida, i finalment diluir l'analit amb un altre dissolvent. El segon es pot entendre més aviat com una purificació i consisteix a fer passar la mostra dissolta en un dissolvent per una fase sòlida que reté les impureses i deixa passar els analits dissolts en el dissolvent. Com es pot comprovar a la [Taula 1.5](#), tot i que el mètode de SPE es pot emprar com a mètode d'extracció, sovint en la determinació de piretroides es prefereix utilitzar com a mètode de purificació un cop s'han extret els analits de la mostra amb alguna altra tècnica extractiva.

Altres metodologies utilitzen sistemes d'extracció tipus SBSE (de l'anglès, stir-bar sorbtive extraction), extracció assistida amb microones (MASE, de l'anglès microwave-assisted solvent extraction), dispersió en matriu sòlida (MSPD, de l'anglès matrix solid-phase dispersion) i fins i tot extraccions amb fluids supercrítics (SFE, de l'anglès supercritical fluid extraction).

El mètode SBSE consisteix en l'extracció dels analits per sorció directa amb un sorbent. La mostra (líquida) es posa en contacte amb el sorbent i s'agita magnèticament durant un temps determinat, que acostuma a ser de més de mitja hora. Aquest mètode requereix, per tant, molt de temps i grans volums de mostra (Ochiai, Sasamoto, Kanda, & Pfannkoch, 2008; Van Hoeck, David, & Sandra, 2007).

L'extracció amb microones requereix d'aparells específics que no es troben a tots els laboratoris, tot i que no són excessivament cars. Ara bé, implica força tractament de mostra no automatitzat amb les conseqüents repercussions (Regueiro, Llompарт, Garcia-Jares, & Cela, 2007). Recentment s'han desenvolupat altres mètodes de MASE que permeten una extracció més senzilla i que superen parcialment aquests desavantatges sobretot gràcies al fet que en un

sol pas aconseguen unificar l'etapa d'extracció i de purificació afegint sorbents i amb l'ajut de l'ultrasons (H. S. Wu, Qian, Wang, Zhang, & Li, 2017).

El MSPD consisteix en posar en contacte directe la mostra amb un sorbent que capturi els analits. En aquest cas, la tècnica també requereix d'un procés de manipulació important

El mètode SFE ha demostrat ser una bona tècnica extractiva. Tot i així, l'ús de fluids supercrítics no és senzill, requereix d'aparells molt específics i de sistemes poc convencionals. Tot això encareix la tècnica considerablement (Rissato, Galhiane, Apon, & Arruda, 2005).

Tot i així, en els darrers anys els diferents investigadors procuren trobar noves metodologies "QuEChERS". Aquest és l'acrònim, adoptat de l'anglès, de les paraules "quick" (ràpid), "easy" (senzill), "cheap" (barat), "effective" (efectiu), "rugged" (robust) i "safe" (segur) i fa referència a aquells mètodes que compleixen amb aquests mateixos criteris esmentats. Com a conseqüència, actualment els mètodes empen volums inferiors de dissolvents orgànics aconseguint abaratir l'anàlisi i essent més respectuós amb el medi ambient. Exemples d'aquests poden ser els anomenats SPME (de l'anglès sòlid-phase microextraction), extracció d'emulsions assistida per ultra sons (UAEE, de l'anglès ultrasounds-assisted emulsification extraction) i la coneguda com a PLE (de l'anglès, pressurized liquid extraction) en la qual s'extreuen els analits a altes pressions.

Basada en el mateix principi que la SPE, la SPME aconsegueix resultats similars o fins i tot millors amb una quantitat de mostra molt inferior. També la quantitat de dissolvents requerits és inferior (Casas, Llompart, Garcia-Jares, Cela, & Dagnac, 2006; Fernandez-Alvarez et al., 2008). Tot això sumat als avantatges propis del a SPE fa que el mètode sigui indiscutiblement considerat QuEChERS. Ara bé, depenent de la matriu i de les propietats dels diferents analits, pot ser difícil posar en pràctica la SPME. De fet, en matrius complexes, la majoria d'autors es decanten per altres processos extractius.

L'UAEE és un mètode que optimitza la quantitat de dissolvent necessari per extreure els analits (M. L. Feo, Eljarrat, & Barcelo, 2010b). Es basa en augmentar la superfície de contacte entre dos líquids immiscibles, un dels quals pertany a la mostra i l'altre és el dissolvent extractor, mitjançant les microgotetes que es formen a les emulsions per tal d'afavorir la transferència dels analits i, per tant, l'extracció. L'optimització de la transferència dels analits d'un solvent a l'altre permet la disminució de volums de dissolvent d'extracció. A més, l'ús de l'ultrasons afavoreix aquesta formació d'emulsions inestables i la centrifugació posterior per

tal de diferenciar les dues fases és molt simple i eficaç. Aquest mètode, a més, no requereix de instruments de laboratori complexos ni específics.

Un altre mètode QuEChERS que s'empra sovint en l'anàlisi de contaminants orgànics ambientals és el PLE (Eljarrat et al., 2009; Van Emon & Chuang, 2012). Aquest consisteix en l'extracció de la mostra amb dissolvents a pressions i temperatures elevades. Aquestes afavoreixen la transferència dels analits cap als dissolvents augmentant l'eficiència de l'extracció. D'aquesta manera, el volum requerit de dissolvent és inferior al que es necessitaria en condicions normals. A més, si a la cel·la d'extracció se li afegeix un sorbent adient, el procés de purificació que habitualment es precisa es realitza en aquest mateix pas, evitant així, posteriors manipulacions. Un altre avantatge d'aquest mètode és que és automatitzat. Amb els piretroides, però, poden haver problemes d'estabilitat a les temperatures i pressions de treball, raó per la qual es fa difícil d'emprar. Tot i així alguns autors han aconseguit posar mètodes PLE a punt amb resultats força prometedors (Van Emon & Chuang, 2012).

Com es pot comprovar a la [Taula 1.5](#), totes aquestes metodologies esmentades s'han emprat per a l'anàlisi de piretroides amb èxit. Tot i així, previ a la determinació instrumental del analit, cal introduir una tècnica cromatogràfica que permeti discriminar entre els diferents piretroides que es troben a les mostres.

Hi ha una nova tècnica que pretén ser molt més selectiva i que podria evitar l'ús de tècniques cromatogràfiques (no en tots els casos). És la impressió molecular de polímers (MIP, de l'anglès, molecularly imprinted polymer). Aquesta tècnica es basa en sintetitzar un polímer capaç de reconèixer determinades molècules, de forma anàloga als sistemes antígen-anticòs dels immunoassaigs. Aquest polímer s'uneix a nanoesferes de sílice o nanotubs de carboni i això permet crear un sorbent per SPE molt específic (L. X. Chen, Xu, & Li, 2011). Ara bé, alguns autors van més enllà. En la síntesi del polímer inclouen alguna propietat com ara la magnètica (és el cas dels MMIP, de l'anglès, Magnetic Molecularly Imprinted Polymer). Quan el polímer està unit a la molècula que reconeix (en el nostre cas seria un piretroide concret o un grup d'aquests molt específic) aquesta propietat del polímer canvia. Això permet, una extracció molt més simple gràcies al magnetisme del polímer (Ma & Chen, 2014; Yu & Yang, 2017). A més, seria possible imprimir el polímer per un piretroide concret de tal manera que, tot i la similitud estructural d'altres piretroides, les interferències amb d'altres molècules serien mínimes. Els problemes d'aquesta tècnica, evidentment, són, entre d'altres, que al ser una tècnica encara incipient no és fàcil posar-la a punt en un laboratori qualsevol. A més, la seva

gran especificitat pot ésser també negatiu en cas de voler avaluar la presència de més d'un compost alhora.

1.6.2 Tècniques cromatogràfiques

Malgrat les tècniques selectives, la majoria de tècniques d'extracció requereixen de tècniques cromatogràfiques per diferenciar els analits, sobretot en el cas de mètodes multiresidu. Les tècniques emprades són bàsicament la cromatografia líquida (LC) i la de gasos (GC). Ambdues tècniques semblen ser òptimes per a l'anàlisi de piretroides i presenten pros i contres.

La LC presenta com a major avantatge que requereix menys pretractament de mostra. Permet, en general, una extracció més simple o fins i tot eliminar el procés de purificació de l'extracte. Això és deu a que els piretroides tenen una gran afinitat per les fases sòlides reverses típiques de les columnes habituals en LC mentre que les substàncies més polars que podrien ser interferents solen eluir-se amb molta facilitat en aquests sistemes. Malgrat això, generalment amb LC s'acaben establint uns LODs força elevats, raó per la qual l'aplicabilitat a mostres ambientals és limitada. Alguns treballs que prefereixen emprar LC, degraden els piretroides als seus metabòlits, principalment a 3PBA (McCoy et al., 2012). Aquest producte té alts nivells de recuperació i alta sensibilitat, així doncs els mètodes així desenvolupats són força útils. Per contra, aquests tenen el inconvenient de ser molt inespecífics. Aquest metabòlit és molt comú per gran quantitat de piretroides d'ambdós tipus I i II, i és molt difícil, sinó impossible, discriminar de quin piretroide prové. Així doncs, aquest sistema no permet avaluar la presència d'un piretroide concret sinó de piretroides en general. Per si fora poc, tampoc no tots els piretroides tenen com a metabòlit el 3PBA, és a dir, aquest anàlisi tampoc no seria representatiu de l'exposició a piretroides sinó a un grup d'ells, en cap cas ni complet ni representatiu del conjunt de piretroides.

D'altra banda, la GC requereix una purificació dels extractes més exhaustiva. Això no obstant, en general els mètodes de GC solen ser més sensibles i arribar a descriure nivells de concentració més baixos. Com s'ha comentat prèviament, és de suposar que els nivells de piretroides a les mostres són molt baixos, així que aquest avantatge en l'anàlisi és clau i fonamental.

Donat la quantitat de isòmers dels piretroides cal diferenciar aquelles metodologies que tenen per objectiu la separació dels enantiòmers i aquelles que només pretenen la detecció

del piretroide en qualsevol dels seus isòmers. És més, també trobem un tercer grup d'anàlisi, el qual ens permet separar els diastereòmers però no els enantiòmers.

Les columnes preferides a la bibliografia per a l'anàlisi d'aquests insecticides són aquelles polars de siloxans funcionalitzats. Els autors que prefereixen columnes semi-polars com ara la SPB-608 (35% difenil i 65% dimetilpolisiloxà)(Oudou & Hansen, 2002), la HP-608 (metil 50% fenilpolisiloxà)(Rissato et al., 2005) o la DB1701 (7% metil, 7% cianopropil, i 7% fenilpolisiloxà)(Bondarenko, Spurlock, & Gan, 2007) descriuen problemes com la baixa resolució dels diferents isòmers (Oudou & Hansen, 2002) o una retenció excessiva dels compostos (Rissato et al., 2005).

Per contra, les columnes polars preferides a la bibliografia són les DB5 (5% fenil 95% metilpolisiloxà) que fins i tot permeten la discriminació entre isòmers d'un mateix piretroide. Els diferents autors han emprat diferents longituds d'aquesta columna des dels 60 fins els 10m. És clar que, al disminuir la longitud, els temps de retenció també disminueixen significativament, de forma general. Per exemple, en el cas de la permetrina i del fenvalerat, en una columna de 60 m es van optimitzar uns temps de retenció de 18 i 36 min (Mekebri et al., 2008), respectivament. Els mateixos compostos en una columna de 30m eluïen a 18 i 22 mins (Sichilongo, 2004), a 9,1 i 10,3mins en una columna de 15m (M. L. Feo, Eljarrat, & Barcelo, 2011) i a 5,56 i 6,00mins en una de 10m (Ochiai et al., 2008), respectivament. Tot i així, a menor longitud la resolució entre isòmers d'un mateix piretroide es veu disminuïda podent arribar a co-eluir. Per tant, la tria d'aquesta columna serà depenent de les necessitats de resolució vs. temps de retenció.

En els casos de major resolució, amb aquesta columna podem aconseguir el màxim de diastereòmers de cada piretroide. Això sol suposar que per els piretroides amb dos centres quirals, habitualment els de tipus I, elueixen 2 pics per a cada insecticida, un corresponent al compost *cis* i l'altre al *trans*. En els piretroides tipus II que tenen 3 centres quirals, aquesta fase estacionària ens permet diferenciar 4 pics corresponents a dues estructures *cis* i dues *trans* per a cada piretroide. Cal recordar que cada pic eluït en aquestes columnes no enantio-selectives corresponen a un parell de isòmers enantiòmers no resolts.

D'altres autors han inclòs els piretroides en un monitoratge més exhaustiu de residus de pesticides. Donat aquest caràcter multiresidu de l'anàlisi i per evitar co-elucions alhora que s'aconsegueixen millors resolucions s'han decantat per la GCXGC, és a dir, la cromatografia de gasos bidimensional. Aquesta tècnica consisteix en eluir la mostra per dues columnes cromatogràfiques seguides. A la sortida de la primera part de la mostra s'analitza i la resta

passa a la següent columna per eluir-se i separar els components en la segona fase estacionària. A la sortida de la segona columna la mostra es torna a analitzar. Això permet uns resultats que es representen en gràfics 3D on els compostos se separen segons els dos temps de retenció de cadascuna de les columnes. Els LODs aconseguits amb aquesta metodologia són entre 2 i 10 vegades millors que els de GC simple gràcies a que s'aconsegueixen uns pics molt més estrets (Banerjee et al., 2008). Un exemple de les columnes òptimes per aquests anàlisis serien una primera columna DB5 de 30m seguida d'una columna més polar, la DB-17ht (50% fenil i 50% metilpolisiloxà) (X. Wang et al., 2012). El principals problemes d'aquests sistemes és, per una banda, el requeriment tecnològic del propi cromatògraf i la detecció requerida. Donat el esquema d'un sistema GCxGC explicat, la detecció ha de ser obligatòriament molt ràpida, raó per la qual el detector de masses més adequat és un de temps de vol, TOF (de l'anglès, Time of Flight). Per integrar aquestes dades cal un software avançat i menys intuïtiu que els habituals. A més les especificacions dels ordinadors que emmagatzemen les dades també han de ser millors ja que la quantitat de dades obtingudes i a integrar és molt superior a d'altres sistemes més simples. Tot això, encareix la tècnica i no permet que sigui a l'abast de qualsevol laboratori d'anàlisi ambiental. A més, un altre gran problema és que els anàlisis per GCxGC són de tipus qualitatiu de tal manera que no és possible quantificar la concentració de contaminant a la mostra. Per últim, la interpretació dels resultats és molt menys clara que amb els altres sistemes i els autors que l'utilitzen s'esforcen en, cada cop, fer mètodes que siguin més comprensibles i entenedors (Banerjee et al., 2008; X. Wang et al., 2012).

Malgrat que molts autors prefereixen la GC per a l'anàlisi de piretroides, en el cas de la deltametrina i la tralometrina això és més qüestionable. Com mostra la [Figura 3](#), aquests dos piretroides són molt similars. De fet, a altes temperatures la tralometrina pateix una reacció d'eliminació en la qual es perd una molècula de brom. Així, aquesta reacció transforma aquest piretroide a deltametrina. Les condicions de temperatura del injector del sistema cromatogràfic de gasos són prou elevades com per a que aquest procés tingui lloc. Com a conseqüència, la tralometrina no arriba a la columna de gasos com a tal sinó com a deltametrina, fet que impossibilita la diferenciació d'ambdues. Per al cas concret d'aquests piretroides, alguns autors prefereixen l'ús de la LC per a la seva anàlisi (Valverde, Aguilera, Rodriguez, & Boulaid, 2002).

Com ja s'ha esmentat prèviament, quan l'objectiu de l'anàlisi és la separació enantiomèrica, els requeriments són diferents. Per a anàlisis quirals, les columnes cromatogràfiques han de contenir fases estacionàries diferents.

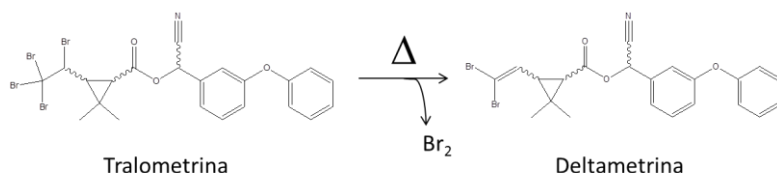


Figura 3: Reacció d'eliminació de la tralometrina a altes temperatures

1.6.3 Detecció i determinació

Generalment, els compostos halogenats acostumen a tenir altes sensibilitats en les deteccions amb els sistemes de captura d'electrons ECD (de l'anglès, electron capture detector). Així és com una primera temptativa d'anàlisi de piretroides podria realitzar-se amb aquests detectors. Malgrat això, en l'estudi de piretroides s'ha demostrat que els detectors que inclouen espectrometria de masses (MS, de l'anglès mass spectrometry) poden millorar els LODs en un ordre de magnitud gràcies a la reducció del senyal del soroll de fons i, per tant, de la línia base del cromatograma (Bondarenko et al., 2007). Una altra solució per a millorar el LOD, seria emprar un detector micro-ECD. Aquesta opció, però, requereix una resolució de pics molt més bona que la de MS així que, en realitat, implica columnes més llargues amb temps de retenció més grans.

Per tant, els sistemes de MS, i encara més els de MS en tàndem (MS-MS), són prou sensibles per a l'anàlisi de piretroides i, a més, més selectius que altres mètodes de detecció, raó per la qual, el sistema cromatogràfic acoblat pot ésser més simple i l'anàlisi de la mostra més ràpid.

Per tal d'analitzar la mostra per MS cal ionitzar els compostos. En els sistemes de GC-MS es poden triar la ionització electrònica (EI) i la química (CI). A més, segons el interès de l'analista, es pot triar detectar els ions positius o negatius. En el cas de CI amb detecció d'ions negatius s'anomena NCI (Negative Chemical Ionization) o NICI (Negative Ion Chemical Ionization). La CI, que ionitza les molècules mitjançant un gas reactiu, sol ser un tipus de ionització molt més suau que la EI, i, per tant, el nombre de fragments aconseguits pot ser menor i els ions aconseguits solen ser de relació massa/càrrega (m/z) superiors. En el estudi de piretroides cal tenir en compte que molts compostos d'aquesta família tenen estructures molt similars. Per aquesta raó, el fet de realitzar un anàlisi MS amb EI fa perdre molta selectivitat al mètode ja que molts piretroides diferents es fragmenten resultant en els mateixos ions de m/z petits. A més, respecte de la sensibilitat, el mètode de CI disminuïa els LOD fins a 3 ordres de magnitud per a alguns piretroides. En cap dels casos estudiats es van obtenir LODs inferiors emprant EI respecte dels descrits per CI amb equips GC-MS-MS equivalents (M. L. Feo, Eljarrat, & Barcelo, 2010a).

A més, com s'ha dit, el CI, en ambdós modes positiu i negatiu, emprava un gas reactiu que fragmenta les molècules. La tria d'aquest CI també s'ha d'optimitzar. D'entre els que se solen emprar a la bibliografia hi ha el metà i el amoni. Per a piretroides trobem mètodes que utilitzen metanol (Sichilongo, 2004) i amoni. Prèviament al inici d'aquesta tesi, el grup ja havia estudiat l'eficiència del mètode de NCI per a piretroides i havia optimitzat l'anàlisi emprant amoni com a gas reactiu (M. L. Feo et al., 2011).

Respecte a triar una anàlisi per MS o MS-MS, els autors que fins aleshores havien estudiat els piretroides, coincidien en preferir MS-MS ja que els LODs eren inferiors. Per exemple, Feo et al. (2011) van quantificar aquesta millora. El cas on la millora va ser major era per a la deltametrina que de tenir un LOD de 1125 fg injectats emprant MS va assolit un de 8,10 fg amb MS-MS. Aquests autors només van trobar algun cas d'algun isòmer concret com ara el trans del fluvalinat on pràcticament no hi havia diferència quantitativa entre ambdós LODs.

Tot i així, diferents autors proposaven mètodes diversos amb diferents equips d'espectrometria. Alguns empraven un mètode d'un quadrupol acoblat a una trampa iònica QIT (de l'anglès, quadrupole ion trap) (Esteve-Turrillas et al., 2005; Sichilongo, 2004), mentre que d'altres es decantaven pel triple quadrupol (QqQ) (M. L. Feo et al., 2011). Donada la diferència temporal entre les publicacions la comparativa entre equips no és gaire fiable ja que la sensibilitat d'aquests ha anat augmentant gràcies al desenvolupament tecnològic.

Com a comparativa numèrica d'aquests paràmetres, en la [Taula 1.4](#) es presenta un resum dels LODs obtinguts amb els mètodes MS-MS aplicats per la bibliografia fins al inici d'aquesta tesi. Comparant els mètodes, es comprova que el mètode de EI-QIT presentava LODs millors que els de CI-QIT. Tot i així, els mètodes d'aquest grup amb QqQ, tant EI com NCI presentaven

Table 1.4: Comparativa dels diferents mètodes d'anàlisi per piretroides emprant MS-MS: QIT (mode CI (MeOH) MS-MS (QIT) (extret de (Sichilongo, 2004)) i mode EI MS-MS (QIT) (extret de (Esteve-Turrillas et al., 2005)) i QqQ (EI and NCI (amoni) (extret de (M. L. Feo et al., 2011))).

| Compost | PCI (QIT) | | | EI (QIT) | | | EI (QqQ) | | | NCI (QqQ) | | |
|--------------------|---|---|---------------------------|---|---|---------------------------|---|---|---------------------------|---|---|---------------------------|
| | 1 ^a transició MS→MS ^a | 2 ^a transició MS→MS ^a | iLOD (pg injectats) | 1 ^a transició MS→MS ^a | 2 ^a transició MS→MS ^a | iLOD (pg injectats) | 1 ^a transició MS→MS ^a | 2 ^a transició MS→MS ^a | iLOD (pg injectats) | 1 ^a transició MS→MS ^a | 2 ^a transició MS→MS ^a | iLOD (pg injectats) |
| Bifentrina | 361→344 | | 340 | 181→166 | | 1 | 181→166 | 181→165 | 87 | 205→141 | 205→121 | 0.2 |
| Ciflutrina | 226→206 | | 400 | 226→199 | | 3 | 197→141 | 197→161 | 187 | 205→141 | 205→121 | 0.2 |
| λ-Cihalotrina | - | | - | 197→141 | | 3 | 226→206 | 226→199 | 229 | 207→35 | 209→35 | 2 |
| Cipermetrina | 208→181 | | 160 | 163→127 | | 4 | 163→127 | 163→91 | 64 | 207→35 | 209→35 | 2 |
| Deltametrina | - | | - | 172→77 | | 5 | 253→172 | 253→174 | 300 | 297→79 | 297→81 | 450 |
| Esbiol(Al·letrina) | 303→285 | | 160 | - | | - | - | - | - | - | - | - |
| Fenvalerat | 167 ^b | - | 180 | 225→147 | | 2 | 167→125 | 167→139 | 27 | 211→167 | 213→169 | 0.4 |
| D-τ-fenotrina | 351→333 | | 140 | 183→165 | | 4 | - | - | - | - | - | - |
| Flucitrat | 412→413 | | 340 | 225→147 | | 2 | - | - | - | - | - | - |
| Fluvalinat | 503→457 | | 170 | 250→200 | | 2 | 250→200 | 250→208 | 190 | 294→250 | 294→194 | 64 |
| Permetrina | 365→183 | | 140 | 183→165 | | 2 | 183→168 | 183→165 | 349 | 207→35 | 209→35 | 6 |
| Resmetrina | - | - | - | - | - | - | 123→81 | 123→93 | 617 | 337→149 | 337→187 | 7 |
| Tetrametrina | 314→164 | | 110 | 164→77 | | 5 | 164→77 | 164→107 | 106 | 331→167 | - | 45 |

^a La selecció de la transició es va fer segons l'abundància relativa dels fragments.

^b No es va trobar cap transició.

iLOD: LOD instrumental

valors de LOD encara inferiors. Finalment, el NCI era el mètode més sensible de tots. Cal tenir en compte que, com ja s'ha esmentat, probablement els equips emprats en els estudis de QIT eren molt més antics i menys sensibles que el QqQ emprat pel nostre grup, donat que els anys de publicació dels treballs es diferencien en més de 6 anys. Així doncs, aquesta comparativa no té valor entre QIT i QqQ sinó més aviat entre els diferents sistemes d'ionització.

Val a dir que alguns autors s'havien decantat pel mètode de MS-MS anomenat de temps de vol (TOF, de l'anglès time of flight) amb un quadrupol previ (qTOF) (Banerjee et al., 2008; X. Wang et al., 2012). Aquest mètode és molt més ràpid per al que fa a l'obtenció i anàlisi de dades. Per aquest motiu, com s'ha comentat prèviament, s'acostuma a emprar acoblat a una cromatografia de GCxGC. Ara bé, aquesta tècnica requereix una inversió econòmica molt superior així com una major formació específica dels analistes donada la complexitat de la tècnica. Per aquesta raó, els autors que empraven aquest mètode ho feien dins un anàlisi multiresidu de pesticides amb gran nombre d'analits amb propietats molt diverses i per als quals GCxGC era la única opció per a analitzar-los tots alhora aplicant un sol mètode. Per tant, analitzaven a més d'alguns piretroides, altres famílies de pesticides.

Altres mètodes de detecció alternatius que no requereixen d'una tècnica cromatogràfica prèvia són els immunoassaigs. Aquests es basen en el reconeixement específic d'una molècula per part d'un sistema biològic antígen-anticòs. Aquests sistemes, poden arribar a ser molt específics i selectius, raó per la qual, sovint no és necessari la diferenciació cromatogràfica. La lectura d'aquests mètodes d'immunoassaig pot ser a través d'un sistema de detecció de luminescència (fluorimetria, UV-vis, etc)(Taheri et al., 2016), o altres sistemes com ara. Tot això fa que el tractament de mostra acostumi a ser molt senzill i l'obtenció dels resultats molt ràpida, raó per la qual aquests mètodes són molt atractius.

Ara bé, la part de la molècula que activa el sistema del immunoassaig, és a dir l'antigen, pot ser més o menys específic i amb alguns mètodes desenvolupats la detecció és general per a diversos piretroides. Per exemple, hi ha alguns que la molècula reactiva és el 3-PBA o una fracció d'aquest. Això, pot donar interferències entre metabòlits i piretroides nadius, així com entre diversos piretroides diferents que comparteixen una estructura química relacionada amb el 3-PBA (Ki Chang et al., 2011). En aquest sentit, també hi ha mètodes que, precisament, pretenen la detecció d'un determinat tipus de piretroides. Així, trobem el mètode desenvolupat per Taheri et al. (2016) que és capaç de detectar piretroides tipus II en aliments vegetals, tot i que només el van testar amb fenpropatrina, deltametrina, i λ -cihalotrina obtenint LODs de 1,9, 3,4, i 4,3 ng/mL respectivament.

Tot i així, alguns autors han desenvolupat mètodes de immunoassaig més específics per detectar piretroides com ara la fenpropatrina, la cipermetrina, la deltametrina, i la cihalotrina en diferents vegetals arribant a límits de detecció de 5,0 microg·mL⁻¹ essent necessari només una extracció sòlid-líquid del vegetal amb ACN i una dil·lució de l'extracte amb PBS (solució tampó de fosfat)(Hu et al., 2016).

Amb un raonament semblant al de la tècnica dels immunoassaigs, estan les ja esmentades tècniques MIP. Alguns autors aposten per concedir al polímer de impressió una propietat com ara la fluorescència que permet directament la detecció. En aquest cas, quan el piretroide s'acobla sobre el polímer aquest perd o guanya fluorescència de forma proporcional a la concentració de piretroide. Així, simplement fent una lectura de fluorescència sobre una mostra amb aquest MIP (en aquest cas FMIP, de l'anglès Fluorescence Molecularly Imprinted Polymer) es pot determinar la concentració de piretroide de manera molt exacta i precisa. Per a b-ciflutrina s'han arribat a LODs de 10,11nM en mostres d'aigua i recuperies per sobre dels 93% (H. J. Li et al., 2017; Qiu et al., 2017).

Aquestes tècniques de MIP són molt prometedores per la seva selectivitat. Tot i així, com que els polímers encara són en fase de desenvolupament, el cost és elevat o, en cas de sintetitzar-los en el propi laboratori d'anàlisi, els passos a realitzar molt nombrosos. A més, en el cas de la fluorescència el rang de linealitat pot ser un factor limitant de les concentracions que es poden detectar (Qiu et al., 2017).

Per últim, destacar que d'altres autors prefereixen estudiar els metabòlits dels piretroides ja que és més senzill d'emprar mètodes de LC amb bons LODs donat que el poden acoblar a sistemes MS o fins i tot MS-MS. Aquests estudis poden determinar els metabòlits en restes biològiques com ara orines (Olsson et al., 2004; Tao, Chen, Collins, & Lu, 2013), sang o plasma (Corrion et al., 2005; Thiphom et al., 2014), però també mostres no biològiques com ara aigua de riu (Rousis, Zuccato, & Castiglioni, 2017).

1.7. Presència ambiental i comportament.

Aquest apartat pretén donar una visió global de la presència dels piretroides al medi ambient. Com es comprovarà, d'estudis que avaluen la presència de piretroides en matrius tipus sòl, aigua, partícultat i sediments se'n poden trobar força. També n'hi ha molts d'anàlisis alimentàries on s'avalua la presència de residus d'aquests insecticides en vegetals o animals de

Taula 1.5: Resum de mètodes analítics per a la determinació de piretroides.

| Matriu | Extracció | Purificació | Anàlisi instrumental | Recuperacions | LOD | Referències |
|-----------------------------|------------------------|--------------|----------------------|---------------|---|---|
| MATRIU MEDIAMBIENTAL | | | | | | |
| Aigua | LLE | - | GC-ECD | 75-115% | 1-3 ng L ⁻¹ | (Mekebri et al., 2008) |
| | LLE | - | GC-ECD | 94-105% | - | (Oudou & Hansen, 2002) |
| | SPE | - | GC-μECD | 70-103% | 5·10 ⁻⁴ -2·10 ⁻² ng L ⁻¹ | (Xue et al., 2005) |
| | SPME | - | GC-μECD | 81-125% | 0.05-2 ng L ⁻¹ | (Casas et al., 2006) |
| | SBSE | - | GC-MS | 82-113 | >10 ng L ⁻¹ | (Ochiai et al., 2008) |
| | SBSE | - | GC-MS | 40-80% | 0.02-1 ng L ⁻¹ | (Van Hoeck et al., 2007) |
| | UAEE | - | GC-MS | 63-100% | 0.03-36 ng L ⁻¹ | (M. L. Feo, Eljarrat, et al., 2010b) |
| | UAEE | LLμE | GC-MS-MS | 80-98% | 0,89-1,39 μg L ⁻¹ | (Ye, Yao, Wang, Nie, & Li, 2016) |
| | LLE (prèvia filtració) | - | GC-QTOF | - | "Menor" 1 ng L ⁻¹ | (Moschet, Lew, Hasenbein, Anumol, & Young, 2017) |
| Sediment | Sonicació | Florisil | GC-μECD | 71-103% | 3·10 ⁻⁵ -2·10 ⁻³ ng g ⁻¹ | (Xue et al., 2005) |
| | Soxhlet | Florisil | GC-MS | 90-135% | 0.16-1.5 ng g ⁻¹ | (Woudneh & Oros, 2006) |
| | SFE | C18 | GC-ECD | 70-97% | <10 ng g ⁻¹ | (Rissato et al., 2005) |
| | SPME | - | GC-μECD | 81-122% | 4·10 ⁻³ -1 ng g ⁻¹ | (Fernandez-Alvarez et al., 2008) |
| | PLE | GPC+Florisil | GC-ECD | 84-108% | 0.5-4 ng g ⁻¹ | (Mekebri et al., 2008) |
| Aire | Sonicació | - | GC-MS | - | 0.4-1.7 μg m ⁻³ | (Yoshida, 2009) |
| | SPE | Tenax | GC-MS-MS | 67-117% | 0.5-27 μg m ⁻³ * | (Egea Gonzalez, Mena Granero, Glass, Garrido Frenich, & Martinez Vidal, 2004) |
| Pols | MASE | Florisil | GC-μECD | 84-117% | 1-7 ng g ⁻¹ | (Regueiro et al., 2007) |
| | Sonicació | C18 | GC-MS | 51-101% | 1-60 ng g ⁻¹ | (Sichilongo, 2004) |
| | PLE | - | GC-MS | 85-120% | 1-10 ng g ⁻¹ | (Van Emon & Chuang, 2012) |

Taula 1.5: Resum de mètodes analítics per a la determinació de piretroides (continuació).

| Matriu | Extracció | Purificació | Anàlisi instrumental | Recuperacions | LOD | Referències |
|----------------------------|--|-----------------------------------|----------------------|---------------|---|---|
| <i>MATRIUS BIOLÒGIQUES</i> | | | | | | |
| Rata (sang i cervell) | LLE | SPE | HPLC-MS-MS | 80-120% | 0,05 ng ml ⁻¹ 0,3 ng g ⁻¹ ww | (E. J. Scollon et al., 2011) |
| (plasma) | LLE (prèvia precipitació de proteïnes) | - | HPLC-UV | 93-103% | 0,01 µg ml ⁻¹ * | (Kim, Bartlett, Anand, Bruckner, & Kim, 2006) |
| (plasma, cervell i múscul) | LLE (prèvia precipitació de proteïnes) | SPE | GC-MS-MS | 68-113% | 0,3-0,5 ng ml ⁻¹ * | (Gullick et al., 2016; Gullick et al., 2014) |
| Ous de pollastre | LLE | SPE | GC-MS | 87-118% | 1,2-4,0 ng g ⁻¹ ww | (Y. G. Li et al., 2016) |
| Carn de vedella | SPE | - | HPLC-MS-MS | 70-120% | 1 µg kg ⁻¹ ww * | (Chung & Lam, 2012) |
| Rebutjos d'aus de corral | UAEE | SPE | LC-MS-MS | 79-85% | 1 ng ml ⁻¹ * | (Coleman et al., 2013) |
| Peix | LLE | SPE | GC-MS-MS | 60-127% | 2-13 µg kg ⁻¹ * | (Chatterjee et al., 2016) |
| Peix | PLE | GPC+Florisil | GC-ECD | 74-98% | 1-4 ng g ⁻¹ | (Mekebri et al., 2008) |
| Vegetals | SPME | - | GC-ECD | 67-94% | 0.21-0.49 ng g ⁻¹ | (Y. Zhang, Wang, Lin, Fang, & Wang, 2012) |
| | LLE | Graphene | GC-ECD | 44-92% | 2.5-10 ng g ⁻¹ | (X. Wu et al., 2012) |
| | LLE | SPE | GC-ECD | 60-128% | 0,02-4,5 ng g ⁻¹ ww | (Farina, Abdullah, Bibi, & Khalik, 2017) |
| | UA/MASE | (unificada al procés d'extracció) | GC-MS-MS | 72-114% | 0,29-9,38 ng g ⁻¹ ww | (H. S. Wu et al., 2017) |
| Algues | MSPD | Florisil | GC-MS | 82-109% | 0.3-2.4 ng g ⁻¹ | (Garcia-Rodriguez, Cela-Torrijos, Lorenzo-Ferreira, & Carro-Diaz, 2012) |
| Oli de llavors | MSPD | Florisil | GCxGC-TOF | - | - | (X. Wang et al., 2012) |
| Oli vegetal | SPE | C18 | GC-MS-MS | 91-104% | 0.3-1.4 ng g ⁻¹ | (Esteve-Turrillas et al., 2005) |

Taula 1.5: Resum de mètodes analítics per a la determinació de piretroides (continuació).

| Matriu | Extracció | Purificació | Anàlisi instrumental | Recuperacions | LOD | Referències |
|------------------------|-----------|---------------------|----------------------|---------------|---|--------------------------------|
| <i>MATRIUS HUMANES</i> | | | | | | |
| Plasma | SPE | silica | GC-MS | 100-120% | 4-8 ng L ⁻¹ | (Channa et al., 2012) |
| | SPE | - | GC-MS | 88-128% | 17-93 ng L ⁻¹ | (Perez et al., 2010) |
| Sang | LLE | - | GC-MS | 91-103% | 0.2-5 ng L ⁻¹ | (Ramesh & Ravi, 2004b) |
| | LLE | - | GC-MS | 108-124% | <10 ³ ng L ⁻¹ | (Corrion et al., 2005) |
| Llet humana | LLE | Florisil | GC-ECD | 30-92% | 15-30 ng g ⁻¹ lw | (Zehringer & Herrmann, 2001) |
| | LLE | silica | GC-ECD | - | 0.2-0.6 ng L ⁻¹ lw * | (Bouwman et al., 2006) |
| | UAEE | Basic alumina + C18 | GC-MS-MS | 48-91% | 4·10 ⁻³ -1.1 ng g ⁻¹ lw | (Maria Luisa Feo et al., 2012) |

*Aquest valor es refereix a LOQ enlloc de LOD.

ww = pes humit, dw = pes sec, lw = pes lipídic

consum humà, generalment cultivats o criats sota condicions de la indústria agrària i amb exposició controlada als piretroides. Com es pot comprovar, en general aquestes matrius no són les que s'han estudiat durant la tesi ja que s'ha cregut convenient conèixer els nivells en biota salvatge per tal de ser capaç de descriure el comportament en el medi ambient, evitant l'avaluació d'aliments si no eren representatius d'un ecosistema o població. En aquests punts era on la bibliografia tenia més buits.

Tot i així, a continuació es relataran i resumiran alguns dels nivells ambientals descrits a la bibliografia tant en matrius d'aigua, sòl i aire, com en biòtiques, incloent l'avaluació de l'exposició humana a piretroides.

1.7.1 Contaminació a l'aigua, el sòl i l'aire

Els piretroides són compostos bàsicament hidrofòbics (veure apartat de propietats fisicoquímiques). Això ja indica que aquelles matrius on més presència de piretroides hi haurà seran aquelles en les que hi hagi aportació orgànica. Per tant, en les columnes d'aigua cal esperar uns nivells molt baixos. En cas de que hi hagi matèria suspesa en l'aigua, però, és probable que els piretroides s'acumulin en aquestes obtenint nivells superiors en aquest particulat que en l'aigua filtrada.

En sòls, probablement el nivell de carboni orgànic total (TOC, de l'anglès Total Orgànic Carbon) pot ser un factor a tenir en compte per entendre els nivells de piretroides. També en

sediments de rius, aquest factor se sol tenir en compte a l'hora d'avaluar la presència de contaminants orgànics com els piretroides.

Pel que fa a l'aire, també és esperable que es trobin associats a partícules de pols, tot i que cal estudiar bé la distribució entre partícules depositades i aèries per comprovar amb quina grandària de partícula es troben més quantitat de piretroides i saber, així, si els piretroides tendeixen a depositar-se ràpidament o a quedar-se en la fase aèria.

A totes tres matrius, afectarà també si l'exposició a la que estan sotmesos és puntual, periòdica o contínua i, en cas que no sigui contínua, el temps transcorregut des de l'última aplicació. L'explicació a aquests diferents tipus d'exposicions dependrà de l'àmbit d'ús. Per exemple, en el medi agrari, se solen aplicar els insecticides en determinats moments del desenvolupament del cultiu. Per tant, a més dels camps de conreu, el medi que els envolta rebrà una dosi de insecticida periòdicament coincidint amb l'aplicació sobre els conreus. D'altra banda, en l'àmbit domèstic, els usos poden ser més continus durant els períodes de major presència de mosquits i altres insectes generalment no desitjats en llars i jardins.

El temps transcorregut des de l'última aplicació de pesticida fins a la presa de mostra és important ja que els piretroides són relativament inestables en el medi ambient. Des de fa molts anys s'ha estudiat l'estabilitat d'aquests insecticides en el medi ambient, no només amb finalitats ambientals sinó també per determinar el temps de duració del seu efecte per a determinar l'aplicació més adequada (Class, 1991; Roberts & Standen, 1981). Un dels tipus de degradació al que es veuen sotmesos els piretroides és la hidròlisi que dona lloc a l'àcid i l'alcohol. Aquest alcohol, alhora, s'oxida a l'àcid corresponent (Roberts & Standen, 1981). Aquesta hidròlisi és equivalent a la que es produeix catalitzada gràcies a les carboxilases en els éssers vius (veure apartat de metabolització). Justament, la biotransformació és un altra dels mètodes més comuns de degradació d'aquests compostos ja que molts són fàcilment biodegradables per fongs i bacteris que es podrien trobar al medi. Aquests bacteris i fongs sovint són capaços de aprofitar els piretroides, com tantes altres substàncies, com a substrat per extreure'n energia. El resultat final d'aquesta biotransformació dona lloc a CO₂. (Cycoń & Piotrowska-Seget, 2016; Mir-Tutusaus et al., 2014). Tot i així hi ha un altra mecanisme de degradació molt més ràpid que la hidròlisi o la biotransformació: la fotodegradació. Aquesta, al ser radicalària, inclou molts mecanismes diversos i isomeritzacions possibles. Tot i així, els productes finals de reacció són els mateixos que amb la hidròlisi o algun isòmer funcional dels mateixos (Fernandez-Alvarez, Lores, Llompart, Garcia-Jares, & Cela, 2007; P. Liu, Liu, Liu, & Liu,

2010). Tot això fa que els temps de vida mitjans dels piretroides en el medi ambient s'acostumin a estimar en menys de 90 dies (UH, 2011).

Els diferents estudis verifiquen els nivells relativament baixos a sistemes aquàtics, de l'ordre 0,1 ppb. Per exemple, en un estudi de Portugal, al riu Tajo es van descriure nivells de 553 ngL⁻¹ de cipermetrina, 276 ngL⁻¹ de deltametrina i 282 ngL⁻¹ de cihalotrina (Rocha, Ribeiro, Cruzeiro, Figueiredo, & Rocha, 2012). Al riu Ebre, els nivells trobats es reduïen fins als 30 ngL⁻¹ de cipermetrina i 49 ngL⁻¹ de deltametrina (M. L. Feo, Ginebreda, et al., 2010). En aquest últim estudi, es va relacionar el nivell de piretroide trobat amb el període d'aplicació. D'aquesta manera, demostraven que durant el temps posterior a l'aplicació del pesticida es podia trobar residus però que al cap d'uns mesos els nivells de insecticida a l'aigua era molt inferior o fins i tot inexistent. A escala mundial, altres estudis van trobar els mateixos piretroides i, per exemple a Beijing, a més, el fenvalerat amb nivells que arribaven al 4,9 ngL⁻¹ (Xue et al., 2005). A Califòrnia, es van descriure nivells de fins a 17,5 ngL⁻¹ de bifentrina i cihalotrina (Weston & Lydy, 2010). Val a dir, però, que Califòrnia és un estat on s'estima que anualment s'apliquen més de 1,6 milions de kilograms d'ingredients actius de pesticides només per professionals. A aquests valors cal afegir l'aplicació per part de particulars (CDPR, 2012).

Alguns d'aquests estudis de residus de piretroides en aigua dolça van incloure també l'estudi dels sediments de riu. A l'Ebre, per exemple es va trobar exactament els mateixos piretroides a l'aigua i al sediment, amb nivells que anaven des dels 8,27 to 71,9 ng g⁻¹ (M. L. Feo, Ginebreda, et al., 2010). A Beijing nivells de fins 0,30 ng g⁻¹ (Xue et al., 2005) i a Califòrnia d'entre 1,48 ng g⁻¹ i 365,5 ng g⁻¹ (You, Weston, & Lydy, 2004). Recentment també s'han comprovat els nivells de cyhalotrina en sediments marins de mostres de la costa de Portugal. Els autors no van ser capaços de trobar nivells superiors als LODs (Rodrigues, Pardal, Salgueiro-Gonzalez, Muniategui-Lorenzo, & Alpendurada, 2016). En sediments extrets en salmonicultures xilenes on s'empren piretroides (cipermetrina i deltametrina) o vora d'aquests, s'han trobat residus en el cas de la cipermetrina amb rang des dels 18,0 ng g⁻¹ als 1323,7 ng g⁻¹ pes sec (dw). En el cas de la deltametrina no es va trobar en nivells superiors al LOD (10,4 ng g⁻¹ dw) (Tucca et al., 2017). Altres estudis realitzats en piscifactories d'altres països els nivells obtinguts han sigut inferiors a aquests (a Escòcia: 0,03-7,19 ng g⁻¹(SEPA, 2007), indetectables a Noruega (Langford, Oxnevad, Schoyen, & Thomas, 2014)).

En mostres d'aire, molts treballs es basen en estudis d'aire d'interior un cop aplicat un insecticida comercial conegut (H. Z. Li, Lydy, & You, 2016; Sukiene et al., 2017; Yoshida, 2009). Per tant, els nivells no son representatius de la possible contaminació de l'aire per piretroides.

Tot i així, expliquen comportaments dels piretroides com ara la capacitat en ambients d'interior de reduir-se les concentracions de piretroides a nivells similars als mesurats prèviament a l'aplicació en unes 12-16h si hi ha ventilació. (H. Z. Li et al., 2016)

Respecte a la distribució fase aèria / partículat, alguns treballs han demostrat la major presència de piretroides en el partículat i en la pols depositada, més que no pas en la fracció més gasosa, tot i que depèn del piretroide en concret la relació entre aquestes fraccions (H. Z. Li et al., 2016; H. Z. Li, Ma, Lydy, & You, 2014).

Pel que fa a pols, a França es va dur a terme un mostreig de pols a cases representatiu de tot el país analitzant diferents contaminants orgànics semi-volàtils (SVOC, de l'anglès Semi Volatile Organic Compound). De piretroides van incloure la permetrina i van descriure nivells mitjans de $55,9 \text{ pg m}^{-3}$, amb un 76% de mostres amb nivells superiors al LOD ($20,9 \text{ pg m}^{-3}$) i un 54% superiors al LOQ ($41,8 \text{ pg m}^{-3}$). Respecte de la relació amb altres SVOC, la permetrina n'era independent de la resta dels 40 compostos estudiats (PAHs, pesticides organoclorats i organofosforats, PBDEs, PCBs, ftalats i alquilfenols, entre d'altres), indicant que la seva presència s'explica per fonts independents a les de la resta (Mandin et al., 2016). En mostres de pols recollides amb un aspirador a cases de Carolina del Nord i Ohio, es va analitzar la presència de 13 piretroides. A totes les mostres es va trobar permetrina, amb una concentració mitjana de 1454 ng g^{-1} . La resta de piretroides trobats presentaven concentracions mitjanes inferiors a 100 ng g^{-1} . La resmetrina, la pral-letrina i la fenpropatrina no es van detectar a cap mostra (Starr, Graham, Li, Andrews, & Nishioka, 2008). Un estudi recent de pols urbana en exteriors a Califòrnia descriu nivells de permetrina de fins a $8,852 \text{ } \mu\text{g g}^{-1}$ i nivells màxims del mateix ordre per a altres piretroides com la deltametrina, la cipermetrina, la λ -cihalotrina, la fenpropatrina i la ciflutrina (Richards, Reif, Luo, & Gan, 2016). Aquest estudi, complementat per un altre del mateix grup, va comprovar la presència més o menys uniforme de piretroides al voltant de les cases per zones pavimentades que no són objecte d'aplicació directa d'insecticides, la qual cosa va fer pensar als autors que la persistència i la redistribució dels piretroides per tota la zona eren relativament grans. També van estudiar la presència d'aquests piretroides en diferents èpoques de l'any arribant a la conclusió que en l'època de pluges aquestes eren capaces de reduir significativament els nivells de insecticides al voltant de les cases (Jiang et al., 2016; Richards et al., 2016).

1.7.2 Mostres alimentàries

Evidentment, en aliments és on més s'ha estudiat la presència de piretroides. Com s'ha exposat, els nivells permesos per la UE actualment depenen de l'aliment però com a valor

estàndard es pot prendre els $0,01 \text{ mg kg}^{-1}$ (EC, 2005). En algunes marines es van trobar nivells de tetrametrina, empetrina i cipermetrina però tots ells inferiors als nivells de LOQ del mètode així que no es van poder quantificar aquests nivells. De tota manera, aquests nivells estarien per sota del MRL marcat per la Unió Europea. En te de la Xina es van trobar bifentrina, permetrina, cipermetrina, tetrametrina, cihalotrina, fenvalerat, fluvalinat i fenpropatrina. Es va demostrar que tant la seva presència com l'isòmer més present de cada piretroide depenia del tipus de te. Els nivells acostumaven a estar al voltant de les desenes de ng g^{-1} , però el nivell màxim superava els $3 \mu\text{g g}^{-1}$ per a la bifentrina en te aromàtic (Kuang et al., 2010). Tot i així, en el cas dels tes, diferents autors asseguren que a la infusió d'aquests tes no hi ha residus de piretroides en nivells importants, en part per la baixa solubilitat dels piretroides a l'aigua (Manikandan, Seenivasan, Ganapathy, Muraleedharan, & Selvasundaram, 2009).

Els productes vegetals també han sigut tema de molts estudis de piretroides. A la Índia un estudi realitzat sobre diversos productes com tomàquets i coliflors comprats a mercats habituals van trobar piretroides (fenpropatrina, cihalotrina, cipermetrina i deltametrina, en el rang dels 1 als 3 ng g^{-1} , és a dir, per sota dels MRL que marca la EU (Choudhury, Das, & Baruah, 2013). Un altre estudi, aquest a Carolina del Nord, va comprovar que els tomàquets, enciams, pomes, raïm i plàtans comprats al mercat, i que provenien de EEUU., Canadà i Mèxic, hi havia residus de piretroides. De fet el 75% de les mostres contenia residus d'almenys 1 compost i un 20% de al menys dos. Tot i així, tots els valors eren dins el rang de MRL permès (W. Li, Morgan, Graham, & Starr, 2016). Al Singapur també es van trobar resultats similars en 10 productes vegetals diferents (Yu & Yang, 2017). Un altre estudi fet a Tanzània, amb espinacs, cogombres i cebes van detectar cipermetrina en el 25%, 33% i 16,9% de les mostres. Només una de les seves va obtenir un nivell que excedia el MRL en 1,4 vegades (Mahugija et al., 2017). Per contra, un estudi semblant a Ghana, va determinar 8 piretroides comuns en albergínies, xili i okra. Van trobar que el 62,3% del total de 155 mostres eren positives per algun dels piretroides estudiats i que un 30% d'aquestes sobrepassaven els MRL de la EU. Val a dir que a Ghana el 41% dels insecticides emprats en cultius alimentaris són piretroides (Blankson et al., 2016). Tots aquests estudis posen en relleu que en els productes vegetals dels mercats de gran part del món hi ha residus de piretroides tot i que, els MRL se solen respectar a la majoria de països.

Un altre aliment que també s'ha estudiat és el musclo, per exemple. Concretament en un estudi al laboratori sobre l'espècie *Mytilus edulis*, es va comprovar la bioacumulació de cipermetrina. Es va comprovar que la relació entre els dos isòmers canviava de la mescla

comercial al trobat en els musclos. Així doncs, l'isòmer *trans* disminuïa mentre que el *cis*, que en moltes espècies animals es descriu com el més tòxic per ser menys metabolitzable, s'acumulava en més quantitat (Gowland et al., 2002). D'altres estudis també han comprovat que en exposicions controlades al laboratori els musclos acumulen la cipermetrina, la qual repercuteix en el seus sistemes biològics (Khazri et al., 2015). Sobre l'espècie *Unio gibbus* es va demostrar que l'acumulació, a més, era diastereoselectiva, sent el isòmer *cis* el més bioacumulat degut a la menor metabolització. També es va comprovar la enantioselectivitat del metabolisme d'aquest bivalve, resultant que els isòmers *cis* (1R-3R- α R) i el (1S-3S- α R) s'acumulaven més que no pas els seus parells enantiomèrics (1S-3S- α S) i (1R-3R- α S), respectivament. Aquest comportament, però, variava segons la concentració a la qual era exposat el musclo. A concentracions molt elevades el metabolisme semblava sobrepassat i la relació enantiomèrica dels parells eren equivalents als del medi (Khazri et al., 2016).

Recentment, en granges alguns autors han descrit nivells de piretroides en els ous recollits de pollastres sempre dins dels límits permessos per la EU (dell'Oro et al., 2014; dos Reis Souza, Moreira, de Lima, Aquino, & Dorea, 2013; Y. G. Li et al., 2016). Al Brasil, es van analitzar 132 mostres llet de vaca extretes directament del tanc de mescla. Aquests autors van trobar que el 12,9% dels mostrejos eren positius per cipermetrina i el 2,2% per deltametrina tot i que no inclouen els nivells concrets al seu treball (Picinin et al., 2017).

1.7.3 Bioacumulació en fauna silvestre

En d'altres éssers vius també s'han realitzat alguns estudis. En fauna silvestre, hi ha molt pocs estudis sobre piretroides. Al inici de la tesi no se'n va trobar cap. Actualment, a part dels duts a terme pel nostre grup pocs més se'n troben. Un dels pocs exemples de determinació en biota salvatge són uns estudis sobre poblacions de perdius de França. Aquestes són exposades directament a piretroides donat que el seu habitat coexisteix amb cultius de cereals. Els diferents estudis d'aquestes mateixes aus, demostren que aquestes efectivament eren exposades a piretroides i els acumulaven. Els nivells trobats en ous d'aquests animals arribaven a 0,01 $\mu\text{g g}^{-1}$ de λ -cihalotrina (Bro, Devillers, Millot, & Decors, 2016), mentre que en cossos morts es van trobar nivells d'entre 0,01 fins a 0,11 $\mu\text{g g}^{-1}$ de teflutrina, ciflutrina i cipermetrina (Millot, Berny, Decors, & Bro, 2015).

La presència de piretroides en teixits tant animal com vegetal d'espècies diferents demostra que els organismes absorbeixen i assimilen aquests insecticides i els poden acumular, és a dir, que no es metabolitza completament tota la quantitat de piretroides als que són exposats.

1.7.4 Exposició humana

Veient la persistència al medi dels piretroides i els nivells ambientals i en aliments, es pot deduir que les principals fonts de exposició humana seran l'aplicació directa de piretroides i la ingesta d'aliments contaminats. El primer cas pot repercutir sobretot en grups de risc com ara treballadors que estiguin exposats als piretroides de forma continua o a nivells relativament elevats i també infants. Com s'ha exposat ja prèviament, els enzims carboxilesterases i monooxigenases encarregats de la detoxicació dels xenobiòtics depèn de l'edat i a edats de fins a 6 anys és possible que no sigui tan eficient com els dels adults (Huang et al., 2005; Song et al., 2017). A més, referent a la ingesta, fins que s'arriba a la pubertat la relació quantitat d'aliment ingerit diàriament amb el pes corporal és més gran que no pas els adults. Això fa que, també per aquest aspecte, els infants siguin una població de risc a tenir en compte.

Per tal de comprovar l'exposició humana als piretroides, molts autors s'han decantat per la comprovació en orina de metabòlits dels piretroides. Els metabòlits més habituals són el 3PBA i el DCCA (provinents tots dos de la permetrina i la cipermetrina, tot i que no són exclusius d'aquestes) i alguns autors també inclouen algun altre com el DBCA (àcid 3-2,2-diclorovinil-2,2-dimetilciclopropano-1-carboxilic) o el FPBA (àcid 4-fluoro-3-fenoxibenzoic). Altres metabòlits concrets també s'han avaluat però són estudis molt aïllats. Aquests estudis en orina s'han realitzat tant en població de risc, treballadors (fins a $12\mu\text{mol}\cdot(\text{mol creatinina})^{-1}$) (D. Lu et al., 2013; Ratelle, Côté, & Bouchard, 2016) i nens (rangs de 0,06 to 0,86 ng mL^{-1}) (Tao et al., 2013), com població general (nivells fins a 1,97 $\mu\text{g L}^{-1}$) (Barr et al., 2010; Göen, Schmidt, Lichtensteiger, & Schlumpf, 2017; Han et al., 2017). Alguns dels estudis inclòs han tractat de relacionar els nivells de metabòlits de piretroides en orina amb malalties diverses (Han et al., 2017; J. Zhang et al., 2013). Els avantatges d'aquestes tècniques és evident. Les mostres són relativament simples d'obtenir i no requereixen cap mesura invasiva per al mostreig. Aquesta tècnica, però, té algunes deficiències com ara la poca reproduïbilitat donades les característiques de l'orina, tot i que estandaritzant els protocols de presa de mostra i de dades referides a substàncies més constants en la orina com la creatinina, potser es podrien evitar en part (Morgan et al., 2016). També presenta dificultats evidents per poder conèixer l'exposició real als piretroides i la dificultat per relacionar dades de metabòlits en orina amb exposició real (Göen et al., 2017). Tot i així, per a esbrinar tendències més o menys qualitatives sí que podria ser útil. Altres autors han preferit comprovar la presència dels metabòlits en sang (Channa et al., 2012; Ramesh & Ravi, 2004b). Fins i tot, alguns autors han decidit comprovar la quantitat de metabòlits en riu per tal de relacionar-ho amb els nivells d'exposició humana (Rousis et al., 2017). Tot i així, com ja s'ha discutit prèviament, els metabòlits solen ser molt generals de

molts piretroides així que es fa difícil reconèixer el piretroide concret i la font d'exposició en poblacions en general.

Per tant, d'altres autors decidiren comprovar els nivells de piretroides directament en matrius humanes. Just al 2012, inici d'aquesta tesi, es va publicar un article on trobaven nivells de permetrina, ciflutrina, cipermetrina i deltametrina a nivells de 86, 78, 18 i 102 pg mL^{-1} a plasma de dones de zones rurals de Sud-Àfrica (Channa et al., 2012). Prèviament, però uns altres autors no havien detectat piretroides en sang ni en cabell humà (només analitzaren cipermetrina i ciflutrina). Tot i així, sí que en van detectar en el meconi (Corrion et al., 2005; Ostrea et al., 2009). Un estudi del 2010 realitzat amb plasma sanguini de dones de Nova York recollit del 1999 al 2004, trobà nivells de piretroides massa baixos per quantificar-los, tot i que justificaren aquest fet a la possible degradació durant els anys d'emmagatzematge (Perez et al., 2010).

També s'havia estudiat la presència de piretroides en llet materna. Els primers estudis al respecte daten del 2001 en un estudi a Suïssa. Els autors van trobar alletrina, bifentrina, ciflutrima, cihalotrina, cipermetrina, fenpropatrina, flucitrat, fluvalinat, permetrina i tetrametrina. La permetrina va ser el piretroide més abundant i que es trobava a més quantitat de mostres, arribant a nivells de 152 ng g^{-1} en pes lipídic (lw, de l'anglès lipid weight) (Zehring & Herrmann, 2001). Un altre estudi realitzat a Sud-Àfrica sobre dones treballadores dels camps de cotó, on s'utilitzaven pesticides, va descriure nivells de permetrina, ciflutrina, deltametrina i cipermetrina (en ordre decreixent de prevalència) en nivells de fins a 13,9 microg g^{-1} lw (Bouwman et al., 2006; Sereda, Bouwman, & Kylin, 2009). Per últim, el grup amb el qual s'ha fet aquesta tesi també havia estudiat la presència de piretroides en llet materna en una població de Moçambic que estava exposada a piretroides per lluitar contra la malària, malaltia endèmica allà. En ordre decreixent de nivells descrits, els piretroides per als quals els anàlisis van ser positius foren la cihalotrina, la permetrina, el fenvalerat, la cipermetrina, la tetrametrina, la bifentrina i la ciflutrina. Els nivells trobats van arribar als 695 ng g^{-1} lw. Un estudi en població no exposada d'Atlanta, no va trobar nivells detectables de piretroides a llets maternes recollides durant el 2010-11 (X. Chen et al., 2014).

Tots aquests estudis, van posar en evidència la necessitat d'estudiar els piretroides des d'un altre punt de vista, des del qual ja no es tracta de substàncies innòcues per a la biota no

objectiu dels insecticides sinó que podria ser que s'acumulin en els organismes de manera similar que fan altres contaminants orgànics. A més, tal com succeeix amb la resta de mamífers, els humans són capaços de metabolitzar els piretroides, com s'ha exposat a l'apartat de [Metabolització](#). Malgrat això, aquests estudis esmentats posen en relleu que una part dels piretroides que entren a l'organisme humà s'acumula, probablement en les estructures més greixoses, donada l'afinitat lipofílica d'aquests compostos. En productes greixosos (com ara la llet materna) segregats per aquests humans exposats a piretroides, doncs, no ha de ser estrany trobar restes d'aquests piretroides.

Amb aquest context és com es planteja l'inici d'aquesta tesi, ressaltant la necessitat de comprendre millor, per una banda, el comportament ambiental dels piretroides, i, per l'altre, com afecta l'exposició dels piretroides als diferents organismes, terrestres i aquàtics, sense oblidar el cas particular dels mamífers i, concretament, dels humans.

Capítol 2

Objectius

2.1. Objectius Generals i específics.

Amb el context introduït es va dissenyar el plantejament d'aquesta tesi amb l'objectiu principal de comprovar el comportament dels piretroides com a contaminants ambientals. Una de les hipòtesis inicials era que podrien arribar a ser considerats *pseudo*-POPs donada la seva presència ubiqua en el medi ambient. Per tant calien més estudis per tal de discernir aquesta possibilitat.

Comprovant la manca de informació sobre la isomeria dels piretroides en mostres ambientals, un punt que requeria més investigació era l'anàlisi isomèrica en els diferents medis i calia aprofundir-hi, donades les implicacions toxicològiques.

Per últim, un cop conegut aquest comportament, era interessant dur a terme una avaluació del risc per a humans, tot comprovant l'exposició real en poblacions generals no de risc.

Per tot això, es van plantejar els següents objectius específics:

Referents a metodologia analítica:

- Dissenyar una metodologia més completa de piretroides d'ús habitual, des d'un punt de vista d'anàlisi instrumental i tractament de mostra.
- Optimitzar una metodologia instrumental per a la discriminació enantiomèrica dels piretroides.
- Adaptar les metodologies a cada nova matriu a analitzar, tenint en compte diferències en composició

Referents a anàlisi ambiental:

- Verificar la presència dels piretroides en diferents medis i ecosistemes, ja siguin terrestres, aquàtics, propers a civilitzacions, allunyats o protegits per interès bioambiental.
- Comprovar si els piretroides es transporten a llargues distàncies.
- Assenyalar la presència de piretroides en fauna salvatge, si es donés.
- Descriure diferències inter-espècie i intra-espècie a les exposicions de piretroides.
- Demostrar la bioacumulació dels piretroides en espècies de diferents nivells tròfics i hàbits alimentaris.
- Comprovar si els piretroides es poden biomagnificar.

- Reportar comportaments isomero- i enantiomero-selectius en l'acumulació dels piretroides, si fos el cas.
- Caracteritzar la distribució dels piretroides dins els organismes.

Referents a exposició humana:

- Identificar la potencial presència de piretroides en mostres humanes de poblacions generals i de risc.
- Avaluar el risc en poblacions lactants de la presència dels piretroides en la llet materna.
- Comprovar els factors que afecten a la bioacumulació de piretroides en humans.
- Testar la toxicitat en humans gràcies a assaigs amb cèl·lules.
- Constatar els efectes de l'exposició a més d'un piretroide alhora.

2.2. Estructura de la tesi.

Com que la tesi opta a menció internacional aquesta tesi està escrita en català com a llengua vehicular i anglès com a segona llengua. En anglès es trobaran tots els articles , el resum i les conclusions.

Aquesta tesis es divideix en quatre grans capítols. El primer inclou una introducció als piretroides, tant des del punt de vista mediambiental com de la química analítica.

El segon capítol se centra en la metodologia desenvolupada i aplicada durant aquesta tesi. Inclou la [Publicació 1](#).

El tercer capítol, bioacumulació en biota salvatge, exposa els estudis de presència i comportament dels piretroides dins organismes vius, concretament tots ells del regne animal. Aquest capítol inclou les [Publicació 2](#), [Publicació 3](#), [Publicació 4](#) i [Publicació 5](#), aquesta darrera recentment enviada a la revista.

El darrer gran capítol d'aquesta tesi tracta sobre l'exposició humana als piretroides i inclou la [Publicació 6](#).

Finalment, les conclusions resumeixen en grans trets les fites de tots aquests estudis en conjunt.

Capítol 3

Metodologia analítica

3.1. Introducció.

Com s'ha presentat prèviament, els piretroides es poden determinar per diferents metodologies analítiques. Donats els requeriments de LODs baixos, les més adequades són aquelles que corresponen a GC-MS i GC-MS-MS. A més, donat que el mètode de detecció amb MS-MS també presenta gran millora respecte a d'altres deteccions, sembla lògic que en el grup on es va realitzar la tesi ja s'hagués optimitzat la metodologia d'anàlisi de piretroides amb aquest tipus d'equip instrumental (M. L. Feo, Eljarrat, et al., 2010b). Aquesta metodologia, però era limitada a uns 12 piretroides. En aquest capítol es presentarà l'ampliació d'aquesta metodologia que, malgrat no va donar lloc a una publicació pròpia, sí que posteriorment s'ha emprat en altres treballs. És important entendre, doncs, que la metodologia va anar variant mínimament i modificant-se per introduir diferents piretroides, fet pel qual durant aquesta tesi, es poden trobar treballs que comproven la presència d'un nombre diferent de piretroides. En aquest capítol, però, se sintetitzarà tota l'optimització dels nous piretroides i es mostrarà que el mètode final obtingut va ser emprat en d'altres publicacions.

A més, cada nova matriu de mostra requeria unes petites modificacions que, en general, es limitaven a optimitzar la quantitat de mostra emprada. Per tant, aquests detalls, també van ser optimitzats en cada nou treball i en aquest capítol també se'n farà un resum.

D'altra banda, aquesta metodologia, no permetia la discriminació enantiomèrica. Com s'ha discutit, l'enantiomeria és un factor clau per a entendre la toxicologia i, probablement, el comportament ambiental. Per tant, un de les primeres fites de la tesi va ser l'optimització d'un mètode que permetés la separació enantiomèrica dels piretroides.

Fins al inici d'aquesta tesi cap mètode reportat havia sigut capaç de separar tots els enantiòmers d'un mateix piretroide. Els primers intents consistien en cromatografia en tàndem de dues columnes, una CDX-8 i una DB1701. Aquest mètode, però era capaç de separar els enantiòmers *trans* de l'al·letrina però no de la cipermetrina, els dos piretroides estudiats. De la cipermetrina només foren capaços de diferenciar diastereòmers (Kutter & Class, 1992). Posteriorment, uns altres autors van desenvolupar un mètode quiral per piretroides amb una columna BGB-172, la fase estacionària de la qual consisteix en un recobriment de β -ciclodextrina. Aquest però, és un recobriment no enllaçat amb la sílice de la columna i, per tant, es tracta d'una columna molt sensible que canvis importants en la temperatura i que a temperatures relativament baixes per a GC, com ara 150°C es pot fer malbé. Aquests autors, en diferents treballs, van aconseguir separar els enantiòmers *cis* de la permetrina, bifentrina cipermetrina i ciflutrina (W. P. Liu & Gan, 2004a, 2004b).

Els cromatogrames resultants eren, doncs de la següent manera. Per a la bifentrina van analitzar la *cis*-bifentrina així que resoleren un cromatograma amb dos únics pics. Per a la permetrina obtingueren 3 pics, els dos primers corresponents als dos enantiòmers *cis* i el tercer la mescla dels dos enantiòmers *trans*, ja que al ser un piretroide tipus I li corresponen 4 enantiòmers. A la Figura 4.a, es mostra un cromatograma típic d'un piretroide tipus I separat per aquest mètode diasterisomèricament i enantiomèrica. Els cromatogrames de la ciflutrina i la cipermetrina resultaren ser molt similars entre ells. Com que el mètode només separava enantiòmers *cis*, els 8 isòmers típics d'un piretroide tipus II es distribuïen en 6 pics corresponents, en ordre creixent d'elució, els primers dos pics a dos enantiòmers *cis*, un a una mescla d'un parell enantiomèric *trans*, dos pics a un altre parell d'enantiòmers *cis* resolt i un últim pic corresponent a la mescla de l'altre parell enantiomèric *trans* (veure exemple típic a la Figura 4.b).

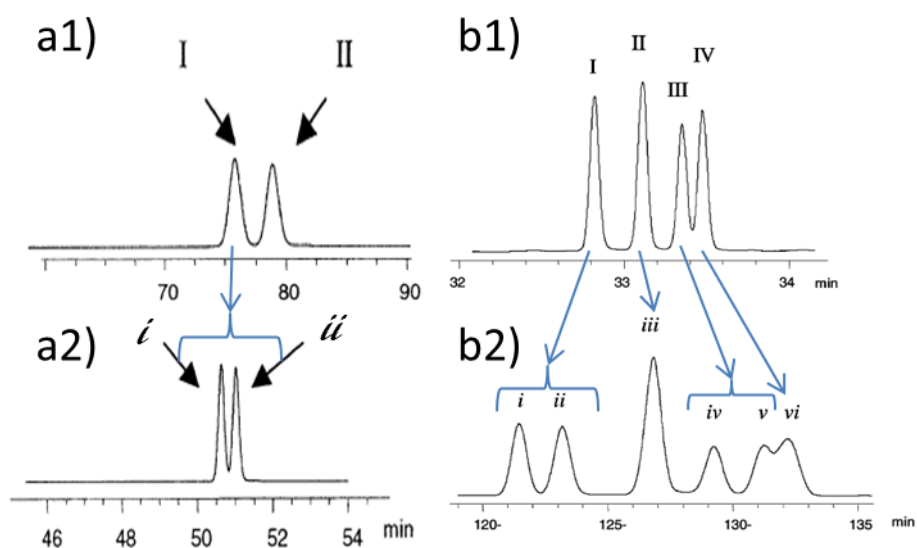


Figura 4: Exemples típics de la separació diasteroisomèrica (1) i enantiomèrica (2) de piretroides tipus I (a) i II (b). Per a piretroides tipus I: I – isòmers *cis*, II – isòmers *trans*, i – (1R-3R), ii – (1S-3S). Per a tipus II: I i III isòmers *cis*, II i IV isòmers *trans*, i – (1R-3R- α R), ii – (1S-3S- α S), iii – mescla isòmers (1S-3R- α R) i (1R-3S- α R), iv – (1R-3R- α S), v – (1S-3S- α R), vi – mescla isòmers (1S-3R- α R) i (1R-3S- α S). Exemples de la permetrina i la cipermetrina extrets de (W. P. Liu & Gan, 2004a, 2004b)

Com a resultat de tot l'exposat, a continuació s'inclou la publicació científica en la qual es detalla el desenvolupament analític de la metodologia enantio-selectiva. Tot seguit, s'exposarà les condicions òptimes per a l'anàlisi de piretroides que es va anant desenvolupant durant aquests anys.

Per últim, es discutiran i resumiran tant els resultats obtinguts com els avantatges d'aquesta metodologia.

3.2. Determinació quantitativa dels piretroides.

Pel que fa al nombre de piretroides, es va posar a punt un nou mètode capaç d'analitzar-ne 20, tot i que es va decidir no incloure un d'ells, raó per la qual va quedar un mètode per 19 piretroides. Els 12 ja inclosos en la metodologia prèviament a l'inici de la tesi eren: cis-bifentrina, ciflutrina, λ -cihalotrina, cipermetrina, deltametrina, fenotrina, fenvalerat, fluvalinat, permetrina, resmetrina, tetrametrina i tralometrina. Amb el nou mètode, es van incloure 8 piretroides nous. Aquests últims eren: al·letrina, etofenprox, flumetrina, halfenprox, imiprotrina, kadetrina, pral·letrina i transflutrina.

3.2.1 Condicions instrumentals del detector MS-MS

A la [Taula 3.1](#) es mostren els paràmetres òptims per a cadascun d'aquests nous piretroides, incloent les transicions seleccionades i les seves energies de col·lisió (CE, de l'anglès collision energy).

Taula 3.1: Condicions instrumentals bàsiques del MS-MS per als nous piretroides analitzats.

| | PM (g/mol) | 1 ^a transició (quantificació) | CE1 | 2 ^a transició (confirmació) | CE2 |
|------------------------------|---------------|---|-----|---|-----|
| Transflutrina | 371 | 207→35 | 10 | 209→35 | 20 |
| Esbiotrina (S-al·letrina) | 300 | 301→167 | 15 | 301→133 | 20 |
| Pral·letrina | 298 | 299→167 | 20 | 299→131 | 20 |
| Imiprotrina | 318 | 317→167 | 15 | 317→149 | 5 |
| Halfenprox | 477 | 347→147 | 25 | 347→93 | 45 |
| Etofenprox | 375 | 175→146 | 5 | 175→131 | 30 |
| Kadetrina | 396 | 395→229 | 10 | 395→165 | 15 |
| Flumetrina | 510 | 283→35 | 15 | 247→35 | 25 |

A més, però, es va comprovar que el mètode era òptim per a altres isòmers de piretroides com ara la *cis*-cihalotrina, de la qual fins al moment només s'avaluava la presència del parell enantiomèric conegut comercialment com a λ -cihalotrina, amb l'adquisició de nous patrons que incloguessin també aquests isòmers. També es va fer la comprovació en el cas de l'al·letrina.

Donat que instrumentalment era necessari, l'anàlisi era dividit en tres blocs segons el temps de retenció. A cada bloc, s'especificava una sèrie de transicions concretes pertanyents als piretroides que s'inclouen en aquell rang de temps d'elució. Aquest procediment és molt emprat per tal d'augmentar la sensibilitat dels equips de MS-MS. Això, no obstant, requereix, en teoria, que a cada bloc, o "finestra" com s'acostuma a anomenar en el llenguatge comú, hi consti com a mínim un patró intern. Fins al moment s'havien utilitzat només dues finestres i

dos patrons interns que eren dos dels piretroides més comuns deuterats, la d₆-permetrina i d₆-cipermetrina. Per temps de retenció, per presència en el medi ambient i per disponibilitat comercial es va triar la d₅-bifentrina com a nou patró intern. Aquesta selecció, però, no fou la més adient.

En el mètode emprat, les transicions de la bifentrina eren 205→141 i 205→121, les mateixes que per a la cihalotrina. El fragment on la molècula d₅-bifentrina es troba modificada isotòpicament, però, és fora de la selecció d'aquest fragment majoritari, com es troba representat gràficament en la [Figura 5](#). Això implicava, que amb la metodologia descrita per a la bifentrina era impossible diferenciar el compost nadiu del deuterat.

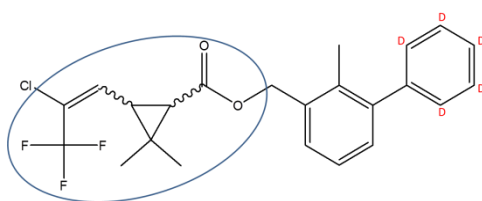


Figura 5: Estructura de la bifentrina. Encerclat, fragment amb PM de 205. En vermell, marcats els punts deuterats en la d₅-bifentrina.

Per tal de solucionar aquest contratemps, es va procurar optimitzar altres transicions per a la bifentrina que permetés la diferenciació de la molècula nativa. A la [Taula 3.2](#) es comproven les diferències entre ambdós mètodes.

Taula 3.2: Selecció de noves transicions per a la bifentrina i comparativa d'àrees obtingudes per un patró de 91ppb.

| | Transició bif. Nativa | Transició bif Deuterada | CE (eV) | Àrea pic (nadiu) |
|--------------|-----------------------|-------------------------|---------|------------------|
| Mètode nou | 387→205 | 392→205 | 5 | 130971 |
| | 387→141 | 392→141 | 25 | 24448 |
| Mètode antic | 205→141 | 205→141 | 20 | 1563110 |
| | 205→121 | 205→121 | 10 | 1948176 |

Com es comprova a la taula, la pèrdua de sensibilitat és de dos ordres de magnitud per a la transició més intensa. A més, el pic de confirmació és encara 6 cops menys intens. Això afectaria als LODs del nou mètode augmentant-los fins a valors indesitjables, ja que els nivells descrits arriben a concentracions que força vegades eren properes de l'antic LOD. Així doncs, emprant el nou mètode es perdria molta informació ambiental. Per aquesta raó es va decidir no utilitzar la d₅-bifentrina com a patró intern.

Això, però continuava plantejant un problema de manca de patrons interns en la nova metodologia. Finalment, com que els piretroides és una família dins dels insecticides, es va decidir emprar un altre insecticida de propietats similars àmpliament conegut i descrit a la

bibliografia, el clorpirifos. L'objectiu d'aquest, però, era únicament el control instrumental dins la finestra pertanyent. Això implica que no calia tenir en compte les seves diferències respecte a la família dels piretroides i el seu comportament ambiental, que probablement implicaria llargues discussions fora del marc d'aquesta tesi. El patró intern escollit, per tant, fou el d₁₀-clorpirifos.

Per últim, un dels nous piretroides optimitzats, el halfenprox, presentava uns valors de LOD gairebé mil cops inferiors a la resta. Això ens va fer retirar-lo dels nostres estudis habituals ja que els nivells de presència de piretroides en el medi ambient no arriben a aquests valors.

3.2.2 Mètode definitiu per a la determinació de piretroides

Tot i que amb aquest mètode la diferenciació de piretroides es deu a la massa dels diferents fragments de cada compost, es van canviar les condicions cromatogràfiques per tal d'aconseguir una elució dels compostos sense allargar el mètode previ de forma excessiva i, alhora, permetre, encara, una bona discriminació dels diastereoisòmers d'aquells piretroides que en presenten. Els paràmetres d'injecció, però, romangueren iguals que el mètode anterior, és a dir, mode *splitless* i 270°C. La nova rampa de temperatura començava a 100°C durant 1 min i augmentava a 12°C/min fins als 160°C. A continuació s'augmentava aquest pendent a 20°C/min fins als 230°C. Per tal d'eluir els últims compostos, però la temperatura havia d'augmentar encara fins els 265°C a un pendent de 10°C/min. Finalment, per acabar d'eluir qualsevol altra impuresa s'augmentava el pendent a 20°C/min altre cop i es mantenia a 310°C durant 2 min. La Figura 6 resumeix aquesta rampa de temperatures tot indicant les diferents finestres d'adquisició de dades i el rang de temps d'elució dels analits.

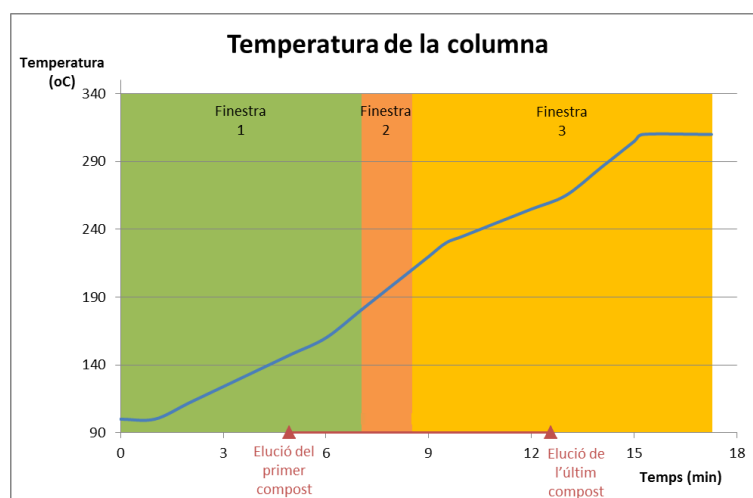


Figura 6: Rampa de temperatures del forn del cromatògraf. Distinció de les finestres d'adquisició de masses i rang de temps d'elució.

Com a resultes de tot el descrit, el mètode de detecció de piretroides, separat per finestres, amb la integració de tots els piretroides, fou el resumit en la [Taula 3.3](#).

Taula 3.3: Resum de les condicions i temps de retenció del mètode final. En negreta, els patrons interns.

| | | PM [§] | t _R 1* | t _R 2* | # pics | 1 ^a transició (quantificació) | CE1 | 2 ^a transició (confirmació) | CE2 |
|------------|-----------------------------------|-----------------|-------------------|-------------------|----------|--|-----------|--|-----------|
| Finestra 1 | Transluthrin | 371 | 4,93 | - | 1 | 207→35 | 10 | 209→35 | 20 |
| | Clorpirifos | 349 | 5,19 | - | 1 | 313→189 | 25 | 313→95 | 15 |
| | d₁₀-Clorpirifos | 359 | 5,19 | - | 1 | 323→189 | 25 | 323→95 | 15 |
| | Esbiotrina (S-al-letrina) | 300 | 5,69 | 5,75 | 2 | 301→167 | 15 | 301→133 | 20 |
| | Pral-letrina | 298 | 6,00 | - | 1 | 299→167 | 20 | 299→131 | 20 |
| | Imiprotrina | 318 | 6,68 | 6,76 | 2 | 317→167 | 15 | 317-149 | 5 |
| Finestra2 | Resmetrina | 338 | 7,10 | 7,16 | 2 | 337→149 | 10 | 337→187 | 10 |
| | Tetrametrina | 331 | 7,30 | 7,39 | 2 | 331→167 | 2 | - | - |
| | cis-Bifentina | 422 | 7,38 | - | 1 | 205→141 | 10 | 205→121 | 10 |
| | Fenotrina | | 7,57 | 7,64 | 2 | 294→250 | 15 | 294→194 | 15 |
| | Cihalotrina | 449 | 7,79 | 7,89 | 2 | 205→141 | 10 | 205→121 | 10 |
| | Permetrina | 390 | 8,27 | 8,35 | 2 | 207→35 | 2 | 209→35 | 2 |
| | d₆-Permetrina | 396 | 8,35 | - | 1 | 213→35 | 2 | 215→35 | 2 |
| Finestra3 | Ciflutrina | 433 | 8,63 | 8,77 | 4 | 207→35 | 2 | 209→35 | 2 |
| | Cipermetrina | 415 | 8,82 | 8,96 | 4 | 207→35 | 2 | 209→35 | 2 |
| | d₆-Cipermetrina | 421 | 8,90 | 8,96 | 2 | 213→35 | 2 | 215→35 | 2 |
| | Halfenprox | 477 | 8,84 | 9,02 | 2 | 347→147 | 25 | 347→93 | 45 |
| | Etofenprox | 375 | 9,02 | - | 1 | 175→146 | 5 | 175→131 | 30 |
| | Fenvalerat | 419 | 9,38 | 9,54 | 2 | 211→167 | 10 | 213→169 | 10 |
| | Fluvalinat | 502 | 9,54 | 9,44 | 2 | 294→250 | 15 | 294→194 | 15 |
| | Deltametrina | 503 | 9,94 | - | 1 | 297→79 | 2 | 297→81 | 2 |
| | Tralometrina | 661 | 9,94 | - | 1 | 297→79 | 2 | 297→81 | 2 |
| | Kadetrina | 396 | 10,44 | 11,00 | 2 | 395→229 | 10 | 395→165 | 15 |
| Flumetrina | 510 | 12,56 | 12,67 | 2 | 283→35 | 15 | 247→35 | 25 | |

* Temps de retenció del primer pic eluït (t_R1) i de l'últim (t_R2).

§ Pes Molecular calculat amb els isòtops ³⁵Cl i ⁷⁹Br.

3.3. Adaptació de la metodologia a diferents matrius.

Durant la tesi es va treballar amb diferents mostres que implicaven, cada una d'elles un repte nou a nivell d'extracció i purificació. El laboratori ja tenia a punt diversos mètodes per a l'anàlisi de piretroides en aigües (M. L. Feo, Eljarrat, et al., 2010b), sediments (M. L. Feo, Ginebreda, et al., 2010) i llet materna (M. L. Feo et al., 2011).

Per a l'anàlisi de les matrius analitzades durant aquesta tesi es van emprar els mateixos mètodes d'extracció de mostra ja publicats pel grup quan va ser possible, però va caldre l'adaptació del mètode en el cas de noves matrius com ara ous d'aus, peixos i diferents teixits

de dofins. Per similitud en la composició de la mostra, per aquestes matrius es va utilitzar el mètode d'anàlisi de llet materna com a referència.

El tractament de mostra d'aquesta metodologia consistia en una extracció amb hexà i diclorometà (Hx:DCM) assistida amb ultrasons. Prèviament s'havia comprovat al laboratori que altres mètodes d'extracció (com el PLE) tenien deficiències de recuperació d'anàlits degut, segurament, a la facilitat dels piretroides en degradar-se en una molècula acídica i una alcoholica.

Donat que les mostres biològiques a analitzar contenien una fracció de greixos important, aquesta extracció requeria d'una posterior purificació amb dos cartutxos en sèrie, un de C18 i l'altre d'alúmina bàsica. Ara sí, aquest extracte ja era a punt per ser redissolt en el dissolvent emprat en el instrument, l'acetat d'etil.

Aquests tractaments, es van haver d'adaptar a les matrius concretes a tractar. Bàsicament, optimitzant la quantitat de mostra s'obtenia una purificació correcta i unes concentracions en l'extracte purificat adient per a l'anàlisi instrumental. En el cas de mostres de baix contingut de greix (al voltant del 5%) la quantitat de mostra podia augmentar fins a 0,5 g sense perjudici de la recuperació (mostres de múscul o de peix, per exemple). Per a mostres de contingut lipídic superior era important reduir la quantitat de mostra ja que els cartutxos es podien obturar amb el greix. Mostres de continguts entre 10-20% de greix (ous) es podien pesar sobre 0,3 g tot i que si se suposava que la mostra podia contenir-ne més de greix, com era el cas de les llets maternes, era millor pesar només 0,1 g. En el cas de mostres amb molt de greix (teixit adipós) la quantitat de mostra s'havia de reduir fins a 0,05 g i petites quantitats de més podien fer, depenent de la mostra, que el cartutx no fos capaç de retenir tot el greix i l'extracte no fos vàlid per a l'anàlisi instrumental.

3.4. Determinació enantiomèrica dels piretroides.

Amb la mateixa preparació de mostra es va posar a punt una metodologia instrumental per tal de discriminar els enantiòmers d'alguns piretroides. Com s'ha introduït prèviament, el comportament de cada enantiòmer podria ser diferent en el medi ambient ja sigui degut a biodisponibilitats diferents, metabolització enantio-selectiva o fins i tot bioacumulació selectiva degut a qualsevol de les anteriors. A continuació, a la [Publicació 1](#), es desenvolupa la metodologia enantio-selectiva optimitzada per tal de dur a terme estudis ambientals i reconèixer el comportament dels piretroides tenint en compte el seu caràcter quiral.

Concretament, en aquesta publicació, un cop optimitzada la metodologia instrumental, es considerà una sèrie de mostres amb les que comprovar l'eficiència de la metodologia. Les primeres mostres estudiades foren uns insecticides comercials adquirits en un supermercat de Barcelona. Amb aquests es pretenia comprovar si les mescles comercials eren racèmiques o algun dels enantiòmers s'incrementaven per sobre d'altres industrialment.

A continuació es valorà una sèrie de mostres de llet materna de donants de Barcelona també, per tal de comprovar l'adequació de la metodologia amb mostres biològiques. Evidentment, es va pretendre relacionar els valors de les mostres de llet materna amb una potencial exposició a través de les mostres comercials analitzades, tot i que donada que l'exposició a piretroides de les donats era completament desconeguda, aquestes relacions no podien ser gaire fiables.

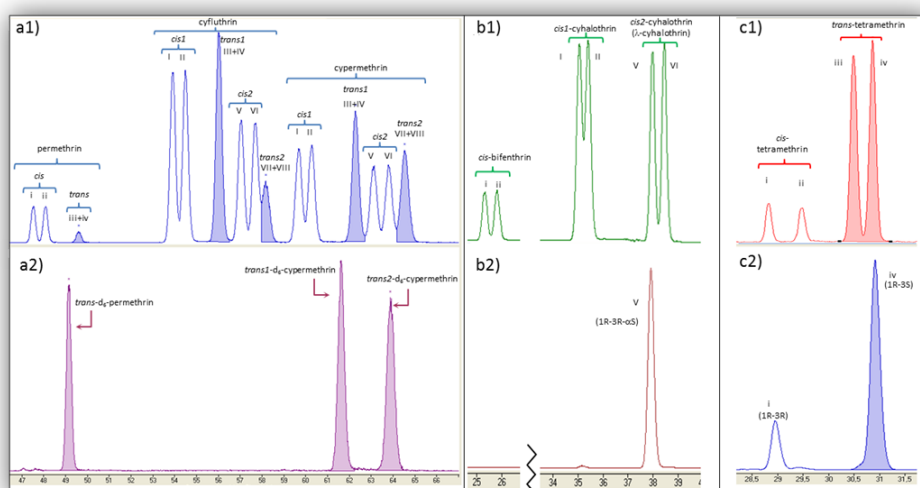
Publicació 1:

Enantiomeric-selective determination of pyrethroids: application to human samples

Cayo Corcellas ; Ethel Eljarrat ; Damià Barceló

Analytical and Bioanalytical Chemistry (2014)

IF: 3,436



Enantiomeric-selective determination of pyrethroids: application to human samples

Cayo Corcellas · Ethel Eljarrat · Damià Barceló

Received: 29 January 2014 / Revised: 31 March 2014 / Accepted: 15 May 2014
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2014

Abstract Recently, some works point out the bioaccumulation of pyrethroids in humans. Given the chiral properties of pyrethroids, our goal in this work was to develop a gas chromatography (GC)-MS-MS methodology for the enantioselective analysis of six common pyrethroids. For the first time, we separate the enantiomers of bifenthrin, cyhalothrin, cyfluthrin, cypermethrin, permethrin and tetramethrin in a single analysis of less than 75 min and with resolutions greater than 0.58 in all cases. The developed method proved to be reproducible (with relative standard deviations under 3 %) and sensitive (with instrumental limits of detection from 4 to 49 fg) enough to evaluate the enantiomeric distribution of these pyrethroids. The developed methodology was applied to commercial insecticides and human breast milk samples. Some potential selective bioaccumulation for cyhalothrin, cyperpermethrin and tetramethrin was described in humans.

Keywords Cyhalothrin · Cypermethrin · Human breast milk · Insecticides · Pyrethroid · Tetramethrin

Published in the topical collection celebrating *ABCs 13th Anniversary*.

Electronic supplementary material The online version of this article (doi:10.1007/s00216-014-7905-6) contains supplementary material, which is available to authorized users.

C. Corcellas · E. Eljarrat (✉) · D. Barceló
Water and Soil Quality Research Group, Department of
Environmental Chemistry, IDAEA-CSIC, Jordi Girona 18-26,
08034 Barcelona, Spain
e-mail: eeeqam@cid.csic.es

D. Barceló
Catalan Institute for Water Research (ICRA), H2O Building,
Scientific and Technological Park of the University of Girona, Emili
Grahit 101, 17003 Girona, Spain

Introduction

Pyrethroids are synthetic or semisynthetic compounds related to the natural insecticides pyrethrins. Traditionally, pyrethroids have been classified in two groups depending on their structure: type I and type II, where the difference is an additional cyano group in type II (see Fig. 1). The use of both types as pesticides is extensive around the world. For instance, they are commonly used in agronomics (on both crops and stored grain) and with veterinarian purposes. Additionally, they find much use as domestic insecticides for public health aims against scabies, lice and even against vectors of some diseases, such as malaria or typhus. Therefore, their presence in the environment is not strange because of these several uses. Recent works point out this ubiquity in the environment [1, 2], even in edible vegetables [3]. Moreover, some authors have already published works showing the presence of pyrethroids in biotic samples, such as dolphins [4], but as well in human matrices, i.e. blood [5] and milk [6–8].

Usually, pyrethroids are chiral compounds. Generally, they have two or three chiral centres depending on the type of pyrethroid (Table 1). Therefore, type I pyrethroids commonly present two diastereoisomers (or enantiomeric pairs) and type II tends to have four. Isomerism is an important property of a lot of common compounds. It is known that most of the physical and chemical behaviours of isomers are identical. However, different biological activities depending on the isomer studied were also identified [9]. That fact would entail, for example, isomeric-selective biodegradation, bioaccumulation or even biomagnification. Recently, some studies showed different toxicology of the same pyrethroid depending on the enantiomer [10, 11]. However, until today, few studies have described the isomeric behaviour of pyrethroids, and less have discussed about their enantiomeric properties in real environmental and biological samples. Feo et al. [12] and Corcellas et al. [8] included some isomeric characterization in their

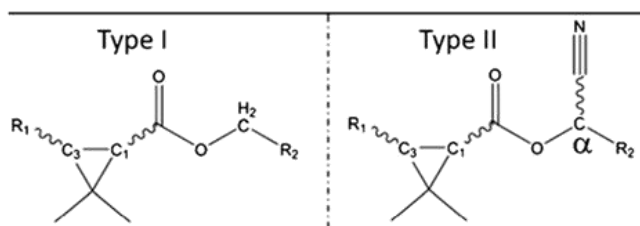


Fig. 1 Typical structure of pyrethroids classified by types I and II

studies about pyrethroids in human breast milk; concretely, they described the diastereoisomeric distribution for some pyrethroids. Liu and Gan [13] and Kuang et al. [3] quantified enantiomers of permethrin and cypermethrin from water and tea, respectively.

Lately, many studies focus on the isomeric separation (concretely in the enantiomeric separation) of pollutants and pesticides given the potential different properties in toxicity, degradation and accumulation. For example, persistent organic pollutants in the environment [14, 15], human tissues [16] and even human breast milk [17–19] have been largely studied. Moreover, some authors have taken into account not only the presence of these chiral pollutants in human samples but also their metabolites [20].

In the literature, there were only two enantioselective methodologies developed based on gas chromatography (GC). Both of them used the same chromatographic column because it showed to be the better choice. The first method was optimized for *cis*-bifenthrin and *cis*-permethrin [13], while

the second one for cyfluthrin and cypemethrin [21]. However, this last method takes more than 150 min to obtain good resolved peaks. Because of the difficulty of resolving pyrethroid enantiomers by GC, a large number of authors prefer to work with LC–MS [22, 23] or even with micellar electrokinetic chromatography [24] despite their higher limits of detection (LODs).

With this background, the objective of the present study was to develop a new GC method in order to separate and determine simultaneously the different enantiomers of six pyrethroids (bifenthrin, cyhalothrin, cyfluthrin, cypermethrin, permethrin and tetramethrin). For the first time, the enantiomeric separation of tetramethrin and cyhalothrin will be studied. Once the method will be optimized, it will be applied to the determination of enantiomers in real samples, including some commercial insecticides and human breast milk samples.

Material and methods

Standards and reagents

All standards were purchased from Dr. Ehrenstorfer (Augsburg, Germany). They include *cis*-bifenthrin, cyhalothrin, *l*-cyhalothrin, cyfluthrin, cypermethrin, permethrin and tetramethrin. Solid-phase extraction (SPE) cartridges, C18 (2 g/15 mL) and basic alumina (5 g/25 mL) were obtained

Table 1 Description of the pyrethroids studied and summary of chromatography achievements

| Pyrethroid | Structure | Pyrethroid Type | Chiral centres | Enantiomeric pairs ^a | | Peaks described before | Peaks in this work | Observations |
|--------------|-----------|-----------------|----------------|--|--|------------------------|--------------------|---|
| | | | | <i>cis</i> | <i>trans</i> | | | |
| Bifenthrin | | I | 2 | <i>cis</i> (1R,3R; 1S,3S) | <i>trans</i> (1R,3S; 1S,3R) | 2 | 2 | <i>trans</i> - isomers were not analysed |
| Cyhalothrin | | II | 3 | <i>cis</i> 1 (1R,3R- α R; 1S,3S- α S) <i>cis</i> 2 (1R,3R- α S; 1S,3S- α R) | <i>trans</i> 1 (1R,3S- α R; 1S,3R- α S) <i>trans</i> 2 (1S,3R- α R; 1R,3S- α S) | - | 4 | <i>trans</i> - isomers were not analysed |
| Cypermethrin | | II | 3 | <i>cis</i> 1 (1R,3R- α R; 1S,3S- α S) <i>cis</i> 2 (1R,3R- α S; 1S,3S- α R) | <i>trans</i> 1 (1R,3S- α R; 1S,3R- α S) <i>trans</i> 2 (1S,3R- α R; 1R,3S- α S) | 6 | 6 | <i>trans</i> - enantiomers were not separated |
| Cyfluthrin | | II | 3 | <i>cis</i> 1 (1R,3R- α R; 1S,3S- α S) <i>cis</i> 2 (1R,3R- α S; 1S,3S- α R) | <i>trans</i> 1 (1R,3S- α R; 1S,3R- α S) <i>trans</i> 2 (1S,3R- α R; 1R,3S- α S) | 6 | 6 | <i>trans</i> - enantiomers were not separated |
| Permethrin | | I | 2 | <i>cis</i> (1R,3R; 1S,3S) | <i>trans</i> (1R,3S; 1S,3R) | 3 | 3 | <i>trans</i> -enantiomers were not separated |
| Tetramethrin | | I | 2 | <i>cis</i> (1R,3R; 1S,3S) | <i>trans</i> (1R,3S; 1S,3R) | - | 4 | |

^a Diastereoisomers are named as *cis* and *trans* for type I pyrethroids and *cis*1, *cis*2 and *trans*1, *trans*2 for type II pyrethroids. The exact chirality of both enantiomers of each diastereoisomer is described in parenthesis, following Fig. 1 nomenclature

from Isolute Biotage and Interchim, respectively. Organic solvents were obtained from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Standard solutions were prepared in ethyl acetate. Calibration curves ranged from 1 to 100 ng mL⁻¹.

GC-NCI-MS-MS analyses

The GC instrument was an Agilent Technologies 7890A coupled to a 7000A GC/MS Triple Quad (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA). As regards the chromatographic conditions, we selected a BGB-172 (20 % *tert*-butyldimethylsilyl- β -cyclodextrin dissolved in 15 % phenyl-, 85 %-methylpolysiloxane) of 30 m \times 0.25 mm and a column with 0.25 μ m of film thickness (BGB Analytik, Switzerland). Previously, Liu and Gan [21] showed that this chromatographic column was the best one for the enantiomeric separation of pyrethroids. The carrier gas was helium at 1.5 mL min⁻¹ of constant flow. This means an average velocity of 47.1 cm s⁻¹. The GC was operating in the splitless mode during 0.8 min with an inlet temperature of 270 °C.

For the enantiomeric separation, the temperature program was optimized, starting from 160 to 230 °C, and modifying slopes and remaining times. The optimal temperature program was as follows. The initial temperature was selected at 180 °C and held for 2 min. Then, the temperature was increased up to 220 °C remaining for 30 min. After that, the temperature was increased till 230 °C and held for 25 min. Finally, the temperature was ramped at 240 °C for 5 min more. The total analysis time was 74 min. All temperature ramps were at 5 °C min⁻¹, which was the maximum allowed by the chiral column used.

As regards the mass spectrometric parameters, we applied those previously optimized by Feo et al. [7] for the same instrument. The selected ionization mode was negative chemical ionization (NCI). The ion source temperature was 250 °C, and ammonia was the reagent gas at 2.04×10^{-4} torr. Additional information related to selected transitions and collision energies could be found in the previous publication.

Enantiomeric factor and diastereoisomeric ratio

The enantiomeric factor (EF) is defined as the proportion of one enantiomer per unit (Eq. 1) [25].

$$EF = A_i / A_T \quad (1)$$

where A_i is the area of the selected enantiomer (in this work, the selected enantiomer is always the first eluting), and A_T is the sum of areas of both enantiomers. In the present work, we defined an EF for each enantiomeric pair: EF^{cis} and EF^{trans} for type I pyrethroids, and EF^{cis1}, EF^{cis2}, EF^{trans1} and EF^{trans2}

for type II pyrethroids. A racemic mixture of enantiomers is always represented by an EF equal to 0.5.

Moreover, we also defined similar useful factors to compare diastereoisomers. First of all, we defined the $R_{cis/trans}$, which is just the ratio between the *cis*- and *trans*-isomers of the same pyrethroid. In the case of type II pyrethroids, this relationship is defined by the ratio $(cis1 + cis2) / (trans1 + trans2)$. However, for the type II pyrethroids, we can also establish another factor: the $R_{cis1/cis2}$, defined as the proportion of the isomer *cis1* with respect to the isomer *cis2*. Analogously, $R_{trans1/trans2}$ is defined as the proportion of the isomer *trans1* with respect to the isomer *trans2*.

Quality assurance

In order to evaluate our developed method, some tests were done. First of all, precision of the method was determined by repeated intra- (three consecutive injections) and inter-day (four consecutive days) analyses. Moreover, the reproducibility of EF values was also checked at five different concentration levels, ranging between 4 and 104 ppb of each analyte in the vial. Finally, the LOD of each enantiomer was defined as three times the noise level.

Sample collection and preparation

In 2009, seven human breast milk samples were collected under a signed donor consent. Mothers were from the metropolitan area of Barcelona (Spain) and corresponded always to the first or second time of breast-feeding. The breast milk (between 10 and 50 mL) was collected either by use of a breast pump or by hand-expressing the milk into pre-washed glass containers. Previously, blanks of this material proved the absence of pyrethroids on it. After milk collection, samples were frozen at -20 °C, lyophilized, homogenized and stored at -20 °C in pre-washed glass containers until analysis in the laboratory. Extraction were carried out by sonication with hexane:dichloromethane (2:1) with a following cleanup step consisting in two SPE in tandem with basic alumina and C18 cartridges, in the order indicated, using acetonitrile as eluent [8]. The eluted was evaporated with N₂ stream and reconstituted with 50 μ L of ethyl acetate.

Moreover, we analyse eight domestic insecticides, one pet insecticide solution and one human skin cream against crabs and scabies. All the commercial insecticides were purchased in a regular supermarket. Their formulation includes any of the studied pyrethroids, e.g. tetramethrin, permethrin and cypermethrin, but none of them contains bifenthrin, cyhalothrin or cyfluthrin. The Electronic Supplementary Material Table S1 summarizes some relevant information of these samples. For their enantiomeric evaluation, aliquots of each product were qualitatively added in a vial, evaporated under N₂ and resolved in ethyl acetate. For the skin cream, a simple

liquid-liquid extraction was directly carried out with ethyl acetate and diluted with the same solvent. Recoveries for the human breast milk samples were checked by spiking infant formula milk with standards. They ranged from 48 ± 8 % to 100 ± 7 % with a mean recovery of 72 ± 17 %. The non-isomero-specific behaviour of the sample preparation was carefully confirmed for each pyrethroid.

Results and discussion

Chromatographic separation

Results about chromatographic achievements are summarized in Table 1. Four of the selected pyrethroids were already been enantiomerically separated before [13, 21]. Generally, our method obtained similar separations to those described in the bibliography. This implied that chromatograms from type I pyrethroids showed three peaks corresponding to the two enantiomers from *cis*-stereoisomer and one peak corresponding to the mixture of the two *trans*-enantiomers. For type II pyrethroids, there were two *cis*- and two *trans*-enantiomeric pairs. This chromatography allowed to separate all *cis*-enantiomers (two pairs, four peaks), but for *trans*-isomers, the enantiomeric separation was not possible, and we obtained two peaks corresponding each one to each pair.

Results were different for the other two pyrethroids we added for the first time in our study (Fig. 2). In the case of cyhalothrin, a type II pyrethroid, our standard presented only the two *cis*-isomers. As predicted, they were enantiomerically separated in four peaks following the same pattern than cyfluthrin and cypermethrin. For tetramethrin, a type I pyrethroid, the same behaviour of permethrin or bifenthrin was supposed, with the separation of *cis*-enantiomers but coelution of *trans*-enantiomers. However, with our method, we could separate all of its four enantiomers, including also the *trans*-ones. It is the first time that a chromatographic method is able to separate the *trans*-enantiomers, leading to a total separation of all the enantiomers for a selected pyrethroid.

Figure 2 shows the different peaks obtained for each pyrethroid and their assignment. For *cis*-bifenthrin, cyfluthrin, cypermethrin and permethrin, the correspondence of peaks was done following the works of Liu and Gan [13, 21]. The assignment of *trans*-permethrin and *trans*-cypermethrin was corroborated with our labelled standards (Fig. 2(a)). Cyfluthrin peak assignment was checked by comparing the abundance peak proportions of β -cyfluthrin (it is known that this commercial mixture was enriched in *cis2* and *trans2* diastereoisomers). For cyhalothrin, as mentioned before, our standard presented only the two *cis*-isomers. Additionally, with the λ -cyhalothrin standard, we can assign the enantiomeric pair corresponding to λ -cyhalothrin (*cis2*

diastereoisomer), and thus, the other two peaks must correspond to *cis1*. Moreover, and with another standard (γ -cyhalothrin), we could make the assignment of γ -cyhalothrin (1R-3R- α S-isomer). So, we prove that the enantiomeric elution order in all type II pyrethroids was always the same. If it was so, we could suppose that *trans1* and *trans2* cyhalothrin diastereoisomer peaks would appear at retention times around 37 (just before the elution of *cis2*) and 38.5 min (just after the elution of *cis2*), respectively, in the Fig. 2(b).

Knowing the composition of our standards, the first couple of peaks of tetramethrin corresponded to the *cis*-enantiomers and the second pair to the *trans*. Additionally, we could assign the 1R-enantiomer peaks with the d-tetramethrin standard (Fig. 2(c)). We observed the same elution pattern for *cis*-isomers as bifenthrin and permethrin, so we also could assume that all type I pyrethroid should have the same elution order.

Quality parameters

Precision of the method was determined by repeated intra- (three consecutive injections) and inter-day (four consecutive days) analysis of standards. Table 2 shows the mean EF for each pyrethroid and its standard deviation (SD). All relative SD (RSD) values are lower than 2 %, indicating the acceptable reproducibility of our method. For type I pyrethroids, we defined EF_{cis} as the proportion of (1R-3R) in the enantiomeric pair *cis* (1R-3R, 1S-3S) following Eq. 1. With the same equation, we named EF_{trans} as the fraction of the first eluting *trans*-enantiomer of tetramethrin in the pair *trans* (1R-3S, 1S-3R). On the other hand, for type II pyrethroids, EF_{cis1} corresponds to the proportion of (1R-3R- α R) in the enantiomeric pair *cis1* (1R-3R- α R, 1S-3S- α S). Finally, EF_{cis2} corresponds to the proportion of (1R-3R- α S) in the enantiomeric pair *cis2* (1R-3R- α S, 1S-3S- α R).

EF variation with the concentration level of pyrethroids was also been studied. Table 2 shows the EF values calculated for a concentration range between 4 and 104 ppb, too. In this case, RSD values were always below 3 %, indicating the applicability of our method in the concentration range studied.

Moreover, we calculate the instrumental LOD as well as the resolution (R_s) obtained for each enantiomeric pair (Table 3) calculated as follows:

$$R_s = \frac{t_{R2} - t_{R1}}{\frac{\Delta w}{2}} \quad (2)$$

where t_{Ri} is the retention time and Δw is the wide of the two peaks.

Resolutions were upper than 0.58 in all cases. As regards the sensitivity of the method, our instrumental LODs ranged from 4 to 49 fg injected, being tetramethrin the less sensitive.

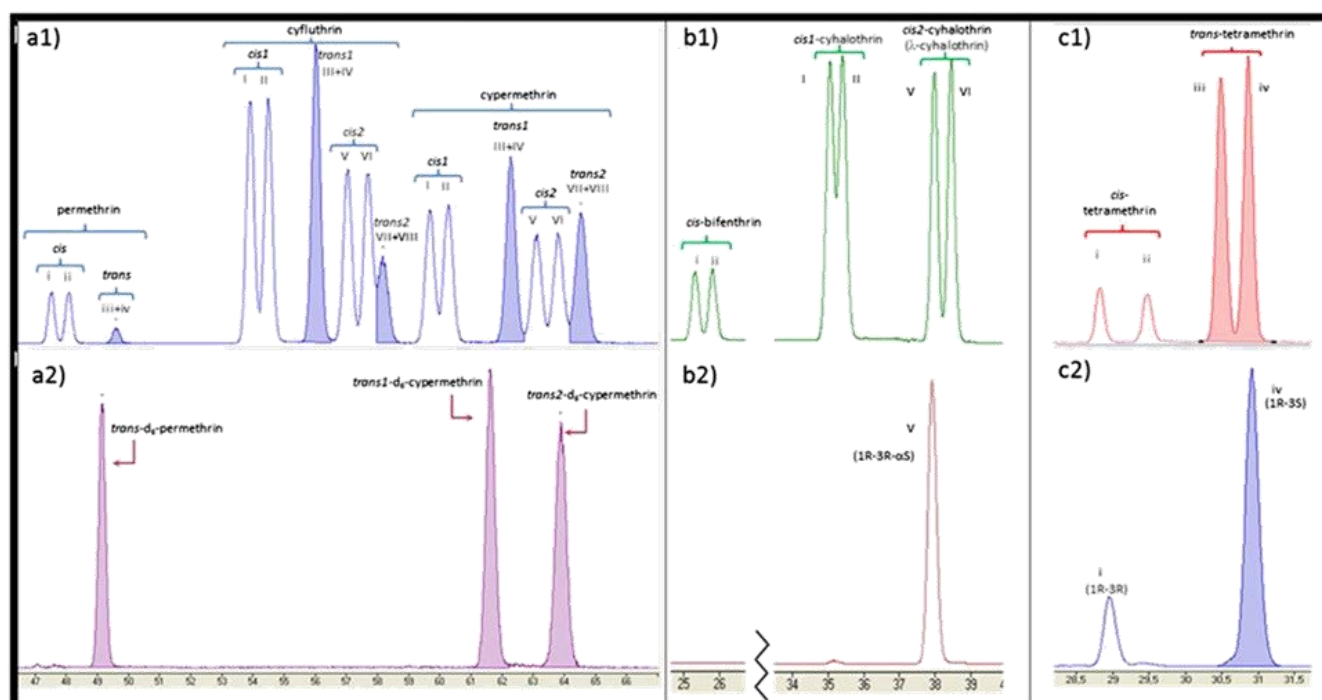


Fig. 2 Peak assignment (all *trans*-isomers are shaded): *I*, 1R-3R- α R; *II*, 1S-3S- α S; *III*, 1S-3R- α S; *IV*, 1R-3S- α R; *V*, 1R-3R- α S; *VI*, 1S-3S- α R; *VII*, 1R-3S- α S; *VIII*, 1S-3R- α R. *i*, 1R-3R; *ii*, 1S-3S; *iii*, 1S-3R; *iv*, 1R-3S. (a1) (Transition, 207 \rightarrow 35) permethrin, cyfluthrin and cypermethrin;

(a2) (transition, 213 \rightarrow 35) isotopically labelled *trans*-permethrin and *trans*-cypermethrin; (b1) (transition, 205 \rightarrow 141) *cis*-bifenthrin and *cis*-cyhalothrin; (b2) (transition, 205 \rightarrow 141) *trans*-cyhalothrin; (c1) (transition, 331 \rightarrow 167) tetramethrin; (c2) d-tetramethrin

As expected, when chiral and achiral methodologies are compared, our LOD values were higher than those obtained by Feo et al. [1] in their achiral methodology. However, the sensitivity obtained in our chiral method is still appropriate for the determination of pyrethroids in real samples such as human breast milk samples.

Application to real samples

The developed chiral method was applied to the analysis of commercial insecticides and human breast milk samples.

Single results of these analyses were summarized in the Electronic Supplementary Material Table S2.

Enantiomeric discussion

Different EF values were calculated for commercial insecticides and human breast milk samples. Even when there was no evidence of the source of contamination of these breast milk samples, a simple comparison among their enantiomeric ratios was done, just in order to describe different behaviours. The intention was to know the enantiomeric pattern in the

Table 2 Reproducibility of EF values

| Pyrethroid (type) | Inter-day ($n=4$) | | | Intra-day ($n=3$) | | | Concentration level ($n=5$) | | |
|----------------------------|-------------------------------------|--------------------|---------------------|-------------------------------------|--------------------|---------------------|-------------------------------------|--------------------|---------------------|
| | EF _{cis/cis1} ^a | EF _{cis2} | EF _{trans} | EF _{cis/cis1} ^a | EF _{cis2} | EF _{trans} | EF _{cis/cis1} ^a | EF _{cis2} | EF _{trans} |
| <i>cis</i> -Bifenthrin (I) | 0.495 \pm 0.005 | – | – | 0.494 \pm 0.002 | – | – | 0.513 \pm 0.011 | – | – |
| Cyfluthrin (II) | 0.483 \pm 0.014 | 0.489 \pm 0.014 | – | 0.482 \pm 0.009 | 0.485 \pm 0.013 | – | 0.501 \pm 0.006 | 0.504 \pm 0.016 | – |
| Cyhalothrin (II) | 0.492 \pm 0.001 | 0.496 \pm 0.005 | – | 0.492 \pm 0.013 | 0.494 \pm 0.008 | – | 0.492 \pm 0.001 | 0.495 \pm 0.001 | – |
| Cypermethrin (II) | 0.485 \pm 0.006 | 0.505 \pm 0.005 | – | 0.482 \pm 0.005 | 0.507 \pm 0.003 | – | 0.478 \pm 0.008 | 0.510 \pm 0.010 | – |
| Permethrin (I) | 0.501 \pm 0.004 | – | – | 0.500 \pm 0.001 | – | – | 0.502 \pm 0.007 | – | – |
| Tetramethrin (I) | 0.482 \pm 0.009 | – | 0.498 \pm 0.005 | 0.489 \pm 0.010 | – | 0.494 \pm 0.005 | 0.498 \pm 0.002 | – | 0.500 \pm 0.015 |

^a This EF corresponds to EF_{cis} for type I pyrethroids and EF_{cis1} for type II

Table 3 Quality parameters (detection limits and chromatographic resolution) of the developed chromatographic method

| | LOD (fg) | | | | | | Rs ^b | |
|------------------------|------------------------------------|----------|------------------|----|----|----------|-----------------|------------|
| | Present chiral method ^a | | | | | | | |
| | I i | II ii | III+IV iii+iv | V | VI | VII+VIII | | |
| <i>cis</i> -Bifenthrin | 13 | 13 | – | – | – | – | 0.18 | 0.74 |
| Cyfluthrin | 4 | 4 | 3 | 4 | 4 | 5 | 1.99 | 0.77; 0.98 |
| Cyhalothrin | 12 | 12 | – | 4 | 4 | – | 0.18 | 0.58; 0.90 |
| Cypermethrin | 7 | 6 | 7 | 5 | 6 | 7 | 1.84 | 0.85; 0.90 |
| Permethrin | 30 | 30 | 17 | – | – | – | 9.9 | 0.89 |
| Tetramethrin | 49 | 47 | 49 | 49 | – | – | 15.5 | 1.21; 0.87 |

^a See Fig. 2 for peak nomenclature

^b The resolution (Rs) is given in the elution order when more than one enantiomeric pair was separated

different kinds of matrices. Enantiomeric results are graphically represented in Fig. 3. Type I and type II pyrethroids are differentiated as subpanels a and b of Fig. 3, respectively.

Firstly, we tested our analytical standards, and we verify that all standards are racemic (EF value of 0.50). Then, we tested some commercial mixtures of pyrethroids. These domestic insecticides contain tetramethrin in racemic mixtures for the two pairs of enantiomers, cypermethrin in racemic mixtures for *cis*-isomers and permethrin in non-racemic mixtures of *cis*-isomers, with EF_{*cis*} values ranging between 0.35 and 0.38 and showing the enrichment of the (1S-3S)-enantiomer.

Finally, we analyzed seven human breast milk samples. It was easy to describe a racemic behaviour for *cis*-bifenthrin in all seven samples with a mean EF_{*cis*} value of 0.47 and a SD of 0.09 (RSD of 19%). Mean value of EF for *cis*-permethrin was 0.43±0.02, in contrast of the EF_{*cis*} value of 0.35±0.04 obtained in commercial insecticides. This indicated a higher concentration of the first eluting enantiomer in breast milk, which would mean a higher accumulation of (1R-3R)-permethrin. For *cis*-tetramethrin, both commercial insecticides and breast milk samples showed racemic mixtures (EF_{*cis*}=0.53±0.06 and 0.51±0.01, respectively). However, in the case of *trans*-tetramethrin, the second eluting enantiomer was more

abundant than the first one in human milk samples. Concretely, EF_{*trans*} values ranged from 0.15 to 0.40, with a mean value of 0.32.

On the other hand, type II pyrethroids showed different enantiomeric patterns depending on the EF studied. In the case of cyhalothrin, only the enantiomeric pair known as λ-cyhalothrin (EF_{*cis2*}) was abundant enough to be discussed in breast milk samples. The enantiomer (1S-3S-αR) seemed to show more abundance in the cyhalothrin mixture (EF_{*cis2*}=0.20±0.12) for human samples. In the case of cypermethrin, the EF_{*cis1*} value (0.45±0.09) indicated no significant difference to the racemic standard neither to the commercial insecticides. Nonetheless, EF_{*cis2*} showed a different behaviour. Its value in human milk samples ranged from 0.15 to 0.35. It was clearly lower than the commercial insecticide which presented a value of 0.50±0.01. These results pointed to a potential selective bioaccumulation of the (1S-3S-αR) enantiomer in the human samples. Cyfluthrin was never detected at quantifiable levels in any human sample.

Diastereoisomeric discussion

Previous works described diastereoisomeric distribution for some type I pyrethroids in breast milk [12, 8]. Even so, for

Fig. 3 Mean EF of the analysed pyrethroids in breast milk samples, commercial insecticides and standards used for the analyses. They are classified in **a** type I pyrethroids and **b** type II ones

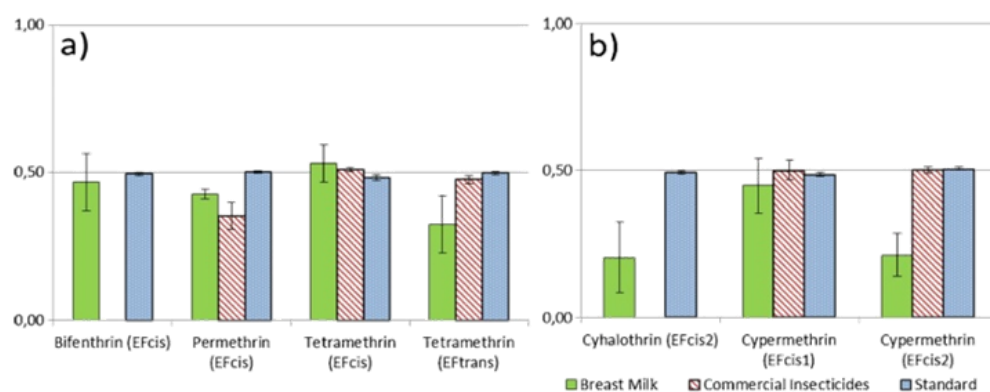
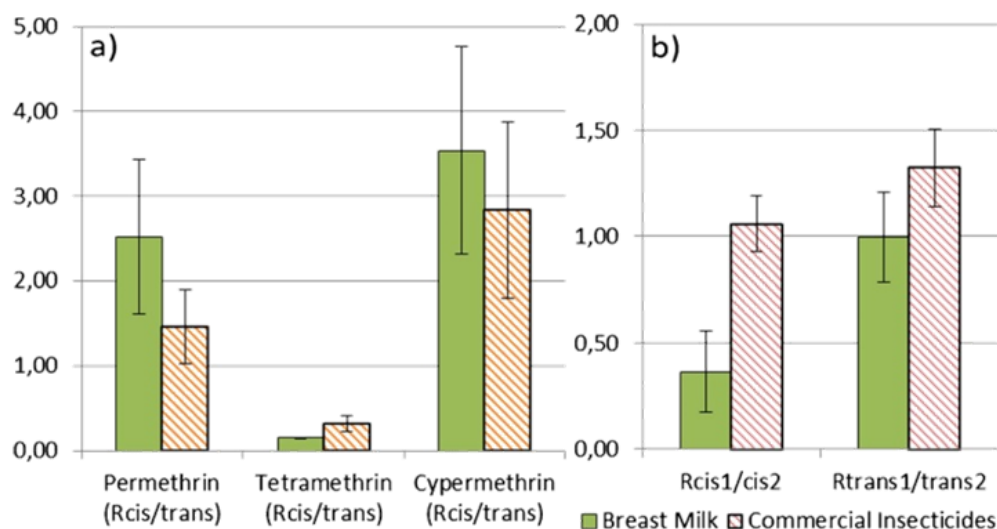


Fig. 4 Diastereoisomeric results. **a** $R_{c/t}$. **b** $R_{cis1/cis2}$ and $R_{trans1/trans2}$ of cypermethrin



type II pyrethroids, our work is the first one in which the diastereoisomeric proportion was completely calculated.

As can be seen in Fig. 4, $R_{c/t}$ for permethrin was 2.52 ± 0.91 in breast milk samples. However, for the commercial insecticides, this parameter ranged from 1.03 to 2.09. That could point out a possible selective accumulation of *cis*-isomers in human samples. By contrast, for tetramethrin, the $R_{c/t}$ values were similar for both breast milk samples and commercial mixtures, being 0.15 ± 0.01 and 0.32 ± 0.09 , respectively. Finally, *cis*-cypermethrin isomers were more abundant than *trans*- in both breast milk and commercial insecticides ($R_{c/t}$ of 3.54 ± 1.22 and 2.84 ± 1.04 , respectively).

Since cypermethrin is a type II pyrethroid, it made sense to calculate also $R_{cis1/cis2}$ and $R_{trans1/trans2}$. Figure 4b shows these factors. It was easy to see that contribution of *cis2*-isomer is twice the abundance of any other isomer in breast milk samples. Given that in commercial mixtures both *cis*-isomers seemed to be used in the same proportions, these results could point out a selective bioaccumulation in humans.

Conclusions

Our goal in this work was to develop an enantiomeric separation method of some of the most common pyrethroids. At the moment, published methods were optimized for only a couple of pyrethroids at a time, while our methodology allows the separation of enantiomers of six different pyrethroids in one single run. Moreover, the analysis time was strongly reduced. After the optimization of initial temperature and slopes, our analytical method is completed in 74 min, while published works took at least 150 min [21].

Moreover, the developed method proved to be reproducible and sensitive enough to evaluate the enantiomeric distribution of these pyrethroids in commercial insecticides and even in

human breast milk samples. Some enantiomeric and diastereoisomeric differences were described between commercial insecticides and human breast milk samples. This behaviour could indicate a potential human trend to accumulate preferably one specific enantiomer and diastereoisomer. However, it should be noted that very few human breast milk samples were analysed in our study. So, these tendencies need to be further studied using a great number of samples in order to be confirmed.

Acknowledgments This work has been supported by the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness through the project Consolider-Ingenio (2010 CSD2009-00065). This work has also been partly funded by the Generalitat de Catalunya (Consolidated Research Group Water and Soil Quality Unit 2009-SGR-965). Biotage is acknowledged for SPE cartridges.

References

1. Feo ML, Eljarrat E, Barcelo D (2010) Determination of pyrethroid insecticides in environmental samples. *TraC Trends Anal Chem* 29(7):692–705. doi:10.1016/j.trac.2010.03.011
2. Weston DP, Lydy MJ (2010) Urban and agricultural sources of pyrethroid insecticides to the Sacramento-San Joaquin Delta of California. *Environ Sci Technol* 44(5):1833–1840. doi:10.1021/es9035573
3. Kuang H, Hong M, Hou XL, Zhao YF, Shen JZ, Wu YN (2010) Determination of enantiomeric fractions of cypermethrin and cis-bifenthrin in Chinese teas by GC/ECD. *J Sci Food Agric* 90(8):1374–1379. doi:10.1002/jsfa.3934
4. Alonso MB, Feo ML, Corcellas C, Vidal LG, Bertozzi CP, Marigo J, Secchi ER, Bassoi M, Azevedo AF, Domeles PR, Torres JPM, Lailson-Brito J, Malm O, Eljarrat E, Barcelo D (2012) Pyrethroids: a new threat to marine mammals? *Environ Int* 47:99–106. doi:10.1016/j.envint.2012.06.010
5. Channa KR, Roellin HB, Wilson KS, Nost TH, Odland JO, Naik I, Sandanger TM (2012) Regional variation in pesticide concentrations in plasma of delivering women residing in rural Indian Ocean coastal

- regions of South Africa. *J Environ Monit* 14(11):2952–2960. doi:10.1039/c2em30264k
6. Zehring M, Hermann A (2001) Analysis of polychlorinated biphenyls, pyrethroid insecticides and fragrances in human milk using a laminar cup liner in the GC injector. *Eur Food Res Technol* 212(2): 247–251. doi:10.1007/s002170000223
 7. Feo ML, Eljarrat E, Barcelo D (2011) Performance of gas chromatography/tandem mass spectrometry in the analysis of pyrethroid insecticides in environmental and food samples. *Rapid Commun Mass Spectrom* 25(7):869–876. doi:10.1002/rcm.4936
 8. Corcellas C, Feo ML, Paulo Torres J, Malm O, Ocampo-Duque W, Eljarrat E, Barcelo D (2012) Pyrethroids in human breast milk: occurrence and nursing daily intake estimation. *Environ Int* 47:17–22. doi:10.1016/j.envint.2012.05.007
 9. Hegeman WJM, Laane R (2002) Enantiomeric enrichment of chiral pesticides in the environment. *Rev Environ Contam Toxicol* 173(173):85–116
 10. Jin Y, Liu J, Wang L, Chen R, Zhou C, Yang Y, Liu W, Fu Z (2012) Permethrin exposure during puberty has the potential to enantioselectively induce reproductive toxicity in mice. *Environ Int* 42:144–151. doi:10.1016/j.envint.2011.05.020
 11. Lu X (2013) Enantioselective effect of bifenthrin on antioxidant enzyme gene expression and stress protein response in PC12 cells. *J Appl Toxicol* 33(7):586–592. doi:10.1002/jat.1774
 12. Feo ML, Eljarrat E, Manaca MN, Dobano C, Barcelo D, Sunyer J, Alonso PL, Menendez C, Grimalt JO (2012) Pyrethroid use-malaria control and individual applications by households for other pests and home garden use. *Environ Int* 38(1):67–72. doi:10.1016/j.envint.2011.08.008
 13. Liu WP, Gan JJ (2004) Determination of enantiomers of synthetic pyrethroids in water by solid phase microextraction-enantioselective gas chromatography. *J Agric Food Chem* 52(4):736–741. doi:10.1021/jf035276f
 14. Badea S-L, Vogt C, Gehre M, Fischer A, Danet A-F, Richnow H-H (2011) Development of an enantiomer-specific stable carbon isotope analysis (ESIA) method for assessing the fate of alpha-hexachlorocyclohexane in the environment. *Rapid Commun Mass Spectrom* 25(10):1363–1372. doi:10.1002/rcm.4987
 15. Kurt-Karakus PB, Stroud JL, Bidleman T, Semple KT, Jantunen L, Jones KC (2007) Enantioselective degradation of organochlorine pesticides in background soils: variability in field and laboratory studies. *Environ Sci Technol* 41(14):4965–4971. doi:10.1021/es0620787
 16. Chu SG, Covaci A, Schepens P (2003) Levels and chiral signatures of persistent organochlorine pollutants in human tissues from Belgium. *Environ Res* 93(2):167–176. doi:10.1016/s0013-9351(03)00016-1
 17. Eljarrat E, Guerra P, Martinez E, Farre M, Alvarez JG, Lopez-Tejion M, Barcelo D (2009) Hexabromocyclododecane in human breast milk: levels and enantiomeric patterns. *Environ Sci Technol* 43(6): 1940–1946. doi:10.1021/es802919e
 18. Bordajandi LR, Abad E, Jose Gonzalez M (2008) Occurrence of PCBs, PCDD/Fs, PBDEs and DDTs in Spanish breast milk: enantiomeric fraction of chiral PCBs. *Chemosphere* 70(4):567–575. doi:10.1016/j.chemosphere.2007.07.019
 19. Glausch A, Hahn J, Schurig V (1995) Enantioselective determination of chiral 2,2',3,3',4,6'-hexachlorobiphenyl (PCB-132) in human-milk samples by multidimensional gas-chromatography electron-capture detection and by mass-spectrometry. *Chemosphere* 30(11):2079–2085. doi:10.1016/0045-6535(95)00085-m
 20. Eljarrat E, Guerra P, Barcelo D (2008) Enantiomeric determination of chiral persistent organic pollutants and their metabolites. *TraC Trends Anal Chem* 27(10):847–861. doi:10.1016/j.trac.2008.08.010
 21. Liu WP, Gan JJ (2004) Separation and analysis of diastereomers and enantiomers of cypermethrin and cyfluthrin by gas chromatography. *J Agric Food Chem* 52(4):755–761. doi:10.1021/jf035179m
 22. Sanchez FG, Diaz AN, Pareja AG (1996) Enantiomeric resolution of pyrethroids by high-performance liquid chromatography with diode-laser polarimetric detection. *J Chromatogr A* 754(1–2):97–102
 23. Ye J, Wu J, Liu WP (2009) Enantioselective separation and analysis of chiral pesticides by high-performance liquid chromatography. *TraC Trends Anal Chem* 28(10):1148–1163. doi:10.1016/j.trac.2009.07.008
 24. Perez-Fernandez V, Angeles Garcia M, Luisa Marina M (2010) Enantiomeric separation of cis-bifenthrin by CD-MEKC: quantitative analysis in a commercial insecticide formulation. *Electrophoresis* 31(9):1533–1539. doi:10.1002/elps.200900718
 25. Harner T, Wiberg K, Norstrom R (2000) Enantiomer fractions are preferred to enantiomer ratios for describing chiral signatures in environmental analysis. *Environ Sci Technol* 34(1):218–220. doi:10.1021/es9906958

Analytical and Bioanalytical Chemistry

Electronic Supplementary Material

Enantiomeric-selective determination of pyrethroids: application to human samples

Cayo Corcellas, Ethel Eljarrat, Damià Barceló

Table S1 Information about the analysed commercial insecticides (data about other substances not involved in this work is not included)

| Insecticides | Used for | Composition | | | | | |
|--------------|---------------------------------------|-------------|--------------|------------|-------------|------------|--------------|
| | | Bifenthrin | Tetramethrin | Permethrin | Cyhalothrin | Cyfluthrin | Cypermethrin |
| 1 | Mites | - | 0.10% | 0.10% | - | - | - |
| 2 | Beetles and ants | - | - | - | - | - | 0.10% |
| 3 | Beetles and ants | - | - | - | - | - | 0.10% |
| 4 | Home and indoors | - | 0.35% | - | - | - | - |
| 5 | Beetles | - | 0.28% | - | - | - | - |
| 6 | Flies and mosquitoes | - | 0.20% | - | - | - | - |
| 7 | Pet insecticide | - | - | 0.24% | - | - | - |
| 8 | Flying insects | - | 0.20% | 0.10% | - | - | - |
| 9 | Home | - | 0.20% | 0.05% | - | - | - |
| 10 | Beetles, ants and flying insects | - | - | 0.25% | - | - | - |
| 11 | Scrubs and scabies (human skin cream) | - | - | 5% | - | - | - |

Table S2 Results obtained with the enantiomeric-selective analyses (INS: Insecticides, HBM: Human Breast Milk samples)

| Code Sample | Bifenthrin | Tetramethrin | | | Permethrin | | Cyhalothrin | | Cyfluthrin | Cypermethrin | | | | |
|-------------|-------------------|-------------------|---------------------|------------------|-------------------|------------------|--------------------|--------------------|------------|--------------------|--------------------|------------------|------------------------|----------------------------|
| | EF _{cis} | EF _{cis} | EF _{trans} | R _{c/t} | EF _{cis} | R _{c/t} | EF _{cis1} | EF _{cis2} | | EF _{cis1} | EF _{cis2} | R _{c/t} | R _{cis1/cis2} | R _{trans1/trans2} |
| INS1 | - | 0.51 | 0.48 | 0.21 | 0.38 | 1.03 | - | - | - | - | - | - | - | - |
| INS2 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 0.52 | 0.51 | 3.58 | 0.97 | 1.20 |
| INS3 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 0.48 | 0.49 | 2.10 | 1.15 | 1.46 |
| INS4 | - | 0.51 | 0.46 | 0.29 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| INS5 | - | 0.75 | 1.00 | 0.04 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| INS6 | - | 0.52 | 0.46 | 0.29 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| INS7 | - | - | - | - | 0.38 | 1.89 | - | - | - | - | - | - | - | - |
| INS8 | - | 0,50 | 0,49 | 0,44 | 0,36 | 1,47 | - | - | - | - | - | - | - | - |
| INS9 | - | 0,51 | 0,48 | 0,38 | 0,27 | 1,11 | - | - | - | - | - | - | - | - |
| INS10 | - | - | - | - | 0,35 | 1,22 | - | - | - | - | - | - | - | - |
| INS11 | - | - | - | - | 0,38 | 2,09 | - | - | - | - | - | - | - | - |
| HBM1 | 0.51 | 0.46 | 0.40 | 0.16 | 0.44 | 2.29 | - | 0.09 | - | 0.35 | 0.15 | 4.40 | 0.31 | 1.14 |
| HBM2 | 0.42 | - | 0.25 | - | 0.43 | 1.94 | - | 0.08 | - | 0.50 | 0.35 | 2.67 | 0.53 | 0.85 |
| HBM3 | 0.49 | - | 0.15 | - | 0.42 | 3.45 | - | 0.29 | - | 0.35 | 0.19 | - | 0.10 | - |
| HBM4 | 0.29 | - | 0.40 | - | 0.40 | 3.88 | - | - | - | - | 0.15 | - | - | - |
| HBM5 | 0.58 | - | 0.32 | - | - | - | - | 0.38 | - | - | - | - | - | - |
| HBM6 | 0.52 | 0.55 | 0.37 | 0.14 | 0.44 | 1.77 | - | 0.25 | - | 0.47 | 0.23 | - | 0.58 | - |
| HBM7 | 0.46 | 0.58 | 0.39 | 0.15 | 0.42 | 1.82 | - | 0.14 | - | 0.56 | 0.19 | - | 0.30 | - |

3.5. Discussió de resultats.

Com a resultat dels desenvolupaments de mètodes analítics durant la tesi, es van concretar dos mètodes instrumentals per a l'anàlisi de piretroides. Un d'ells permet la quantificació de 19 piretroides diferents i, alhora, del clorpirifos, un altre insecticida de la família dels organofosfats. Aquest mètode és ràpid (15 min.) i prou sensible per detectar els piretroides a nivells ambientals. Com a comprovació que el mètode optimitzat era vàlid i útil, el grup ha publicat recentment aquest mètode que s'ha descrit amb l'aplicació a diferents matrius alimentàries (llet, peix, ous, carn de vaca i pollastre) i emprant les tècniques extractives també exposades i optimitzades en aquest capítol, sempre que la matriu fos la mateixa a les desenvolupades durant aquesta tesi (llet, peix i ous) (Dallegrave, Pizzolato, Barreto, Eljarrat, & Barcelo, 2016). En aquesta publicació de 2016 es comparen els LODs assolits amb aquesta metodologia (depenent de la matriu i el piretroide tots es trobaren dins el rang de 0,006 a 21,4 ng g⁻¹ ww) amb altres publicats prèviament per a matrius equivalents per altres autors. Els obtinguts amb aquesta metodologia foren sempre aproximadament 3 ordres de magnitud inferiors, arribant a 5 ordres en el cas de la cihalotrina trobada en carn. Val a dir que aquesta comparativa es va realitzar amb una publicació relativament antiga (2009) mentre que la resta amb publicacions més properes temporalment (2013-14)(Dallegrave et al., 2016).

D'altra banda, durant la tesi també es va desenvolupar un mètode enantioselectiu que permet la discriminació total dels diferents isòmers per a la tetrametrina i la separació parcial en el cas de la resta dels altres 5 piretroides testats. Per a aquests, el mètode separa tots els parells enantiomèrics tipus *cis* però no els provinents dels isòmers *trans*. Aquesta informació és força interessant a nivell biològic i ambiental ja que, com ja s'ha comentat, segons la bibliografia, els isòmers *cis* són els menys metabolitzables (Tange et al., 2014; S.-Y. Zhang et al., 2008) (Nakamura et al., 2007) i més perillosos pel que fa a toxicologia crònica (Yuanxiang Jin et al., 2012).

Per tant, per a aconseguir separacions enantiomèriques dels isòmers *trans*, la columna proposada no era eficient. Només en el cas de la tetrametrina va ser útil, però no per a la resta de piretroides testats. Degut a la fragilitat de la fase estacionària, la columna no permetia gaires modificacions més a les ja provades pel que fa a gradients de temperatures, la qual cosa impedia la separació enantiomèrica d'altres piretroides i dels isòmers *trans*. El desenvolupament de noves columnes quirals pot ser, sens dubte, la clau per poder continuar en aquesta línia d'investigació i de desenvolupament de noves metodologies enantioselectives.

Un cop amb aquest mètode instrumental enantioselectiu a punt, els resultats són complexos d'entendre, d'exposar i de comparar entre estudis. Així doncs, es va exposar una manera clara i concisa de càlcul de les proporcions d'enantiòmers i diastereòmers per als piretroides. La clau va ser diferenciar la informació que es pot extreure: per una part la diastereoisomèrica (*cis/trans*) i per una altra la enantiomèrica.

En el cas dels parells enantiomèrics, es va concloure que el més útil i intuïtiu era emprar els factors enantiomèrics (EF, de l'anglès, enantiomeric factor). Aquest paràmetre es defineix a la [Publicació 1](#) com a l'àrea del primer enantiòmer eluït dividit per la suma d'àrees de tots dos enantiòmers. Amb el resultat d'aquest valor és molt simple entendre quin enantiòmer es troba en major proporció. Els rang de resultats d'aquest paràmetre es descriu des del 0, si només hi ha l'enantiòmer que elueix últim, fins a 1, quan només hi ha l'enantiòmer que elueix en primer lloc. El punt intermedi, 0,5, correspon a la mescla racèmica, en la qual la distribució de piretroide es dona en 50% d'abundància de cada enantiòmer. Així és com només amb aquest valor clarament es dedueix quin enantiòmer està en major proporció. L'EF, però, només té sentit comparant un enantiòmer amb el seu parell però per als diastereòmers no.

Per als diastereòmers els paràmetres definits són relacions o *ratio* (R) entre 2 grups. Els R, per contra dels EF, indica la proporció en la qual un diastereòmer està referent a un altre. Així doncs, com a mínim el R serà de 0 entenent no hi ha el diastereòmer concret estudiat. Un R de 1 implica que tots dos grups de isòmers es troben en la mateixa proporció. Com a diferència bàsica amb els EF, no hi ha límit superior. El primer R que es pot definir és el produït per la diferenciació de *cis/trans*, el $R_{cis/trans}$. Com s'ha discutit prèviament, és molt útil des d'un punt de vista toxicològic comprendre si els diastereòmers que s'acumulen en major proporció són *cis* o *trans*. Aquest paràmetre és el que ens indica clarament si hi ha acumulació isomeroselectiva respecte *cis - trans*. A més, en el cas dels piretroides tipus II tenim diferents isòmers *cis* i *trans* fent necessari la definició del $R_{cis1/cis2}$ i $R_{trans1/trans2}$. En aquests casos, la definició de *cis1* i *cis2* es va fer segons l'ordre d'elució, però, donat que es van caracteritzar tots els isòmers, aquesta nomenclatura és fàcilment traslladable als isòmers concrets als quals es refereix, això és, el *cis1* correspon al parell enantiomèric 1R-3R- α R i 1S-3S- α S, mentre que el *cis2* correspon als enantiòmers 1R-3R- α S i 1S-3S- α R.

Val a dir que altres autors prefereixen fer una relació entre pics i donar solament aquest valor (Kuang et al., 2010). Aquesta relació és l'abundància relativa d'un pic, més concretament, l'àrea d'un pic cromatogràfic relativa a la suma de totes les àrees de la resta de pics d'aquell piretroide. Tot i que sembla un mètode més simple que el descrit abans, té inconvenients

apreciables. El primer, i més evident, és que per als piretroides que el mètode no permet separar tots els enantiòmers, hi ha pics que són enantiòmers aïllats i d'altres pics que fan referència a parells d'enantiòmers co-eluïts. És a dir, aquets sistema valora per igual els enantiòmers que els parells enantiomèrics sense fer distinció de si la isomeria és quirals o geomètrica o de si hi ha co-elució. Per si fóra poc, comparar aquests resultats directament amb els extrems d'un resultat cromatogràfic diferent és inviable. Només si s'aconsegueixen els mateixos pics cromatogràfics es podria comparar valor a valor els resultats. Per últim, en cas de voler comparar amb una composició teòrica comercial, cal recalculer els resultats per acabar comprovant si la mescla és racèmica per a un parell enantiomèric concret o si la proporció *cis/trans* s'ajusta a les prescripcions teòriques.

D'altra banda, la nostra sistematització en la nomenclatura permet la comparativa simple entre diferents mètodes cromatogràfics, fins i tot permet comparar composicions obtingudes amb mètodes quirals i mètodes aquirals ja que la relació *cis/trans* i entre *cis* o entre *trans* s'especifica de forma clara. Així doncs, tot i que *a priori* pot semblar més complex definir tots els paràmetres, el valor i significat d'aquests, així com la seva versatilitat per ser emprats en condicions cromatogràfiques molt diverses, fan d'aquests paràmetres els més òptims per a l'estudi d'aquests compostos.

Capítol 4

*Bioacumulació en biota
salvatge*

4.1. Introducció.

En aquest capítol es presentaran els resultats dels treballs sobre biota salvatge que s'han dut a terme al llarg de la tesi. Com ja s'ha introduït prèviament, durant la tesi es van evitar mostres alimentàries que no fossin representatives d'algun ecosistema. Amb aquesta condició, s'aconseguia descriure per primer cop la bioacumulació en espècies exposades a piretroides degut a la contaminació ambiental i no per exposició directa humanament desitjada.

Durant aquest capítol es discutiran termes com la bioacumulació (acumulació de contaminant en un ésser viu) i la biomagnificació (acumulació progressivament més elevada de contaminant en els éssers vius de nivells tròfics superiors). Respecte de la primera, una anàlisi de teixits o restes biològiques dels éssers pot ser útil, tot i caldria també demostrar que no es tracta d'una acumulació momentània deguda a una exposició recent dels piretroides. Sobre biomagnificació, per contra, cal una anàlisi de diverses espècies de diferents estrats de la xarxa tròfica per tal de comprovar l'augment dels nivells residuals de insecticides en els nivells superiors.

Un altra concepte clau dels contaminants ambientals que es discutirà en aquest capítol és el transport a llarga distància. Els contaminants anomenats POPs es caracteritzen per, entre d'altres, ser capaços d'afectar ecosistemes llunyans a la font d'emissió, el què provoca grans dificultats a l'hora d'avaluar el focus d'exposició i les implicacions ambientals reals d'una acció concreta amb aquests contaminants com per exemple, la creació d'una fàbrica on s'hi apliquen o s'empren, per no parlar de les indústries que els sintetitzen. Aquestes afectacions al medi ambient poden donar lloc a perjudicis en biomes que, *a priori*, semblarien aïllats.

Donada la diferent natura de les mostres, aquest capítol es subdivideix en dos segons el biòtop del que es tracta: el medi aquàtic i l'aeri o terrestre. Del medi aquàtic es comprovaren la presència dels piretroides en la biocenosi tant en el medi marí com el d'aigua dolça, mentre que del medi terrestre es limità bàsicament a la d'una zona acotada del Parc Natural de Doñana i una petita mostra de la biocenosi de l'Antàrtida.

Nogensmenys, aquest el medi terrestre presentà força complicacions donat que moltes de les espècies estudiades eren migratòries i protegides, la qual cosa feia, d'una banda, que només es conegués la dieta durant els mesos que eren a la zona de mostreig i, de l'altra, que fos impossible de triar un mostreig ja que les mostres només podien ser les que estaven disponibles amb clares deficiències mostrals, dificultant les anàlisis estadístiques i la interpretació de les dades. Tot i així, com que les relacions de la biocenosi del Parc de Doñana

eren relativament conegudes, aquest treball tenia com a objectius comprovar les potencials bioacumulació i biomagnificació dels piretroides en aquest ecosistema.

Dins del medi terrestre també s'incloué l'anàlisi d'unes mostres d'elefants i llops marins de l'Antàrtida amb la intencionalitat de comprovar si els piretroides podien afectar a la biota d'ecosistemes allunyats i, per tant, transportar-se llargues distàncies.

Per tant aquest capítol està dividit en dos grans blocs segons el medi que envolta la biota estudiada. En el primer bloc, referit a fauna terrestre, es podrà trobar l'article publicat sobre l'estudi de piretroides en ous d'aus del Parc de Doñana i els resultats de l'anàlisi de mostres d'animals antàrtics, que fou un treball no publicat. El segon bloc, bloc del medi aquàtic, a més, es subdividirà també en medi marí i medi d'aigua dolça. Referit a aigua dolça s'inclourà el tercer treball publicat dins el marc d'aquesta tesi sobre l'anàlisi de piretroides en peixos de rius Ibèrics. Al sub-bloc d'ecosistemes marins, s'inclouran dos treballs publicats sobre l'anàlisi de piretroides en dofins, el primer referent a la costa del Brasil i el segon a la costa del sud d'Espanya.

Cada bloc per separat estarà discutit per ressaltar els punts més importants de l'estudi o estudis i al final de tot del capítol es podrà trobar una discussió global del capítol. Per últim, se n'extrauran les conclusions pertinents sobre la bioacumulació dels piretroides en biota salvatge.

4.2. Medi terrestre.

En aquest medi terrestre es van estudiar principalment espècies d'aus que pertanyen a diferents nivells tròfics. Hi havia una espècie estudiada que era clarament pertanyent al grup de consumidors primaris però la resta eren diferents tipus de consumidors secundaris i terciaris dins d'una xarxa tròfica molt complexa. També hi havia espècies carronyaires o que combinaven ser consumidor secundari/terciari amb carronyaire, segons disponibilitat. Davant aquesta varietat, es va cercar una manera de classificar les espècies segons la posició dins la xarxa tròfica. Una eina útil per classificar les espècies correctament dins el nivell tròfic que els correspon és l'anàlisi del *ratio* $\delta^{15}\text{N}$ (d'ara en endavant només $^{15}\delta\text{N}$) (Caron-Beaudoin et al., 2013; Colabuono, Barquete, Taniguchi, Ryan, & Montone, 2014). Aquest paràmetre és la relació entre l'abundància relativa de l'isotop ^{15}N respecte del ^{14}N a la mostra i a l'atmosfera per mil. L'equació 1 mostra la fórmula d'aquest paràmetre.

$$\delta^{15}\text{N} = \left(\frac{(^{15}\text{N}/^{14}\text{N})_{\text{mostra}}}{(^{15}\text{N}/^{14}\text{N})_{\text{atmosfera}}} - 1 \right) \cdot 1000$$

Equació 1: Definició del ratio $^{15}\delta\text{N}$

A priori, dins una xarxa tròfica, són els productors els que incorporen el nitrogen a la cadena alimentària. Per tant la quantitat i proporció de isòtops estables de N que hi ha dins la xarxa depèn dels productors. Així, els consumidors primaris acumularien una quantitat de $\delta^{15}\text{N}$ superior a la pròpia dels productors, degut al consum de moltes concentracions més baixes continguda en el seu aliment. Al seu torn, els consumidors secundaris haurien de contenir una proporció d'aquest isòtop encara superior i així fins arribar al cim de la xarxa tròfica. Seguint aquest raonament, dins un ecosistema determinat i concret, avaluant els $\delta^{15}\text{N}$ es pot situar a cada espècie dins el nivell tròfic que li correspon (Florin, Felicetti, & Robbins, 2011). Això, no obstant, té força inconvenients a la pràctica. Per començar, l'ecosistema ha de ser relativament tancat, de tal manera que no hi hagi entrada de nitrogen per altres fonts alienes als productors. A més, si les espècies poden conviure entre diferents medis o viure en un medi però alimentar-se d'un altre, com per exemple les espècies pescadores, aquests nivells tròfics són més difícils d'acotar segons els valors d'aquest isòtop (Florin et al., 2011). Això és degut a que una font de nitrogen aliena (com ara la nitrificació de les aigües per escorrentia de camps de cultiu propers) o la inclusió de productors de diferents medis (algues i fitoplàncton vs. plantes terrestres, per exemple) dóna lloc a una diferent línia basal del $\delta^{15}\text{N}$ de la xarxa i, per tant, tot i ser tots productors primaris tindrien nivells de $\delta^{15}\text{N}$ diferents (Robbins, Felicetti, & Sponheimer, 2005; Symes & Woodborne, 2011).

D'altra banda, tenint espècies que teòricament competeixen per l'aliment és interessant comprovar si realment ho fan dins d'aquest ecosistema estudiat. Això es pot comprovar amb el *ratio* $\delta^{13}\text{C}$, que es defineix d'una manera equivalent al $\delta^{15}\text{N}$, però amb els isòtops ^{13}C i ^{12}C . De forma similar que amb el $\delta^{15}\text{N}$, els productors de la xarxa són els encarregats de introduir el C dins la xarxa alimentària. Això, no obstant, és més complex que amb el N. Les espècies vegetals se solen dividir segons si la incorporació del C la fan a través de la síntesi de productes inicials de 3 C o de 4 (McConnaughey & McRoy, 1979). Aquest fet, provoca que diferents productors tinguin diferents nivells de $\delta^{14}\text{C}$ segons si sintetitzen uns productes o uns altres. Donat que la introducció del carboni dins la xarxa sempre serà una mescla de les dues, esbrinar el nivell tròfic de les espècies gràcies a aquest isòtop estable no seria viable. Ara bé, com que l'alimentació general de cada espècie en un ecosistema sol ser més o menys rutinària, si espècies diferents tenen valors de $\delta^{14}\text{C}$ molt similar implicarà que la seva dieta és, igualment,

molt similar. Per contra, valors molt diferents d'aquest isòtop poden indicar dietes molt diferents (Prochazka et al., 2010; Symes & Woodborne, 2010).

Les aus del Parc de Doñana se suposa que no estan exposades a l'aplicació directa dels piretroides. Per tant, la via d'exposició hauria de ser l'alimentària mitjançant la contaminació de l'aliment. Amb aquest context, en l'estudi realitzat en els ous d'aquestes aus també es realitzà l'anàlisi dels isòtops estables del N i C per tal de comprovar si hi havia relacions.

D'altra banda, la disponibilitat de mostres d'animals de l'Antàrtida ens permeté la comprovació de si els piretroides són capaços de traslladar-se grans distàncies des del focus d'emissió.

4.2.1 Piretroides en ous d'aus salvatges

En aquest apartat es presenta la [Publicació 2](#). En ella es varen analitzar ous d'aus salvatges del Parc Nacional de Doñana. Aquest parc és una reserva natural considerada patrimoni de la humanitat i protegit. Això és així perquè és una zona de gran interès biològic. A més de la fauna perenne de la zona, la seva situació entre Àfrica i Europa és clau per la migració de moltes espècies d'aus. Moltes d'elles només en les èpoques de migració s'aturen breument durant el seu viatge. D'altres, però, es queden al parc i hi nien.

De les espècies que empren el parc com a zona de nidificació, moltes són espècies en perill d'extinció i protegides. En el nostre estudi es van incloure moltes espècies en aquesta condició. Això implicà que el mostreig no era dirigit sinó que es va veure limitat a la disponibilitat de mostres, ja que només es podien obtenir ous infèrtils, ja fos perquè no fossin fecundats o perquè per la raó que sigui haguessin estat rebutjats pels progenitors.

A més, com s'acaba d'introduir, les anàlisis no només van incloure la determinació i caracterització enantiomèrica dels piretroides sinó també dels isòtops estables mitjançant els valors de $\delta^{15}\text{N}$ i $\delta^{13}\text{C}$.

Publicació 2:

*Pyrethroid insecticides in wild bird eggs from a
World Heritage Listed Park: A case study in
Doñana National Park (Spain)*

Cayo Corcellas ; Ana Andreu ; Manuel Máñez ;
Fabrizio Sergio ; Fernando Hiraldo ; Ethel Eljarrat ;
Damià Barceló

Environmental Pollution (2017)

IF (2015):4,839





Pyrethroid insecticides in wild bird eggs from a World Heritage Listed Park: A case study in Doñana National Park (Spain)[☆]



Cayo Corcellas^a, Ana Andreu^b, Manuel Máñez^b, Fabrizio Sergio^c, Fernando Hiraldo^c, Ethel Eljarrat^{a,*}, Damià Barceló^{a,d}

^a Water and Soil Quality Research Group, Dep. of Environmental Chemistry (IDAEA-CSIC), Barcelona, Spain

^b Natural Processes Monitoring Team, Estación Biológica de Doñana (EBD-CSIC), c/Américo Vespucio s/n, 41092 Seville, Spain

^c Department of Applied Biology, Doñana Biological Station (EBD-CSIC), Seville, Spain

^d Catalan Institute for Water Research (ICRA), Girona, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 6 February 2017

Received in revised form

20 April 2017

Accepted 14 May 2017

Keywords:

Pyrethroids
Cypermethrin
Wild bird eggs
Bioaccumulation
Isomer-selectivity
Insecticides

ABSTRACT

Recent studies demonstrated that the common pyrethroid insecticides are present in aquatic biota tissues. In this study, 123 samples of unhatched eggs of 16 wild bird species collected from 2010 to 2012 in Doñana National and Natural Park were analysed to determine 13 pyrethroids. This study represents the first time that pyrethroids are detected in tissues of terrestrial biota, 93% of these samples being positive to those pollutants. Levels of total pyrethroids ranged from not detected to 324 ng g⁻¹ lw. The samples were characterized by stable isotope analysis. Species with diets based on anthropogenic food showed higher levels of pyrethroids and lower values of $\delta^{15}\text{N}$. Finally, we characterized the isomers of pyrethroids and discerned some isomeric- and enantiomeric-specific accumulations. In particular, tetramethrin and cyhalothrin showed an enantiomeric-selective accumulation of one enantiomer, highlighting the need to assess toxicological effects of each enantiomer separately to be able to make a correct risk assessment of pyrethroids in birds.

© 2017 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Pyrethroids are semisynthetic insecticides very common worldwide. They derive from the natural pyrethrins and are related to chrysanthemic acid. Given their chemical structure, they are chiral molecules with 2 or 4 enantiomeric pairs depending on their number of chiral centres (2 or 3). Their use is extensive in several different fields such as agronomics, veterinarian and domestic use. They are even used in public health against human parasites like lice, scabies or mosquito vectors of some diseases (Barr et al., 2010).

The increased usage of these pesticides is due to their properties and the current regulation of other organochlorine and organophosphate insecticides which have been banned in several countries around the world. One of these properties is their environmental persistence, generally lower than 90 days (UH, 2011). Their toxicity is another important issue. Aquatic ecosystems seem to be especially sensitive to these compounds (Corcellas

et al., 2015a; Weston et al., 2014). However, pyrethroids have demonstrated low acute toxicity in mammals and birds, in part because of their easy metabolism (Demoute, 1989; Scollon et al., 2009).

However, recent studies have shown that the abuse of pyrethroids could make them ubiquitous in environment (Xue et al., 2005; Feo et al., 2010a; Kuivila et al., 2012; Weston and Lydy, 2010). Pyrethroids have been detected in biota tissues of fish (Corcellas et al., 2015a), dolphins (Alonso et al., 2012, 2015) and even humans (Corcellas et al., 2012; Sharma et al., 2014; Ostrea et al., 2009). Moreover, maternal transfer of pyrethroids by both gestational and lactation pathways has been observed in mammals (Alonso et al., 2012, 2015). The exposure of pyrethroids in wild birds near farmlands was even determined (Bro et al., 2015). Additionally, some authors, described disruptions of the endocrine system and depression of male fertility (Cinzia et al., 2013; Zhang et al., 2008; Jin et al., 2011) in rats and mice at non-acute toxic doses of pyrethroids. Besides, these studies showed different toxicological behaviour depending on the specific isomer of each pyrethroid, remarking the importance of taking into account the isomerism in risk assessment studies.

[☆] This paper has been recommended for acceptance by Dr. Chen Da.

* Corresponding author.

E-mail address: eeeqam@cid.csic.es (E. Eljarrat).

In bird species toxic doses and effects have also been described (Khan et al., 2012). For example, the lethal dose (LD_{50}) of cyfluthrin in most of the studied bird species is in the order of thousands of $mg\ kg^{-1}$. Only canaries seemed to be especially sensible to this pyrethroid with LD_{50} from 68 to 274 $mg\ kg^{-1}$ (EPA, 2014). Moreover, even when direct toxicity for birds is low, indirect environmental effects of their residues are not negligible. For instance, they could indirectly affect insectivorous birds in their behaviour and physiology, as well as through decline in their prey base (Pendleton and Baldwin, 2007).

There are few studies that have evaluated pyrethroid residues in avian eggs. Furthermore, these studies have been conducted on poultry so that their results are not environmentally representative (dell'Oro et al., 2014; dos Reis Souza et al., 2013). Some studies with wild grey partridges analysed eggs and carcasses of these birds with multiresidue methods and they found low amounts of lambda-cyhalothrin (Bro et al., 2016), tefluthrin, cyfluthrin and cypermethrin (Millot et al., 2015). The aim of our work was to evaluate for the first time the occurrence of pyrethroids in unborn eggs from wild birds of a National Park and surrounding areas in order to evaluate the presence of pyrethroid in wild fauna. That meant the quantitative determination of 13 common pyrethroids (*cis*-bifenthrin, cyfluthrin, cypermethrin, lambda-cyhalothrin, deltamethrin, fenvalerate, fenpropathrin, fluvalinate, permethrin, phenothrin, resmethrin, tetramethrin and tralomethrin) in egg samples, the isomeric and enantiomeric characterization of these residues, and the relation of all these data with the determination of $\delta^{13}C$ and $\delta^{15}N$ in the same samples, in order to assess the influence of trophic level and food sources in pyrethroid content.

2. Materials and methods

2.1. Sampling

Doñana (National Park and Natural Park) is a nature reserve located in southwestern Spain and inscribed as a World Heritage Site, a Ramsar Site, a Biosphere Reserve and a European Community Special Protection Area. More than 360 bird species are estimated to live or breed inside its limits (UNESCO). In fact, its location is in the middle of the East Atlantic Flyway and it is considered a key site of this migratory route.

In consecutive campaigns in 2010, 2011 and 2012, we collected 14, 22 and 87 eggs that had failed to hatch, respectively. All eggs came from different nests. The 123 eggs belonged to 16 different species from several trophic levels and seven Orders (Table 1). However, when statistical analyses needed it, we grouped these samples in few categories. In order to test for variations in pyrethroid concentrations by ecological role, we grouped species by their taxonomical Order, such as Accipitriformes and Falconiformes (diurnal raptors), or Ciconiiformes (herons, storks and ibises). This allowed us to group together species with broadly similar ecological requirements. However, the Order Strigiformes (i.e. owls) was composed by one only sample and was pooled with the Order Falconiformes given their similar predatory trophic level.

Egg samples were collected opportunistically during nest checks and chick ringing operations, so that the number of samples per species depended on local abundance in the three study years. All the eggs were frozen and sent to the laboratory in individual and protected containers. Egg samples were measured (larger diameter) and broken. The egg content was weighted, homogenized and freeze dried. Lyophilized samples were weighted and homogenized again and stored at $-20\ ^\circ C$ until analysis.

2.2. Analytical methodologies

Sample treatment was adapted from previously developed methodologies for biota samples (Corcellas et al., 2015a; Feo et al., 2011). Briefly, an exact amount (0.2–0.3 g) of freeze-dried sample was spiked overnight with 2.5 ng and 1.25 ng of *d*₆-*trans*-permethrin and *d*₆-*trans*-cypermethrin, respectively. Extraction procedure was carried out twice with 20 mL of hexane:dichloromethane 2:1 and assisted by ultrasound for 15 min. All solvent was dried by a N_2 stream. A following tandem SPE cleaned up (basic alumina and C18 cartridges, 30 mL acetonitrile as eluent) was carried out. The eluent was evaporated under N_2 and the sample reconstituted in 100 μL of ethyl acetate. Analyses were performed on an Agilent Technologies 7890 A coupled to a 7000 A GC–MS Triple Quad. The selected mass spectrometry (MS) mode was negative chemical ionization with ammonium as reagent gas. The columns chosen were a DB5-ms (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) (15 m \times 0.25 mm \times 0.1 μm) for the quantitative analysis and a BGB-172 (BGB Analytik, Switzerland) (30 m \times 0.25 mm \times 0.25 μm) for the enantiomeric determination. Details of chromatographic conditions and MS–MS parameters to both achiral and chiral analyses are reported elsewhere (Corcellas et al., 2015b).

In parallel, lipid content was determined gravimetrically. An equivalent extraction procedure used for pyrethroid determinations was applied to 1 g of sample. Then, solvent extract was removed under a N_2 stream and the resulting residue was weighted.

2.3. Standards and reagents

Analytical standards were purchased from Dr. Ehrenstorfer (Augsburg, Germany). *d*₆-*trans*-permethrin and *d*₆-*trans*-cypermethrin were chosen as surrogate standards. Standard solutions were prepared in ethyl acetate (“for gas chromatography” quality from Merck, Darmstadt, Germany). Calibration curves were prepared at different concentrations ranging between 0.4 and 150 $ng\ mL^{-1}$. The rest of organic solvents were obtained from J.T. Baker “for use in HPLC” quality (Deventer, The Netherlands). Solid phase extraction (SPE) cartridges (C18, 2 g 15 mL^{-1}) were obtained from Isolute Biotage (Uppsala, Sweden) and cartridges of basic alumina (5 g 25 mL^{-1}) from Interchim (Montluçon, France).

2.4. Quality assurance/control

For each batch of 12 samples, one methodological blank was carried out. Levels of blanks were subtracted to all corresponding samples in case the blank signal was higher than 1% of the sample signal. Linearity in the selected range of concentration was verified obtaining correlation coefficients higher than 0.98 for all analytes. The mean recovery was 79%, being 53% the lower value, obtained for deltamethrin. Limits of detection (LOD) ranged from 0.03 to 0.46 $ng\ g^{-1}$ lipid weigh (lw) and limits of quantification (LOQ) from 0.10 to 1.54 $ng\ g^{-1}$ lw.

2.5. Isomeric and enantiomeric analyses

After quantitative analysis, representative samples of species were selected in order to be analysed with the chiral column. This method allowed discerning the isomeric proportion of bifenthrin, cyhalothrin, cyfluthrin, cypermethrin, permethrin and tetramethrin. In our previous work we described the peak assignment and the correspondences between both analyses (Corcellas et al., 2015b). Enantiomeric factors (EFs) for each enantiomeric pair were calculated with Eq. (1).

Table 1

Classification for this work, sample inventory, feeding classification and migratory behaviour of the 16 bird species under study.

| Classification for this work | Order | Species | Scientific name | Number of samples (1rs; 2nd; 3rd campaign) | Feeding habits | Feeding classification | Migratory behaviour of breeding population. |
|------------------------------|-----------------------|---------------------|------------------------------|--|---|--|--|
| Falconiforme group | Falconiformes | Peregrine Falcon | <i>Falco peregrinus</i> | 0; 1;0 | Medium-sized birds. | Terrestrial | Resident. |
| | | Common Kestrel | <i>F.tinnunculus</i> | 3; 3;18 | Their preys are usually small size mammals, small birds, reptiles and insects. | Terrestrial | Resident and dispersive, and possibly partially migratory. |
| | Accipitriformes | Red Kite | <i>Milvus milvus</i> | 0; 0;2 | Predator and scavenger. It feeds on small or medium sized mammals, birds, reptiles, amphibians, large insects and carrion (including meat from rubbish dumps, and road killed animals). | Anthropogenic | Resident and dispersive. |
| | | Black Kite | <i>M. migrans</i> | 0; 5;15 | Predator and scavenger. It feeds on rabbits, birds (especially young), reptiles, amphibians, fish, insects and carrion (including meat from rubbish dumps, and road killed animals). | Anthropogenic | Migratory, wintering in sub-Saharan Africa. |
| | | Black-winged Kite | <i>Elanus caeruleus</i> | 0; 0;2 | It feeds on small-sized mammals, birds and lizards. | Terrestrial | Potentially resident, but some individuals make large-scale nomadic movements. |
| Strigiformes | Western marsh harrier | Booted Eagle | <i>Circus aeruginosus</i> | 0; 0;1 | It feeds mainly on rabbits, rodents, medium-sized birds, their offsprings and eggs. | Terrestrial | Resident and dispersive. |
| | | Booted Eagle | <i>Aquila pennata</i> | 2; 0;4 | It feeds mainly on medium-sized birds; rabbits, reptiles and occasionally large insects. | Terrestrial | Migratory, wintering in sub-Saharan Africa. |
| | Barn Owl | <i>Tyto alba</i> | 0; 0;1 | It feeds mainly on small mammals, Pelobates cultripes and small birds. | Terrestrial | Resident, but young birds make dispersive movements. | |
| | | White Stork | <i>Ciconia ciconia</i> | 0; 13; 10 | It feeds on red-swamp crayfish (<i>Procambarus clarkii</i>), large insects, rodents, lizards, snakes, frogs, fish, bird eggs and nestlings, remains of human food. | Anthropogenic | Mainly migratory, but a part of the population is resident. |
| Ciconiiforme group | Pelecaniformes | Glossy Ibis | <i>Plegadis falcinellus</i> | 5; 0;0 | It feeds mainly on aquatic beetles and dragonfly larvae; also Sharp-ribbed salamanders (<i>Pleurodeles waltl</i>) and small Carp (<i>Cyprinus carpio</i>). | Aquatic | Migratory and dispersive. Part of the population winters in Doñana. |
| | | Purple Heron | <i>Ardea purpurea</i> | 3; 0;0 | It feeds mainly on fish, amphibians, Odonata nymphs and aquatic beetles. Occasionally birds. | Aquatic | Migratory, wintering in sub-Saharan Africa. |
| Charadriiforme group | Charadriiformes | Gull-billed tern | <i>Gelochelidon nilotica</i> | 0; 0;10 | It feeds mainly on insects and crustaceans; also amphibians and fish. | Aquatic | Migratory, wintering in sub-Saharan Africa. |
| | | Slender-billed gull | <i>Chroicocephalus genei</i> | 0; 0;4 | Mainly fish and invertebrates (brine-shrimps <i>Artemia</i> spp., Diptera larvae, beetle larvae and adults). | Aquatic | Mainly migratory, but a small part of the population is resident. |
| | | Black-headed gull | <i>C. ridibundus</i> | 0; 0;7 | Mainly insects and earthworms, but commonly supplemented by plant material and household or industrial waste. | Anthropogenic | Dispersive or partially migratory. |
| Anseriforme group | Anseriformes | Common pratincole | <i>Glareola pratincola</i> | 1; 0;0 | Insectivore. | Terrestrial | Migratory. |
| | | Gadwall | <i>Anas strepera</i> | 0; 0;13 | It mainly feeds on the vegetative part of plants (roots, leaves, tubers, bud and seeds of aquatic plants) and algae, with infrequent animal material, probably accidental. | Herbivorous | Resident. |

$$EF = \frac{A_i}{A_T} \quad (1)$$

where A_i is the area of the first eluting enantiomer and A_T is the sum of areas of both enantiomers. A racemic mixture of an enantiomeric pair is always represented by an EF equal to 0.5. Since type I pyrethroids present 2 enantiomeric pairs, 2 EF were defined and named as EF_{cis} and EF_{trans} . For type II pyrethroids 4 EF were needed: EF_{cis1} , EF_{cis2} , EF_{trans1} and EF_{trans2} .

Moreover, diastereoisomeric factors were also defined. First of

all, $R_{cis/trans}$ was defined as the ratio between *cis* and *trans* isomers of the same pyrethroid. In the case of type II pyrethroids, this relationship corresponded to the ratio $(cis1 + cis2)/(trans1 + trans2)$. $R_{cis1/cis2}$ and $R_{trans1/trans2}$ were also calculated in case of type II pyrethroids.

2.6. $\delta^{13}C$ and $\delta^{15}N$ determinations

In a first step the fat content of the eggs was removed from samples because it may interfere in $\delta^{13}C$ determination. It was done following a simple liquid extraction of 0.5 g of sample with

chloroform:methanol (2:1) repeated three times. Samples were dried at 50 °C for 24 h. Then, 0.35 mg of this dried sample was exactly weight in tin capsules ready for the isotope determination. Isotopic analyses were carried out at the Laboratorio de Isotopes Estables of the Estacion Biologica de Donana (LIE-EBD, Spain; www.ebd.csic.es/lie/index.html) with a Flash HT Plus elemental analyser coupled to a Delta-V Advantage isotope ratio mass spectrometer via a CONFLO IV interface (Thermo Fisher Scientific, Bremen, Germany). Stable isotope ratios are expressed in the standard δ -notation (‰) relative to Vienna Pee Dee Belemnite ($\delta^{13}\text{C}$) and atmospheric N_2 ($\delta^{15}\text{N}$). Analytical measurement errors are quantified in $\pm 0.1\text{‰}$ and $\pm 0.2\text{‰}$ for $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$, respectively.

2.7. Statistic treatment

Results were tested with typical statistical tools such as Spearman's correlation, ANOVA tests and the Bonferroni correction of probability values for multiple tests on the same dataset. Type I error (α) was always less than 0.05 or less when it is specified. All statistics was carried out with IBM SPSS Statistics 22 software.

3. Results and discussion

3.1. $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ analyses

Results of $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$ are included in Table A (supporting material). $\delta^{13}\text{C}$ values differed between species, with data ranging from -17.9 for slender-billed gull (*Chroicocephalus genei*) to -28.0 for glossy ibis (*Plegadis falcinellus*). The same occurred for $\delta^{15}\text{N}$ values, with data ranging from 10.9 for barn owl (*Tyto alba*) to 15.0 for western marsh harrier (*Circus aeruginosus*). The relation among stable isotopes and species was studied. Fig. 1a represented $\delta^{15}\text{N}$ vs. $\delta^{13}\text{C}$ for all species. Fig. 1b and d showed the same representation taking into account our species groupings. In order to make clearer potential differences among species, a test of multiple correlations with Bonferroni correction was applied. The results of correlations suggested that there were no statistical differences in stable isotopes between Falconiformes and Ciconiiformes at 0.05 of significance. However, Anseriformes were different to the rest in both $\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$. Charadriiformes were a differentiated group regarding $\delta^{13}\text{C}$ values but in relation to $\delta^{15}\text{N}$ were similar enough to Ciconiiformes when considering the high dispersion exhibited by this parameter. Fig. 1e shows the representation of median values of $\delta^{15}\text{N}$ vs $\delta^{13}\text{C}$ per group. In this graph, Falconiformes and Ciconiiformes are characterized by lower levels of $\delta^{15}\text{N}$ which were very close, as expected taking into account the results of the test of multiple correlations. Traditionally, high levels of $\delta^{15}\text{N}$ are related to higher trophic levels in the same ecosystem; however, in this case, the opposite occurred. It is widely known that the basis of $\delta^{15}\text{N}$ can be different in each area and/or ecosystem. Inputs of nutrients from exogenous sources, both natural (such as nitrification or denitrification) and anthropogenic (such as human sewage and agriculture), are common in many ecosystems. These nutrients often have distinct isotopic ratios and, as a result, can cause changes in baseline isotope ratios. Fluctuating baseline $\delta^{15}\text{N}$ have the potential to confound interpretation of trophic differences within species when one compares across systems (Jardine et al., 2006). Precisely, water that flows from the Doñana National Park is susceptible to NO_3^- contamination from small urban areas in the surroundings of the park and agricultural practices allowed in the ecotone, where farming of strawberries and rice is common (Tortosa et al., 2011). Due to this fact, an important factor that explains the low levels of $\delta^{15}\text{N}$ is the food origin. Some authors have demonstrated that anthropogenic sources of food tend to present lower $\delta^{15}\text{N}$ (Florin et al., 2011; Caron-Beaudoin et al., 2013).

Therefore, birds which feed from rubbish dumps or other human sources could have low levels of $\delta^{15}\text{N}$. Besides, starvation, migration and increased protein catabolism in general can modify levels of $\delta^{15}\text{N}$ (Karnovsky et al., 2012). Thus, determining the trophic level just from this isotopic parameter is difficult with migratory species.

In order to check the anthropogenic effect in our samples, the feeding of our species was labelled in 4 categories following the known preferences of each species. These categories were *terrestrial* for those birds which feed from animals mainly from the terrestrial ecosystems; *anthropogenic*, for those whose feeding habits are composed in a certain proportion by food from human sources; *aquatic*, for those dependent for food from aquatic ecosystems; and *herbivorous* for those birds whose feeding habits were mainly based on plants and algae (see Table 1 for feeding classification). An ANOVA with post-hoc Bonferroni test was carried out. When $\delta^{15}\text{N}$ was examined, the results showed that two groups seemed separate from the rest: terrestrial and anthropogenic sources presented the lower values of $\delta^{15}\text{N}$ (11.4 ± 1.8 and 11.4 ± 1.7 , respectively) whereas aquatic and herbivorous feeders had values significantly higher (13.5 ± 1.5 and 14.6 ± 1.1 , respectively), as it was supposed given the nitrification problem in Doñana waters.

Furthermore, regarding $\delta^{13}\text{C}$, it has been usually related to diets by different authors, as well (Colabuono et al., 2014; McConnaughey and McRoy, 1979). Therefore, knowing both isotope values, it could be possible to describe some feedings and discriminate anthropogenic sources from natural ones. Applying the same test as for the other stable isotope, herbivorous group was statistically different to all the other groups, concerning $\delta^{13}\text{C}$ values. The mean values were of -18.8 ± 1.6 , -22.5 ± 2.0 , -23.0 ± 3.3 and -23.7 ± 1.0 for herbivorous, anthropogenic, aquatic and terrestrial groups respectively.

3.2. Levels of pyrethroids

Concentration levels obtained for each bird egg sample analysed are presented in Table A (supporting information). 115 samples were positive to pyrethroids from the 123 analysed ones. This means that we have a 93% of detection frequency of at least one pyrethroid in levels upper the LOQ. This is the first time that levels of pyrethroids were detected in wild bird eggs. Table 2 summarized the range of pyrethroid concentrations found by species. The most polluted species were black-headed gull (mean = $162 \text{ ng g}^{-1} \text{ lw}$), gull-billed tern (mean = $61.5 \text{ ng g}^{-1} \text{ lw}$) and black kite (mean = $48.5 \text{ ng g}^{-1} \text{ lw}$), respectively. On the other side, purple heron (mean = $1.49 \text{ ng g}^{-1} \text{ lw}$), glossy ibis (mean = $1.59 \text{ ng g}^{-1} \text{ lw}$) and black-winged kite (mean = $1.93 \text{ ng g}^{-1} \text{ lw}$) were the species with the lower concentration of pyrethroids, respectively.

Furthermore, the levels found were very dispersive and ranged from the not detected to $324 \text{ ng g}^{-1} \text{ lw}$. This variation can be explained by many factors. First of all, diet is a very common way of intake of pollutants. In this context, having variation in levels of species with different feeding habits was not surprising, as it was previously described by other authors and other lipophilic contaminants (Baron et al., 2014; Voorspoels et al., 2007). Moreover, deviation is as well very high in the intra-species comparison, explained by differences in age, body condition, habitat and migratory behaviour, among others (Herzke et al., 2002). Another explanation for deviation could be metabolism. We didn't evaluate metabolite concentration in samples because we hypothesise that in these infertile eggs metabolism would be negligible, overall in those eggs that were at first stage of development. However, this is an issue that need to be further studied in following works.

Our study represented the first attempt to evaluate the pyrethroid contamination in eggs of different bird species. Therefore, it is difficult to make a comparison of levels. There are only few recent

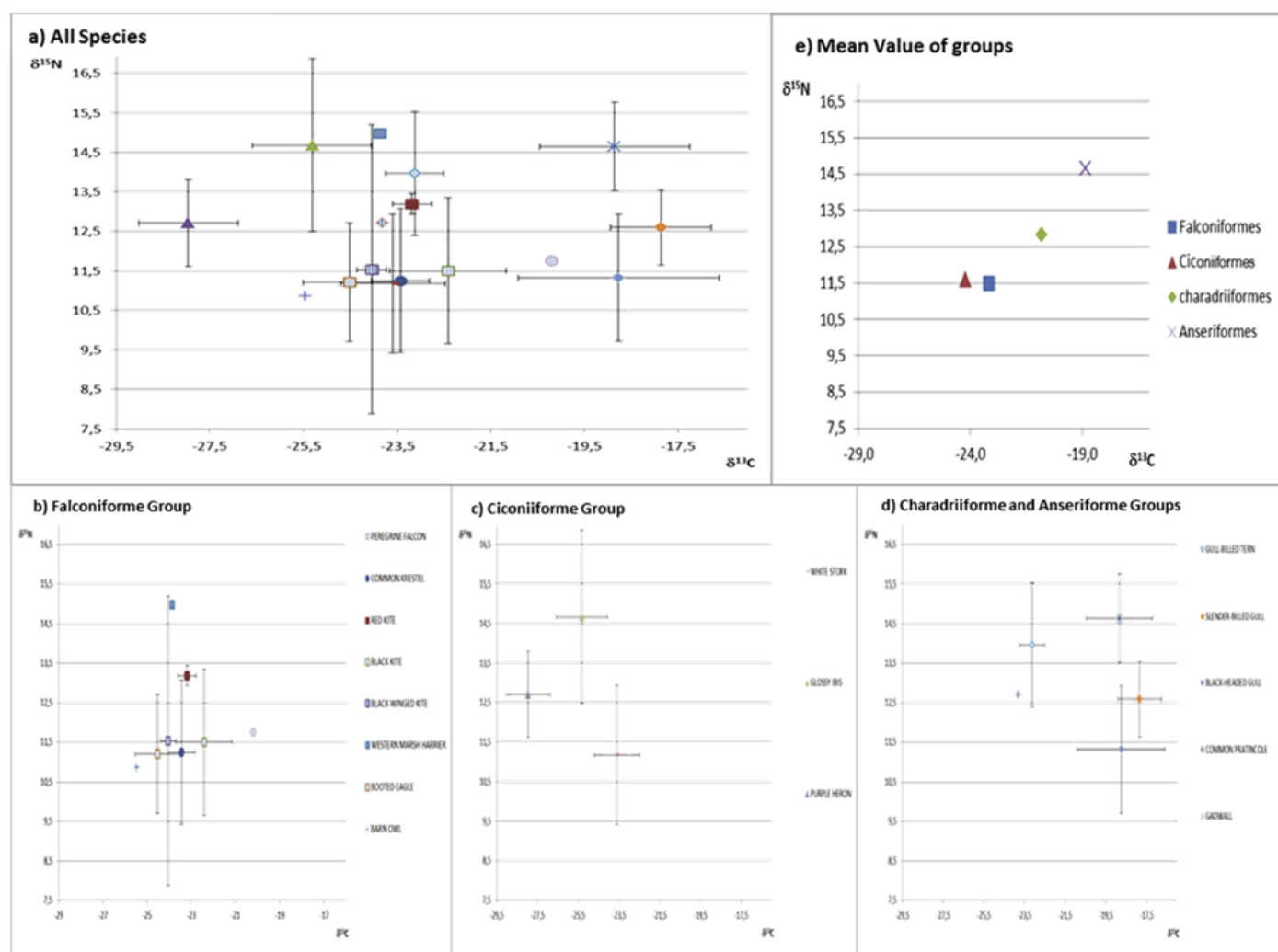


Fig. 1. Representation of $\delta^{15}\text{N}$ vs. $\delta^{13}\text{C}$ for different species. Key: Round: Falconiformes, Square: Accipitriformes, Cross: Strigiformes, Dash: Ciconiiformes, Triangle: Pelecaniformes, Romb: Charadriiformes, Star: Anseriformes.

Table 2

Basic statistics of pyrethroid levels in bird egg samples (ng g^{-1} lw).

| Classification | Species | N | Mean \pm standard deviation | Geometrical Mean | Range | % Positives |
|----------------------|-----------------------|-------------|-------------------------------|------------------|-----------|-------------|
| Falconiforme group | Barn owl | 1 | 5,45 | — | — | 100 |
| | Booted eagle | 6 | 23,0 \pm 43 | 2,77 | 0,14–110 | 100 |
| | Black kite | 20 | 48,5 \pm 54 | 23,4 | ND–198 | 90 |
| | Black-winged kite | 2 | 1,93 \pm 1,2 | 1,74 | 1,10–2,77 | 100 |
| | Common kestrel | 24 | 6,17 \pm 9,7 | 2,10 | ND–32,8 | 83 |
| | Peregrine falcon | 1 | 19,1 | — | — | 100 |
| | Red kite | 2 | 7,14 \pm 9,5 | 2,46 | 0,44–13,8 | 100 |
| | Western marsh harrier | 1 | 4,88 | — | — | 100 |
| | Ciconiiforme group | Glossy ibis | 5 | 1,59 \pm 2,0 | 0,74 | 0,15–4,97 |
| Purple heron | | 3 | 1,49 \pm 1,5 | 0,93 | 0,24–3,15 | 100 |
| White stork | | 23 | 31,4 \pm 39 | 14,6 | 0,84–140 | 100 |
| Charadriiforme group | Black-headed gull | 7 | 162 \pm 128 | 118 | 32,4–324 | 86 |
| | Common pratincole | 1 | 17,8 | — | — | 100 |
| | Gull-billed tern | 10 | 61,5 \pm 80 | 29,2 | 2,40–256 | 100 |
| | Slender-billed gull | 4 | 3,35 \pm 2,0 | 2,38 | 0,40–4,75 | 100 |
| Anseriforme group | Gadwall | 13 | 5,79 \pm 3,4 | 4,77 | 1,24–12,7 | 100 |

ND - below limit of detection.

works that have determined pyrethroid levels in samples of chicken eggs (*Gallus gallus domesticus*) and they found cypermethrin at levels of 22 ng g^{-1} wet weight (ww) (dell'Oro et al., 2014) and bifenthrin at 4 ng g^{-1} ww (dos Reis Souza et al., 2013).

It is difficult to make a comparison due to the different units used, lw vs. ww, and also because of different sample treatment. For example, dell'Oro et al. (dell'Oro et al., 2014), analysed only the yolk. However, we can compare the pyrethroid profile: while in our

study we detect a wide range of pyrethroids (12 different compounds), chicken egg samples were contaminated by only one pyrethroid (cypermethrin or bifenthrin). This result was expected because it is the consequence of a specific insecticide treatment in poultry. However, wild bird eggs should be polluted by general contamination of the environment, leading to a presence of a wide variety of pyrethroids. In grey partridges, some authors evaluated the presence of different pesticides used in near farmlands. They found levels lower than 0.01 mg kg^{-1} of lambda-cyhalothrin in eggs (Bro et al., 2016) and levels of tefluthrin, cyfluthrin and cypermethrin from 0.1 to 0.11 mg kg^{-1} in carcasses of these birds (Millot et al., 2015). These levels are in concordance with ours having into account that probably these partridges lived more exposed to farmland pesticides than ours species.

It is also interesting to make a comparison with other pollutants. Precisely the same samples were previously analysed to evaluate the content of halogenated flame retardants (HFRs) (Baron et al., 2014). HFRs were detected in all the samples analysed (100% frequency detection), similarly to our 93% of frequency detection for pyrethroids. But, we must take into account the difference between both families of contaminants, being HFRs persistent organic pollutants (POPs), whereas pyrethroids have low environmental persistence (≤ 90 days) (Feo et al., 2010b). However, its continued use makes them ubiquitous in the environment, and they are considered *pseudo*-persistent pollutants. Total concentration levels of polybrominated diphenyl ether (Σ PBDEs) and halogenated norbornene (Σ Dechloranes) ranged from 1.40 to 90.7, and from 0.77 to $260 \text{ ng g}^{-1} \text{ lw}$, respectively. These concentration values were similar to those found in our study, with total pyrethroid levels ranging between nd to $324 \text{ ng g}^{-1} \text{ lw}$. However, the specie most contaminated by HFRs was the white stork, whereas the most contaminated by pyrethroids was the black-headed gull. To understand this difference, we must take into account various aspects such as potential different sources of contamination, as well as some processes such as biomagnification along food chain. Biomagnification was well described for POPs (Baron et al., 2014; Barón et al., 2015), and high HFR levels in white storks were in accordance with their high trophic level. However, in the case of pyrethroids, only recent studies showed their bioaccumulation potential (Corcellas et al., 2015a; Alonso et al., 2015; Alonso et al., 2012; Corcellas et al., 2012), but it is still unclear whether biomagnification occurs along food chain.

3.3. Pyrethroid distribution

We analysed 13 different pyrethroids. Of these, resmethrin, fluvalinate and fenproprathrin were never detected. The rest of pyrethroids were found in different patterns of distribution. The more frequently present pyrethroid was cypermethrin (89% positives) followed by λ -cyhalothrin (81%) and bifenthrin (77%). Tetramethrin, permethrin, fenvalerate and cyfluthrin were found in more or less half of the samples with a 65, 56, 56 and 48% of positives, respectively. Finally, deltamethrin/tralomethrin and phenothrin were found only in 27 and 17% of samples, respectively.

However, different patterns of distribution were observed for each species (Fig. 2), and they did not seem to vary with taxonomic Order. When examining the relation among different pyrethroids by Spearman correlation coefficient at $\alpha < 0.05$ (Table B Supporting information), all pyrethroids were related to the rest except for phenothrin. This could suggest that the source of contamination is the same for all pyrethroids. Doñana National Park is susceptible of contamination from small urban areas in the surroundings of the park and agricultural practices, such as farming of strawberries and rice (Tortosa et al., 2011). More information about the use of pyrethroids would be necessary in order to describe a relationship

between its dumping and bird bioaccumulation. Nonetheless, the presence of some pyrethroids like bifenthrin, whose agrarian use is banned (EC, 1991), supports the hypothesis that non-agricultural sectors could also contribute to the pyrethroid contamination in this area, or that the substance is still used illegally in the surrounding areas or farther ones during dispersal and migration. Although we should not forget specific properties of each pyrethroid. For instance, estimated DT_{50} values are longer than one year, and bifenthrin is reported as “not easily degradable” in water.

Correlations among single pyrethroid levels and isotopes were not always strong enough. This aspect made it difficult to relate pyrethroid accumulation to dietary habits and suggested that there were other aspects to control, such as habits during migration, number of eggs laid, etc. However, because diet is generally known to have an effect on bioaccumulation, we examine it more in detail below.

3.4. Pyrethroid levels vs years

Levels of pyrethroids for each species were tested through ANOVA ($p < 0.01$) in order to detect significant differences among campaigns. Significant annual variations were observed only for storks. In this species, mean concentration of total pyrethroids was $7.80 \text{ ng g lw}^{-1}$ for 2011 samples while it was of $62.1 \text{ ng g lw}^{-1}$ for 2012 ones. In order to understand the origin of this difference, we checked, with the same test conditions, the difference of stable isotopes ratios in white storks samples among the two campaigns. In this case, we could also see a significant difference among years when the $\delta^{13}\text{C}$ ratio was evaluated. Mean value for 2011 was higher than the one of 2012, being -24.24 and -22.84 , respectively. $\delta^{15}\text{N}$ mean ratios were 11.99 and 10.20, respectively, that meant that this isotope ratio decrease among that period, as well. However, a more marked difference ($p < 0.01$) between 2011 and 2012 for $\delta^{13}\text{C}$ than for $\delta^{15}\text{N}$ (only significant at $p < 0.05$) was observed. At this moment, authors cannot explain these facts. However, some factors could be related. Whereas general factors such as migration effects and nitrification of waters should not explain these differences given that it was expected to be the same in that period, other parameters such as age of parents or number of eggs laid could explain some deviation in some samples. However, it would be difficult to assure that they lead to a statistical change in isotopes ratio because they should not be so different between both campaigns. All this, made us to guess that this change in stable isotopes values could point out different punctual feeding habits, such as more contribution of anthropogenic food, and, given our results, this change could imply variation in exposure to pyrethroids.

For the other species there were no significant differences either in pyrethroid levels or stable isotopes among years.

3.5. Dietary effects

Given that the general correlations between isotopes and pyrethroid levels were not significant, we examined diet more in detail. Therefore, we conducted a multifactorial ANOVA among the four feeding guilds. Median levels of pyrethroids were 5.79 (range between 1.24 and 12.7), 9.47 (range between ND–110), 29.1 (range between 0.15 and 256) and 49.6 (range between ND–324) $\text{ng g}^{-1} \text{ lw}$ for herbivorous, terrestrial, aquatic and anthropogenic sources of food. Birds with anthropogenic feeding habits showed significantly higher levels of pyrethroids in their egg samples. This could indicate that the proximity to urban areas, and the interaction with human population and its waste products, increased the exposure of these birds to pyrethroids. This hypothesis supports the previous suggestion of a single source of pollution for all pyrethroids. This could also explain the second more polluted group was the aquatic

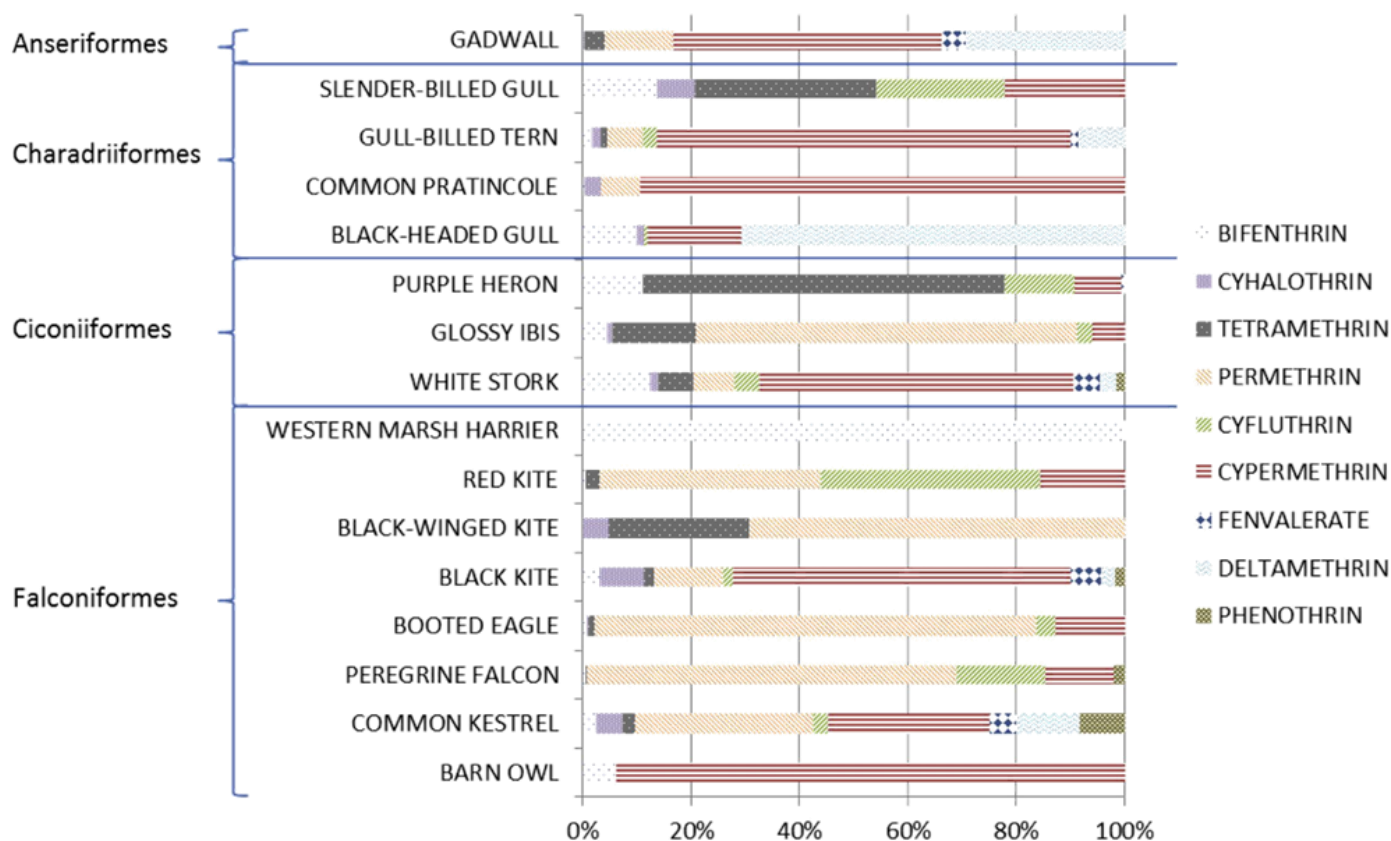


Fig. 2. Percentage (%) contribution (mean values) of each pyrethroid in each species.

one. The run-off from dumping areas could contaminate nearby aquatic ecosystems, most of which eventually drain into the seasonal marshes of Doñana, used by most species for feeding at some point of their annual cycle. In fact, a recent study in Iberian rivers demonstrated the presence of pyrethroids in their aquatic biota (Corcellas et al., 2015a). In this previous study, different aquatic species were analysed finding different levels in species from the same sample point. Therefore, different dietary habits should mean different pyrethroid intake even among species classified in the same group and belonging to the same ecosystem.

3.6. Isomeric and enantiomeric discussion

43 samples were selected to be analysed with the enantiomer-selective method. This methodology allowed us to characterize enantiomerically mixtures of bifenthrin, cyhalothrin, cypermethrin, cyfluthrin, permethrin and tetramethrin. The selected samples corresponded to different species from all three campaigns. Given that toxicology could depend on the enantiomeric mixture of the contaminant (Zhao et al., 2014; Jin et al., 2012), this characterization in wild bird eggs, conducted for the first time, was especially important. For example, *cis* isomer usually presents more toxicity for permethrin and cypermethrin in mice and rats (Jin et al., 2012; Lestremat et al., 2014; Liu et al., 2004). However, insecticide activity is higher in the *trans* 1S,3R-tetramethrin, demonstrating that the most toxic isomer depends on the pyrethroid and even the species studied (Shinjo et al., 1981). Besides, other studies have demonstrated that species from the same habitat may present different accumulation on pyrethroid isomers (Corcellas et al., 2015a). This could be explained by the fact that pyrethroids are usually metabolized by biota. Some pyrethroids are easily degraded by hydrolyzation of ester group or oxidation via cytochrome

P450 (Mikata et al., 2012). Depending on metabolic process some enzymatic catalyzation is enantio- or isomer-selective. However, it seemed not to be a complete biotransformation. Because of these different ways of metabolization and its substrate selectivity, a lot of patterns of isomer occurrence in biota were found and described in this work.

Isomeric results of both diastereoisomeric and enantiomeric analyses are summarized in Table C (Supporting information). Fig. 3 shows the general trend of enrichment of each isomer for the five studied pyrethroids. Our study showed that $R_{cis/trans}$ values were greater than 1 for permethrin and cypermethrin, implying that *cis* isomers were more accumulative than *trans* ones. This finding is in agreement with our previous work with other biota samples such as human breast milk and river fish (Corcellas et al., 2012, 2015a). Some authors have demonstrated that *cis* isomers are less metabolizable in mice and thus more toxic (Zhang et al., 2008). However, for tetramethrin, our bird egg samples showed ratios below 1 and always around 0.25. The same behaviour was observed in our previous work (Corcellas et al., 2015b), and is probably due to the fact that commercial mixtures are usually enriched in *trans*-tetramethrin. Concretely, *trans*-tetramethrin enantiomer (1R–3S-isomer) is enhanced in some common domestic insecticides because it is the enantiomer with more insecticide efficacy. Therefore, it is supposed that *trans*-tetramethrin could be released more frequently into environment. Type II pyrethroids have another isomeric ratio that could be of interest, the $R_{cis1/cis2}$. For both cypermethrin and cyhalothrin this ratio was very close to 1 (0.82 ± 0.22 and 0.91 ± 0.26 , respectively) indicating that there was no preference between both *cis* isomers. Only in the case of cypermethrin, gadwalls presented a $R_{cis1/cis2}$ value that indicated an enrichment of *cis2* isomers (0.58 ± 0.16).

Furthermore, we evaluated the enantiomeric factors.

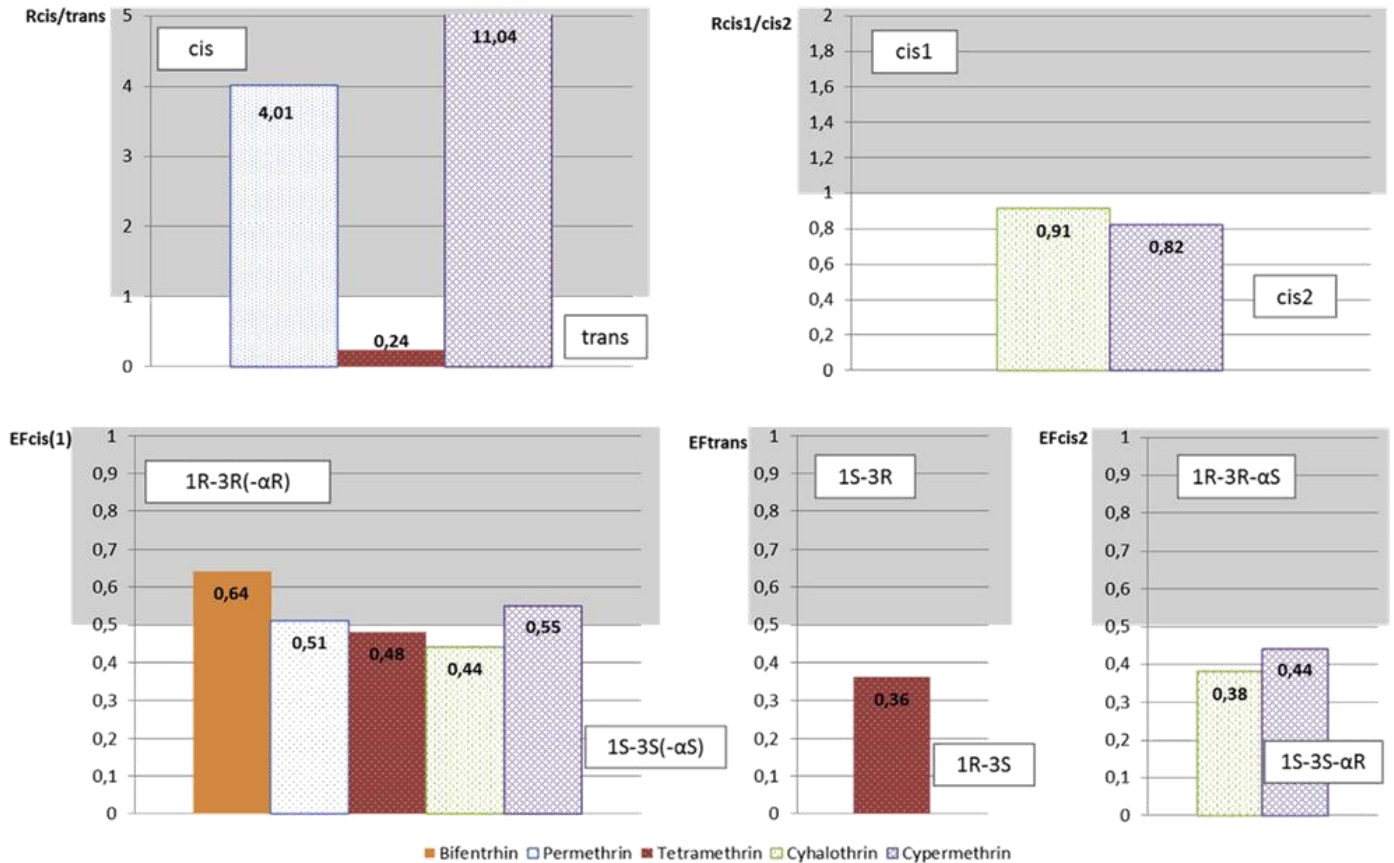


Fig. 3. Isomeric ratios ($R_{cis/trans}$ and $R_{cis1/cis2}$) and enantiomeric factors (EF_{cis} , EF_{cis1} , EF_{trans} and EF_{cis2}) of 5 pyrethroids in wild bird eggs. In all graphs the zone corresponding to the enrichment of each isomer is shadowed differently.

Pyrethroids of type I, permethrin and tetramethrin, showed a racemic mixture of *cis* enantiomers (median EF values were 0.51 ± 0.15 and 0.48 ± 0.13 , respectively) which means that there was no preference in accumulation of these enantiomers. However, there was one exception in the case of permethrin: for two species (black kites and black-headed gulls) EF_{cis} values were 0.63 ± 0.19 and 0.78 ± 0.02 respectively, indicating a selective accumulation of the second eluting enantiomer (*cis*-(1*S*,1*S*)-permethrin). Contrary, glossy ibis presented EF_{cis} values of 0.37 ± 0.03 , showing the opposite behaviour. On the other hand, bifenthrin presented a racemic mixture in white storks (0.53 ± 0.10) but a preference for the 1*S*,1*S*-enantiomer when black-headed gull and black kite species where studied ($EF_{cis} = 0.78$ and 0.68 ± 0.10 , respectively). Regarding EF_{trans} of tetramethrin, values in wild bird eggs were of 0.38 ± 0.08 , showing an enantiomeric-selective accumulation of the second eluting enantiomer, *trans*-(1*S*,1*R*)-tetramethrin. In Spanish human breast milk samples, an accumulation of the same tetramethrin enantiomer was described (Corcellas et al., 2015b).

Concerning type II pyrethroids, only EF of cyhalothrin and cypermethrin could be evaluated. Both EF_{cis1} values were close to 0.5 (0.44 ± 0.14 and 0.55 ± 0.09 respectively) showing no preference for any enantiomer. As regards EF_{cis2} , cypermethrin also showed no enantiomeric preference (0.44 ± 0.11), whereas cyhalothrin presented a slight preference for the second eluting enantiomer (0.38 ± 0.12). A similar selective enantiomeric-accumulation was observed in previous studies in biotic samples such as human breast milk (Corcellas et al., 2015b) and river fishes (Corcellas et al., 2015a).

Because of the results exposed here and those of previous studies, we conclude that, even if pyrethroid insecticides are very

commonly used, their safety has to be more studied. In this study, we analysed for the first time unhatched eggs from wild birds breeding in an ecologically important area, finding clear evidence for the accumulation of pyrethroids in wild terrestrial fauna, given a 93% of detection frequency in the sampled birds of 16 different species covering several different trophic guilds. Although pyrethroid levels may be due to an occasional exposure, we do not believe that, since our study includes samples of different species and different habitats (aqueous and terrestrial), and also includes some migratory species. Even when the observed levels (up to $324 \text{ ng g}^{-1} \text{ lw}$) were below acute toxicity limits, chronic exposure and toxicity have not been well described yet. Moreover, and depending upon metabolism and excretion rates, transfer rate to the eggs may be more or less high, so the dose ingested by the laying female may be high. Potential harmful effects on the offspring that hatch from eggs with high pyrethroid content must to be evaluated in order to determine whether this level of contamination could endanger some populations. Attempts have been made to find relationships between pyrethroid levels and parameters such as stable isotopes and feeding habits. These relations suggested anthropogenic factors (most probably food from garbage dumps and agricultural runoff) as the main source of high levels of pyrethroid contamination in the sampled avian species. Because of that we suggest awareness campaigns for the local population as a way to decrease pyrethroid contamination in this area. Additionally, some isomeric- and enantiomeric-selective accumulation was observed for some pyrethroids. More studies are necessary to understand the isomeric behaviour of these compounds given that toxicity depends on their enantiomeric characteristics.

Acknowledgments

This work was funded by the Spanish Ministry of Environment and Rural and Marine Affairs through the project IMPAR (Ref. 106/2010). This work has also been partly funded by the Generalitat de Catalunya (Consolidated Research Group “2014 SGR 418—Water and Soil Quality Unit”). Sampling of raptor eggs was funded by excellence project RNM-7307 of the Junta de Andalucía and CGL2011-28103 and CGL2015- 69445-P of the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness. We are grateful to the Doñana Biological Station Natural Processes Monitoring Team, especially Luis García, José Luis del Valle, Rubén Rodríguez, José Luis Arroyo, Antonio Martínez and Alfredo Chico, as well as to Javier Chicano, for their efforts to collect bird eggs. The authors also want to thank Renaud de Stephanis from the EBD-CSIC for the financial support with the stable isotope analysis.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data related to this article can be found at <http://dx.doi.org/10.1016/j.envpol.2017.05.035>.

References

- 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., Torres, J.P.M., Lailson-Brito, J., Malm, O., Eljarrat, E., Barceló, D., 2012. Pyrethroids: a new threat to marine mammals? *Environ. Int.* 47, 99–106.
- Alonso, M.B., Feo, M.L., Corcellas, C., Gago-Ferrero, P., Bertozzi, C.P., Marigo, J., Flach, L., Meirelles, A.C.O., Carvalho, V.L., Azevedo, A.F., Torres, J.P.M., Lailson-Brito, J., Malm, O., Eljarrat, E., Diaz-Cruz, M.S., Barceló, D., 2015. A poisonous cocktail for my baby: maternal transfer of pyrethroid insecticides and UV filters in dolphins from Brazil – Part 1. *Environ. Pollut.* 207, 391–402.
- Baron, E., Manez, M., Andreu, A.C., Sergio, F., Hiraldo, F., Eljarrat, E., Barceló, D., 2014. Bioaccumulation and biomagnification of emerging and classical flame retardants in bird eggs of 14 species from Donana Natural Space and surrounding areas (South-western Spain). *Environ. Int.* 68, 118–126.
- Barón, E., Giménez, J., Verborgh, P., Gauffier, P., De Stephanis, R., Eljarrat, E., Barceló, D., 2015. Bioaccumulation and biomagnification of classical flame retardants, related halogenated natural compounds and alternative flame retardants in three delphinids from Southern European waters. *Environ. Pollut.* 203, 107–115.
- Barr, D.B., Olsson, A.O., Wong, L.-Y., Udunka, S., Baker, S.E., Whitehead Jr., R.D., Magsumbol, M.S., Williams, B.L., Needham, L.L., 2010. Urinary concentrations of metabolites of pyrethroid insecticides in the general US population: National Health and Nutrition Examination Survey 1999–2002. *Environ. Health Perspect.* 118 (6), 742–748.
- Bro, E., Millot, F., Decors, A., Devillers, J., 2015. Quantification of potential exposure of gray partridge (*Perdix perdix*) to pesticide active substances in farmlands. *Sci. Total Environ.* 521, 315–325.
- Bro, E., Devillers, J., Millot, F., Decors, A., 2016. Residues of plant protection products in gray partridge eggs in French cereal ecosystems. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 23 (10), 9559–9573.
- Caron-Beaudoin, E., Gentes, M.L., Patenaude-Monette, M., Helie, J.F., Giroux, J.F., Verreault, J., 2013. Combined usage of stable isotopes and GPS-based telemetry to understand the feeding ecology of an omnivorous bird, the Ring-billed Gull (*Larus delawarensis*). *Can. J. Zoology-Revue Can. De Zoologie* 91 (10), 689–697.
- Cinzia, N., Manuel, C., Donatella, F., Rosita, G., Antonio, D.S., Cerasa, L.S., Isabel, S., Valentina, D., Roberto, C., 2013. Effects of early life permethrin exposure on spatial working memory and on monoamine levels in different brain areas of pre-senescent rats. *Toxicology* 303 (1), 162–168.
- Colabuono, F.L., Barquete, V., Taniguchi, S., Ryan, P.G., Montone, R.C., 2014. Stable isotopes of carbon and nitrogen in the study of organochlorine contaminants in albatrosses and petrels. *Mar. Pollut. Bull.* 83 (1), 241–247.
- Corcellas, C., Feo, M.L., Paulo Torres, J., Malm, O., Ocampo-Duque, W., Eljarrat, E., Barceló, D., 2012. Pyrethroids in human breast milk: occurrence and nursing daily intake estimation. *Environ. Int.* 47, 17–22.
- Corcellas, C., Eljarrat, E., Barceló, D., 2015. First report of pyrethroid bioaccumulation in wild river fish: a case study in Iberian river basins (Spain). *Environ. Int.* 75, 110–116.
- Corcellas, C., Eljarrat, E., Barceló, D., 2015. Enantiomeric-selective determination of pyrethroids: application to human samples. *Anal. Bioanal. Chem.* 407, 779–786.
- dell’Oro, D., Casamassima, F., Gesualdo, G., Iammarino, M., Mambelli, P., Nardelli, V., 2014. Determination of pyrethroids in chicken egg samples: development and validation of a confirmatory analytical method by gas chromatography/mass spectrometry. *Int. J. Food Sci. Technol.* 49 (5), 1391–1400.
- Demoute, J.P., 1989. A brief review of the environmental fate and metabolism of pyrethroids. *Pesticide Sci.* 27 (4), 375–385.
- dos Reis Souza, M.R., Moreira, C.O., de Lima, T.G., Aquino, A., Dorea, H.S., 2013. Validation of a matrix solid phase dispersion (MSPD) technique for determination of pesticides in lyophilized eggs of the chicken *Gallus gallus domesticus*. *Microchem. J.* 110, 395–401.
- EC, 1991. Council Directive 91/414/EEC of 15 July 1991 concerning the placing of plant protection products on the market. In: LC Eur 1991/1021. Vol. LC Eur 1991/1021.
- EPA, 2014. U. S. ECOTOX: Terrestrial Report (July of. <http://cfpub.epa.gov/ecotox/report.cfm?type=short>).
- Feo, M.L., Ginebreda, A., Eljarrat, E., Barceló, D., 2010. Presence of pyrethroid pesticides in water and sediments of Ebro River Delta. *J. Hydrology* 393 (3–4), 156–162.
- Feo, M.L., Eljarrat, E., Barceló, D., 2010. Determination of pyrethroid insecticides in environmental samples. *Trac-Trends Anal. Chem.* 29 (7), 692–705.
- Feo, M.L., Eljarrat, E., Barceló, D., 2011. Performance of gas chromatography/tandem mass spectrometry in the analysis of pyrethroid insecticides in environmental and food samples. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 25 (7), 869–876.
- Florin, S.T., Felicetti, L.A., Robbins, C.T., 2011. The biological basis for understanding and predicting dietary-induced variation in nitrogen and sulphur isotope ratio discrimination. *Funct. Ecol.* 25 (3), 519–526.
- Herzke, D., Kallenborn, R., Nygard, T., 2002. Organochlorines in egg samples from Norwegian birds of prey: congener-, isomer- and enantiomer specific considerations. *Sci. Total Environ.* 291 (1–3), 59–71.
- Jardine, T.D., Kidd, K.A., Fisk, A.T., 2006. Applications, considerations, and sources of uncertainty when using stable isotope analysis in ecotoxicology. *Environ. Sci. Technol.* 40 (24), 7501–7511.
- Jin, Y., Wang, L., Ruan, M., Liu, J., Yang, Y., Zhou, C., Xu, B., Fu, Z., 2011. Cypermethrin exposure during puberty induces oxidative stress and endocrine disruption in male mice. *Chemosphere* 84 (1), 124–130.
- Jin, Y., Liu, J., Wang, L., Chen, R., Zhou, C., Yang, Y., Liu, W., Fu, Z., 2012. Permethrin exposure during puberty has the potential to enantioselectively induce reproductive toxicity in mice. *Environ. Int.* 42, 144–151.
- Karnovsky, N.J., Hobson, K.A., Iverson, S.J., 2012. From lavage to lipids: estimating diets of seabirds. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 451, 263–284.
- Khan, A., Ahmad, L., Khan, M.Z., 2012. Hemato-biochemical changes induced by pyrethroid insecticides in avian, fish and mammalian species. *Int. J. Agric. Biol.* 14 (5), 834–842.
- Kuivila, K.M., Hladik, M.L., Ingersoll, C.G., Kemble, N.E., Moran, P.W., Calhoun, D.L., Nowell, L.H., Gilliom, R.J., 2012. Occurrence and potential sources of pyrethroid insecticides in stream sediments from seven U.S. Metropolitan areas. *Environ. Sci. Technol.* 46 (8), 4297–4303.
- Lestremay, F., Willemin, M.E., Chatellier, C., Desmots, S., Brochot, C., 2014. Determination of cis-permethrin, trans-permethrin and associated metabolites in rat blood and organs by gas chromatography-ion trap mass spectrometry. *Anal. Bioanal. Chem.* 406 (14), 3477–3487.
- Liu, W.P., Gan, J.J., Lee, S.J., Werner, I., 2004. Isomer selectivity in aquatic toxicity and biodegradation of cypermethrin. *J. Agric. Food Chem.* 52 (20), 6233–6238.
- McConnaughey, T., McRoy, C.P., 1979. Food-web structure and the fractionation of carbon isotopes in The Bering Sea. *Mar. Biol.* 53 (3), 257–262.
- Mikata, K., Isobe, N., Kaneko, H., 2012. Biotransformation and enzymatic reactions of synthetic pyrethroids in mammals. *Top. Curr. Chem.* 314, 113–135.
- Millot, F., Berny, P., Decors, A., Bro, E., 2015. Little field evidence of direct acute and short-term effects of current pesticides on the grey partridge. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 117, 41–61.
- Ostrea Jr., E.M., Bielawski, D.M., Posecion Jr., N.C., Corrión, M., Villanueva-Uy, E., Bernardo, R.C., Jin, Y., Janisse, J.J., Ager, J.W., 2009. Combined analysis of prenatal (maternal hair and blood) and neonatal (infant hair, cord blood and meconium) matrices to detect fetal exposure to environmental pesticides. *Environ. Res.* 109 (1), 116–122.
- Pendleton, F.N., Baldwin, A.H., 2007. The effects of spraying deltamethrin for tsetse fly control on insectivorous bird populations in the Okavango Delta, Botswana. *Afr. J. Ecol.* 45 (4), 566–576.
- Scollon, E.J., Starr, J.M., Godin, S.J., DeVito, M.J., Hughes, M.F., 2009. *in vitro* metabolism of pyrethroid pesticides by rat and human hepatic microsomes and cytochrome P450 isoforms. *Drug Metabolism Dispos.* 37 (1), 221–228.
- Sharma, A., Gill, J.P.S., Bedi, J.S., Pooni, P.A., 2014. Monitoring of pesticide residues in human breast milk from Punjab, India and its correlation with health associated parameters. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 93 (4), 465–471.
- Shinjo, G., Yamaguchi, T., Tsuda, S., Yoshida, K., Okuno, Y., 1981. A study on the insecticidal activity of d-tetramethrin. *Med. entomology zoology* 32 (3), 221–228.
- Tortosa, G., Correa, D., Juan Sanchez-Raya, A., Delgado, A., Sanchez-Monedero, M.A., Bedmar, E.J., 2011. Effects of nitrate contamination and seasonal variation on the denitrification and greenhouse gas production in La Rocina Stream (Donana National Park, SW Spain). *Ecol. Eng.* 37 (4), 539–548.
- UH, 2011. In: *Pesticide Properties DataBase*. University of Hertfordshire. <http://sitem.herts.ac.uk/aeru/footprint/index2.htm>.
- UNESCO.
- Voorspoels, S., Covaci, A., Jaspers, V.L.B., Neels, H., Schepens, P., 2007. Bio-magnification of PBDEs in three small terrestrial food chains. *Environ. Sci. Technol.* 41 (2), 411–416.
- Weston, D.P., Lydy, M.J., 2010. Urban and agricultural sources of pyrethroid insecticides to the Sacramento-San Joaquin delta of California. *Environ. Sci. Technol.* 44 (5), 1833–1840.

- Weston, D.P., Asbell, A.M., Lesmeister, S.A., Teh, S.J., Lydy, M.J., 2014. Urban and agricultural pesticide inputs to a critical habitat for the threatened delta smelt (*Hypomesus transpacificus*). *Environ. Toxicol. Chem.* 33 (4), 920–929.
- Xue, N.D., Xu, X.B., Jin, Z.L., 2005. Screening 31 endocrine-disrupting pesticides in water and surface sediment samples from Beijing Guanting reservoir. *Chemosphere* 61 (11), 1594–1606.
- Zhang, S.-Y., Ueyama, J., Ito, Y., Yanagiba, Y., Okamura, A., Kamijima, M., Nakajima, T., 2008. Permethrin may induce adult male mouse reproductive toxicity due to cis isomer not trans isomer. *Toxicology* 248 (2–3), 136–141.
- Zhao, M., Zhang, Y., Zhuang, S., Zhang, Q., Lu, C., Liu, W., 2014. Disruption of the hormonal Network and the enantioselectivity of bifenthrin in trophoblast: maternal-fetal health risk of chiral pesticides. *Environ. Sci. Technol.* 48 (14), 8109–8116.

Table A (Supporting information): Concentration levels (expressed in ng g⁻¹ lw) of pyrethroids in bird egg samples.

| SPECIES | BIFENTHRIN | CYHALOTHRIN | TETRAMETHRIN | PERMETHRIN | CIFLUTHRIN | CYPERMETHRIN | FENVALERATE | DELTAMETHRIN | FLUVALINATE | RESMETHRIN | PHENOTHRIN | FENPROPATHRIN | ΣPYR | d ¹³ C | d ¹⁵ N |
|-------------------------|------------|-------------|--------------|------------|------------|--------------|-------------|--------------|-------------|------------|------------|---------------|--------|-------------------|-------------------|
| Booted Eagle 1 | 0.04 | 0.03 | ND | 0.03 | 0.10 | 0.12 | 0.02 | ND | ND | ND | ND | ND | 0.33 | -25.11 | 8.91 |
| Booted Eagle 2 | ND | ND | 0.51 | 0.48 | ND | 0.07 | 0.02 | ND | ND | ND | ND | ND | 1.08 | -26.10 | 11.32 |
| Booted Eagle 3 | ND | ND | ND | ND | 3.57 | NQ | ND | ND | ND | ND | ND | ND | 3.57 | -24.40 | 10.24 |
| Booted Eagle 4 | ND | ND | ND | 108.56 | ND | 1.03 | ND | ND | ND | ND | ND | ND | 109.59 | -23.40 | 11.51 |
| Booted Eagle 5 | ND | 0.14 | ND | ND | ND | NQ | ND | ND | ND | ND | ND | ND | 0.14 | -24.55 | 13.30 |
| Booted Eagle 6 | 0.60 | 0.02 | ND | ND | 1.00 | 21.91 | ND | ND | ND | ND | ND | ND | 23.52 | -23.54 | 11.96 |
| Western marsh harrier 1 | 4.88 | ND | ND | ND | ND | NQ | ND | ND | ND | ND | ND | ND | 4.88 | -23.86 | 14.98 |
| Common pratincole 1 | 0.06 | 0.51 | ND | 1.29 | ND | 15.94 | ND | ND | ND | ND | ND | ND | 17.80 | -23.81 | 12.70 |
| Common kestrel 1 | 0.04 | ND | 0.20 | 1.11 | ND | 0.46 | ND | ND | ND | ND | 1.67 | ND | 3.47 | - | - |
| Common kestrel 2 | ND | ND | ND | 0.94 | ND | 0.68 | ND | ND | ND | ND | ND | ND | 1.62 | - | - |
| Common kestrel 3 | 0.02 | 0.01 | 0.32 | 3.01 | ND | 0.03 | ND | ND | ND | ND | ND | ND | 3.39 | -23.18 | 13.61 |
| Common kestrel 4 | ND | ND | 0.15 | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND | 0.15 | -23.46 | 13.15 |
| Common kestrel 5 | ND | ND | 0.19 | ND | 0.01 | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND | 0.20 | -23.01 | 11.53 |
| Common kestrel 6 | 0.04 | 0.02 | 0.01 | 0.19 | ND | 0.01 | ND | ND | ND | ND | ND | ND | 0.26 | - | - |
| Common kestrel 7 | ND | 0.06 | ND | ND | 0.97 | NQ | 1.09 | ND | ND | ND | ND | ND | 2.12 | -23.75 | 8.91 |
| Common kestrel 8 | ND | ND | ND | ND | ND | NQ | 0.66 | ND | ND | ND | ND | ND | 0.66 | -23.60 | 8.77 |
| Common kestrel 9 | ND | ND | 0.35 | ND | ND | NQ | ND | ND | ND | ND | ND | ND | 0.35 | -23.45 | 12.46 |
| Common kestrel 10 | 1.35 | 0.80 | 0.00 | 2.78 | 0.61 | 24.10 | 0.99 | 2.19 | ND | ND | ND | ND | 32.82 | -24.20 | 12.48 |
| Common kestrel 11 | ND | ND | ND | ND | ND | NQ | 0.93 | ND | ND | ND | ND | ND | 0.93 | -23.91 | 11.69 |
| Common kestrel 12 | ND | ND | ND | ND | ND | NQ | 0.95 | ND | ND | ND | ND | ND | 0.95 | -22.38 | 7.96 |
| Common kestrel 13 | ND | ND | ND | 32.16 | ND | NQ | ND | ND | ND | ND | ND | ND | 32.16 | -23.13 | 13.56 |
| Common kestrel 14 | ND | 1.93 | ND | ND | ND | NQ | 1.05 | ND | ND | ND | ND | ND | 2.98 | -23.04 | 11.60 |
| Common kestrel 15 | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND | 0.00 | - | - |
| Common kestrel 16 | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND | 0.00 | -24.28 | 12.05 |
| Common kestrel 17 | ND | ND | ND | 5.80 | ND | 6.51 | ND | ND | ND | ND | ND | ND | 12.31 | -22.26 | 13.37 |

| | | | | | | | | | | | | | | | |
|-------------------|-------|------|-------|------|------|-------|------|------|----|----|------|----|--------|--------|-------|
| Common kestrel 18 | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND | 0.00 | -22.62 | 12.63 |
| Common kestrel 19 | ND | 2.16 | 1.06 | ND | ND | NQ | 1.03 | ND | ND | ND | ND | ND | 4.25 | -23.99 | 9.53 |
| Common kestrel 20 | ND | ND | 1.18 | 4.76 | ND | NQ | ND | ND | ND | ND | ND | ND | 5.94 | -24.09 | 8.92 |
| Common kestrel 21 | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND | 0.00 | -24.29 | 8.58 |
| Common kestrel 22 | ND | ND | 0.40 | ND | ND | 4.25 | ND | ND | ND | ND | ND | ND | 4.65 | -23.73 | 11.44 |
| Common kestrel 23 | 0.76 | 1.60 | ND | ND | ND | 10.00 | 1.01 | ND | ND | ND | ND | ND | 13.37 | -23.41 | 11.45 |
| Common kestrel 24 | ND | ND | 0.71 | ND | ND | NQ | ND | ND | ND | ND | ND | ND | 0.71 | -22.88 | 11.29 |
| White stork 1 | 13.93 | 1.46 | ND | ND | 3.14 | 64.75 | 2.98 | ND | ND | ND | ND | ND | 86.26 | -21.80 | 9.38 |
| White stork 2 | 14.94 | 1.25 | ND | ND | 3.39 | 60.61 | 3.15 | ND | ND | ND | ND | ND | 83.34 | -22.09 | 8.84 |
| White stork 3 | 18.66 | 1.52 | ND | ND | 4.99 | 78.09 | 4.37 | ND | ND | ND | ND | ND | 107.63 | -21.55 | 9.04 |
| White stork 4 | 24.64 | 2.09 | 7.32 | ND | 2.93 | 90.20 | 3.59 | 9.08 | ND | ND | ND | ND | 139.84 | -22.18 | 8.81 |
| White stork 5 | 0.23 | 0.76 | 1.61 | ND | 3.89 | 34.00 | 3.11 | ND | ND | ND | ND | ND | 43.60 | -23.90 | 11.78 |
| White stork 6 | 2.85 | 0.69 | ND | ND | 4.57 | NQ | 4.21 | ND | ND | ND | ND | ND | 12.32 | -23.34 | 10.48 |
| White stork 7 | 2.72 | 0.59 | ND | ND | 7.07 | NQ | 2.61 | ND | ND | ND | ND | ND | 12.98 | -23.34 | 10.94 |
| White stork 8 | 5.87 | 0.70 | 22.94 | ND | 1.02 | 28.72 | 1.12 | ND | ND | ND | ND | ND | 60.37 | -22.90 | 9.62 |
| White stork 9 | 6.53 | 0.53 | 5.62 | ND | ND | NQ | 7.05 | ND | ND | ND | ND | ND | 19.73 | -23.44 | 12.37 |
| White stork 10 | 7.60 | 1.25 | ND | ND | 1.30 | 42.80 | 1.95 | ND | ND | ND | ND | ND | 54.90 | -23.88 | 10.71 |
| White stork 11 | 0.76 | 0.09 | 0.55 | 2.61 | 0.18 | 1.47 | 0.12 | 0.20 | ND | ND | 0.41 | ND | 6.40 | -24.37 | 9.13 |
| White stork 12 | 2.32 | 0.18 | 0.36 | 1.62 | 1.18 | 0.67 | 0.05 | 0.18 | ND | ND | ND | ND | 6.56 | -24.17 | 12.14 |
| White stork 13 | 0.52 | 0.09 | 0.97 | 3.12 | 0.10 | 1.85 | 0.13 | 0.32 | ND | ND | 1.51 | ND | 8.61 | -23.79 | 10.27 |
| White stork 14 | 0.36 | 0.20 | 0.46 | 3.16 | 0.17 | 9.52 | 0.08 | 0.25 | ND | ND | 0.62 | ND | 14.83 | -25.10 | 11.60 |
| White stork 15 | 0.34 | 0.05 | 0.03 | 2.39 | 0.13 | 1.63 | 0.14 | 0.07 | ND | ND | 0.46 | ND | 5.25 | - | - |
| White stork 16 | 0.68 | 0.15 | 0.21 | 3.85 | 2.20 | 3.01 | 0.13 | ND | ND | ND | ND | ND | 10.23 | -24.71 | 14.28 |
| White stork 17 | 0.76 | 0.35 | 0.27 | 6.69 | 0.02 | 7.28 | 6.64 | 0.29 | ND | ND | 0.80 | ND | 23.09 | -22.18 | 8.96 |
| White stork 18 | 0.23 | 0.03 | 0.50 | 2.76 | 0.14 | 0.91 | 0.06 | 0.10 | ND | ND | ND | ND | 4.72 | -23.79 | 11.90 |
| White stork 19 | 0.37 | 0.06 | 0.31 | 4.34 | 0.33 | 2.18 | 0.53 | 0.15 | ND | ND | 0.72 | ND | 8.98 | -24.79 | 13.20 |
| White stork 20 | 0.42 | 0.03 | 0.40 | 2.67 | 0.15 | 1.18 | 0.50 | ND | ND | ND | 0.37 | ND | 5.72 | -25.00 | 12.80 |

| | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----------------------|-------|------|------|-------|------|-------|------|--------|----|----|------|----|--------|--------|-------|
| White stork 21 | 0.27 | 0.03 | 0.06 | 0.67 | 0.42 | 1.01 | 0.10 | ND | ND | ND | ND | ND | 2.57 | -23.32 | 13.01 |
| White stork 22 | 0.06 | 0.01 | 0.11 | 0.34 | ND | 0.26 | 0.01 | 0.04 | ND | ND | ND | ND | 0.84 | -24.07 | 13.00 |
| White stork 23 | 0.15 | 0.02 | 0.17 | 1.94 | 0.06 | 1.06 | 0.06 | ND | ND | ND | 0.19 | ND | 3.66 | -25.53 | 13.61 |
| Black-winged kite 1 | ND | 0.21 | ND | 2.56 | ND | NQ | ND | ND | ND | ND | ND | ND | 2.77 | -23.82 | 8.95 |
| Black-winged kite 2 | ND | 0.14 | 0.96 | ND | ND | NQ | ND | ND | ND | ND | ND | ND | 1.10 | -24.27 | 14.12 |
| Glossy ibis 1 | ND | ND | 0.12 | ND | 0.06 | 0.04 | 0.01 | ND | ND | ND | ND | ND | 0.24 | -29.14 | 11.61 |
| Glossy ibis 2 | 0.31 | ND | ND | 0.00 | 0.43 | 0.32 | 0.02 | ND | ND | ND | ND | ND | 1.08 | -27.09 | 13.80 |
| Glossy ibis 3 | 0.15 | ND | 2.67 | ND | 0.32 | ND | 0.01 | ND | ND | ND | ND | ND | 3.15 | -27.65 | 12.70 |
| Slender-billed gull 1 | 0.53 | ND | 3.20 | ND | ND | NQ | ND | ND | ND | ND | ND | ND | 3.73 | -18.87 | 12.37 |
| Slender-billed gull 2 | 2.40 | ND | ND | ND | ND | 2.14 | ND | ND | ND | ND | ND | ND | 4.53 | -18.61 | 11.51 |
| Slender-billed gull 3 | 1.83 | 0.67 | ND | ND | 2.26 | NQ | ND | ND | ND | ND | ND | ND | 4.75 | -17.36 | 13.83 |
| Slender-billed gull 4 | 0.40 | ND | ND | ND | ND | NQ | ND | ND | ND | ND | ND | ND | 0.40 | -16.58 | 12.66 |
| Black-headed gull 1 | 39.87 | 1.40 | ND | ND | ND | 56.88 | ND | 53.75 | ND | ND | ND | ND | 151.90 | -19.05 | 9.47 |
| Black-headed gull 2 | 12.18 | 1.50 | ND | ND | ND | 10.94 | ND | 50.27 | ND | ND | ND | ND | 74.88 | -18.08 | 9.92 |
| Black-headed gull 3 | ND | ND | ND | ND | ND | NQ | ND | ND | ND | ND | ND | ND | 0.00 | -17.51 | 11.42 |
| Black-headed gull 4 | 12.35 | 1.36 | ND | ND | 1.07 | 15.77 | ND | 42.02 | ND | ND | ND | ND | 72.56 | -17.57 | 13.43 |
| Black-headed gull 5 | 12.71 | 3.53 | ND | ND | 1.28 | 34.48 | ND | 262.69 | ND | ND | ND | ND | 314.69 | -17.62 | 10.22 |
| Black-headed gull 6 | 12.22 | 3.88 | ND | ND | 1.59 | 37.35 | ND | 269.18 | ND | ND | ND | ND | 324.22 | -18.02 | 11.39 |
| Black-headed gull 7 | 6.38 | ND | ND | ND | ND | 11.94 | ND | 14.08 | ND | ND | ND | ND | 32.39 | -23.49 | 13.43 |
| Peregrine falcon 1 | 0.08 | 0.01 | 0.05 | 12.98 | 3.15 | 2.42 | ND | ND | ND | ND | 0.42 | ND | 19.12 | -20.20 | 11.76 |
| Barn Owl 1 | 0.33 | ND | ND | ND | ND | 5.12 | ND | ND | ND | ND | ND | ND | 5.45 | -25.46 | 10.87 |
| Black kite 1 | 0.36 | 0.04 | 0.04 | 2.36 | 0.69 | 0.67 | ND | ND | ND | ND | 0.37 | ND | 4.53 | -18.30 | 13.94 |
| Black kite 2 | 0.45 | 5.83 | 0.30 | 2.25 | 0.04 | 2.80 | 0.05 | 0.13 | ND | ND | 1.97 | ND | 13.81 | -23.47 | 12.14 |
| Black kite 3 | 0.23 | 0.13 | ND | 3.47 | ND | 0.53 | ND | ND | ND | ND | ND | ND | 4.36 | -22.88 | 11.20 |
| Black kite 4 | 0.10 | 0.71 | 0.10 | 2.33 | 0.02 | 1.96 | 0.15 | 0.12 | ND | ND | 1.21 | ND | 6.69 | -22.33 | 14.13 |
| Black kite 5 | 0.55 | 0.75 | 0.21 | 6.21 | 0.01 | 1.89 | 0.23 | 0.39 | ND | ND | ND | ND | 10.25 | -24.14 | 14.98 |
| Black kite 6 | 6.23 | 4.53 | 1.12 | 33.76 | 6.41 | 88.78 | 6.79 | ND | ND | ND | ND | ND | 147.63 | -21.71 | 10.48 |

| | | | | | | | | | | | | | | | |
|--------------------|------|-------|------|-------|------|--------|-------|------|----|----|----|----|--------|--------|-------|
| Black kite 7 | 4.45 | 3.80 | 0.00 | 22.36 | 0.00 | 67.01 | 1.39 | ND | ND | ND | ND | ND | 99.01 | -22.26 | 11.20 |
| Black kite 8 | 6.09 | 4.10 | 1.20 | 0.00 | 0.00 | 38.93 | 1.41 | ND | ND | ND | ND | ND | 51.74 | -22.43 | 9.26 |
| Black kite 9 | 1.47 | 0.62 | 0.27 | 3.21 | ND | 38.29 | 2.52 | ND | ND | ND | ND | ND | 46.37 | -23.26 | 11.98 |
| Black kite 10 | 1.14 | 1.10 | ND | ND | ND | 14.42 | ND | ND | ND | ND | ND | ND | 16.66 | -22.82 | 13.61 |
| Black kite 11 | 0.09 | 56.65 | 3.34 | ND | ND | 15.32 | ND | ND | ND | ND | ND | ND | 75.39 | -22.41 | 11.81 |
| Black kite 12 | ND | ND | ND | ND | ND | NQ | ND | ND | ND | ND | ND | ND | 0.00 | -23.76 | 9.96 |
| Black kite 13 | ND | ND | 1.13 | ND | ND | NQ | 2.13 | ND | ND | ND | ND | ND | 3.26 | -23.31 | 13.34 |
| Black kite 14 | 3.78 | 2.62 | ND | ND | ND | 66.40 | 0.75 | ND | ND | ND | ND | ND | 73.55 | -21.40 | 11.60 |
| Black kite 15 | 0.37 | 0.32 | 0.84 | 1.98 | ND | 16.48 | 1.74 | ND | ND | ND | ND | ND | 21.73 | -22.58 | 11.82 |
| Black kite 16 | 0.92 | 0.95 | 0.68 | 1.57 | ND | 171.47 | 19.42 | 2.79 | ND | ND | ND | ND | 197.80 | -21.52 | 10.09 |
| Black kite 17 | 1.67 | 0.26 | 6.20 | 9.91 | ND | 29.43 | ND | 3.81 | ND | ND | ND | ND | 51.28 | -23.04 | 10.99 |
| Black kite 18 | 0.47 | 0.38 | 0.42 | 8.20 | ND | 37.87 | ND | ND | ND | ND | ND | ND | 47.33 | -21.63 | 8.51 |
| Black kite 19 | 1.55 | 0.56 | ND | ND | ND | NQ | ND | ND | ND | ND | ND | ND | 2.10 | -21.58 | 10.75 |
| Black kite 20 | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND | -23.36 | 8.27 |
| Red kite 1 | ND | ND | ND | 5.79 | 5.79 | 2.25 | ND | ND | ND | ND | ND | ND | 13.84 | -22.89 | 13.37 |
| Red kite 2 | 0.07 | ND | 0.36 | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND | 0.44 | -23.47 | 13.00 |
| Purple heron 1 | 0.24 | 0.03 | 0.42 | 3.85 | 0.04 | 0.40 | ND | ND | ND | ND | ND | ND | 4.97 | -24.42 | 13.12 |
| Purple heron 2 | ND | ND | 1.29 | 0.59 | 0.07 | 0.10 | ND | ND | ND | ND | ND | ND | 2.05 | -26.21 | 16.22 |
| Purple heron 3 | ND | 0.03 | 0.22 | ND | 0.03 | 0.08 | ND | ND | ND | ND | ND | ND | 0.36 | - | - |
| Purple heron 4 | 0.04 | ND | ND | ND | 0.11 | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND | 0.15 | - | - |
| Purple heron 5 | 0.15 | 0.02 | 0.02 | ND | 0.20 | ND | ND | ND | ND | ND | ND | ND | 0.40 | - | - |
| Gull-billed tern 1 | 1.72 | ND | ND | ND | ND | 57.84 | ND | ND | ND | ND | ND | ND | 59.56 | -22.88 | 12.80 |
| Gull-billed tern 2 | ND | 2.88 | ND | ND | ND | 14.48 | ND | ND | ND | ND | ND | ND | 17.36 | -23.73 | 11.12 |
| Gull-billed tern 3 | 0.79 | 1.35 | 0.53 | ND | 2.32 | 5.71 | 1.05 | ND | ND | ND | ND | ND | 11.74 | -22.96 | 14.20 |
| Gull-billed tern 4 | 0.53 | 0.66 | ND | ND | 1.86 | 18.57 | 1.97 | ND | ND | ND | ND | ND | 23.59 | -22.59 | 15.40 |
| Gull-billed tern 5 | 2.97 | 1.46 | 0.56 | 5.25 | 2.26 | 55.12 | 1.03 | 6.84 | ND | ND | ND | ND | 75.48 | -23.68 | 13.17 |
| Gull-billed tern 6 | 1.93 | ND | ND | ND | 4.23 | 11.68 | 1.00 | ND | ND | ND | ND | ND | 18.85 | -23.23 | 14.21 |

| | | | | | | | | | | | | | | | |
|---------------------|------|------|------|------|------|--------|------|------|----|----|----|----|--------|--------|-------|
| Gull-billed tern 7 | 0.63 | ND | 1.16 | ND | 0.61 | NQ | ND | ND | ND | ND | ND | ND | 2.40 | -22.51 | 16.03 |
| Gull-billed tern 8 | 2.83 | 0.80 | ND | ND | 2.81 | 249.08 | 0.52 | ND | ND | ND | ND | ND | 256.04 | -22.11 | 12.34 |
| Gull-billed tern 9 | 0.19 | 0.66 | 1.53 | ND | 0.56 | 132.54 | 1.84 | ND | ND | ND | ND | ND | 133.02 | -23.66 | 15.31 |
| Gull-billed tern 10 | 0.79 | ND | ND | ND | 1.08 | 10.47 | 0.68 | ND | ND | ND | ND | ND | 13.03 | -23.92 | 15.07 |
| Gadwall 1 | ND | ND | 0.29 | ND | ND | 12.42 | ND | ND | ND | ND | ND | ND | 12.71 | -18.42 | 15.85 |
| Gadwall 2 | ND | ND | 1.21 | 1.87 | ND | 6.58 | ND | ND | ND | ND | ND | ND | 9.66 | -17.86 | 14.64 |
| Gadwall 3 | ND | 0.01 | ND | ND | ND | 4.77 | 0.45 | 2.66 | ND | ND | ND | ND | 7.88 | -20.46 | 13.04 |
| Gadwall 4 | ND | ND | 0.02 | ND | ND | ND | ND | 2.14 | ND | ND | ND | ND | 2.16 | -20.20 | 14.51 |
| Gadwall 5 | ND | 0.01 | 0.21 | ND | ND | 2.93 | ND | ND | ND | ND | ND | ND | 3.16 | -16.05 | 14.54 |
| Gadwall 6 | ND | ND | ND | 1.43 | ND | NQ | ND | 5.12 | ND | ND | ND | ND | 6.55 | -20.15 | 14.59 |
| Gadwall 7 | ND | ND | 0.63 | 0.45 | ND | 0.92 | ND | ND | ND | ND | ND | ND | 2.00 | -16.72 | 15.70 |
| Gadwall 8 | ND | 0.02 | 0.15 | ND | ND | 1.68 | ND | 1.89 | ND | ND | ND | ND | 3.73 | -19.20 | 14.04 |
| Gadwall 9 | ND | 0.02 | 0.38 | ND | ND | 4.47 | ND | ND | ND | ND | ND | ND | 4.87 | -20.07 | 13.00 |
| Gadwall 10 | ND | 0.02 | 0.22 | ND | ND | 6.66 | ND | ND | ND | ND | ND | ND | 6.90 | -20.92 | 13.32 |
| Gadwall 11 | ND | 0.03 | 0.43 | ND | ND | 5.26 | ND | ND | ND | ND | ND | ND | 5.72 | -16.55 | 15.68 |
| Gadwall 12 | ND | 0.02 | 0.35 | ND | ND | 8.25 | ND | ND | ND | ND | ND | ND | 8.62 | -19.14 | 14.81 |
| Gadwall 13 | ND | 0.03 | ND | ND | ND | 1.21 | ND | ND | ND | ND | ND | ND | 1.24 | -19.25 | 16.63 |

Table B (Supporting information): Spearman correlations among different pyrethroids and stable isotopes.

| | | Correlations | | | | | | | | | | | |
|-----------------------|-------------------------|-------------------------|-------------|--------------|------------|------------|--------------|-------------|--------------|------------|-----------------------|-----------------------|----------|
| | | Bifenthrin | Cyhalothrin | Tetramethrin | Permethrin | Cyfluthrin | Cypermethrin | Fenvalerate | Deltamethrin | Phenothrin | $\delta^{13}\text{C}$ | $\delta^{15}\text{N}$ | |
| Spearman's Rho | Bifenthrin | Correlation coefficient | 1.000 | 0.648** | 0.510** | 0.571** | 0.655** | 0.650** | 0.657** | 0.913** | 0.066 | 0.388** | -0.350** |
| | | N | 77 | 65 | 42 | 35 | 49 | 65 | 46 | 23 | 13 | 72 | 72 |
| | Cyhalothrin | Correlation coefficient | | 1.000 | 0.611** | 0.309 | 0.532** | 0.680** | 0.491** | 0.531** | 0.776** | 0.099 | -0.374** |
| | | N | | 81 | 46 | 34 | 45 | 69 | 45 | 25 | 12 | 77 | 77 |
| | Tetramethrin | Correlation coefficient | | | 1.000 | 0.185 | 0.420* | 0.486** | 0.389* | 0.525* | 0.231 | -0.061 | -0.285* |
| | | N | | | 65 | 36 | 33 | 51 | 34 | 18 | 13 | 60 | 60 |
| | Permethrin | Correlation coefficient | | | | 1.000 | 0.437* | 0.551** | 0.625** | 0.368 | -0.088 | 0.193 | -0.192 |
| | | N | | | | 48 | 26 | 42 | 25 | 17 | 13 | 44 | 44 |
| | Cyfluthrin | Correlation coefficient | | | | | 1.000 | 0.668** | 0.651** | 0.586* | -0.503 | 0.490** | -0.150 |
| | | N | | | | | 56 | 46 | 38 | 17 | 12 | 51 | 51 |
| | Cypermethrin | Correlation coefficient | | | | | | 1.000 | 0.771** | 0.805** | 0.390 | 0.343** | -0.317** |
| | | N | | | | | | 89 | 45 | 25 | 13 | 84 | 84 |
| | Fenvalerate | Correlation coefficient | | | | | | | 1.000 | 0.725** | 0.018 | 0.571** | -0.319* |
| | | N | | | | | | | 56 | 17 | 10 | 55 | 55 |
| | Deltamethrin | Correlation coefficient | | | | | | | | 1.000 | 0.143 | 0.699** | -0.189 |
| | | N | | | | | | | | 27 | 8 | 26 | 26 |
| | Phenothrin | Correlation coefficient | | | | | | | | | 1.000 | 0.245 | -0.273 |
| | | N | | | | | | | | | 13 | 11 | 11 |
| | $\delta^{13}\text{C}$ | Correlation coefficient | | | | | | | | | | 1.000 | 0.094 |
| | | N | | | | | | | | | | 115 | 115 |
| $\delta^{15}\text{N}$ | Correlation coefficient | | | | | | | | | | | 1.000 | |
| | N | | | | | | | | | | | 115 | |

** . Significant correlation at level 0.01 (2tales).

*. Significant correlation at level 0.05 (2 tales).

Table C (Supporting information): Summary of isomeric results.

| Pyrethroid | Parameter | Species | N | Mean | Standard Deviation |
|-------------|------------------------|--------------------|----|------|--------------------|
| Bifenthrin | EF _{cis} | White stork | 3 | 0.53 | 0.10 |
| | | Black-headed gull | 1 | 0.78 | . |
| | | Black kite | 4 | 0.68 | 0.10 |
| | | <i>All samples</i> | 8 | 0.64 | 0.13 |
| Cyhalothrin | R _{cis1/cis2} | White stork | 0 | . | . |
| | | Black kite | 5 | 0.91 | 0.26 |
| | | <i>All samples</i> | 5 | 0.91 | 0.26 |
| | EF _{cis1} | White stork | 0 | . | . |
| | | Black kite | 5 | 0.44 | 0.14 |
| | | <i>All samples</i> | 5 | 0.44 | 0.14 |
| | EF _{cis2} | White stork | 2 | 0.29 | 0.11 |
| | | Black kite | 5 | 0.42 | 0.11 |
| | | <i>All samples</i> | 7 | 0.38 | 0.12 |
| Permethrin | R _{cis/trans} | Gull-billed tern | 1 | 1.28 | . |
| | | Gadwall | 6 | 2.60 | 0.86 |
| | | White stork | 2 | 4.29 | 4.65 |
| | | Black-headed gull | 1 | 6.80 | . |
| | | Black kite | 5 | 9.36 | 9.47 |
| | | Peregrine falcon | 1 | 1.28 | . |
| | | Common krestel | 3 | 2.65 | 1.10 |
| | | Glossy ibis | 5 | 1.61 | 0.21 |
| | | <i>All samples</i> | 24 | 4.01 | 5.10 |
| | EF _{cis} | Gull-billed tern | 1 | 0.48 | . |
| | | Gadwall | 6 | 0.48 | 0.06 |
| | | White stork | 2 | 0.53 | 0.13 |
| | | Black-headed gull | 2 | 0.78 | 0.02 |
| | | Black kite | 5 | 0.63 | 0.19 |
| | | Peregrine falcon | 1 | 0.51 | . |
| | | Common krestel | 3 | 0.46 | 0.08 |
| | | <i>All samples</i> | 25 | 0.51 | 0.15 |

Table C (Supporting information): Summary of isomeric results (continuació).

| Pyrethroid | Parameter | Species | N | Mean | Standard Deviation |
|--------------------|------------------------|------------------------|------------------|-------|--------------------|
| Cypermethrin | R _{cis/trans} | Gull-billed tern | 1 | 2.05 | . |
| | | Gadwall | 6 | 5.57 | 2.62 |
| | | White stork | 3 | 8.17 | 5.75 |
| | | Black-headed gull | 2 | 14.47 | 0.90 |
| | | Black kite | 5 | 19.75 | 13.86 |
| | | <i>All samples</i> | 17 | 11.04 | 9.87 |
| | | R _{cis1/cis2} | Gull-billed tern | 1 | 0.97 |
| | Gadwall | | 6 | 0.58 | 0.16 |
| | White stork | | 4 | 0.93 | 0.08 |
| | Black-headed gull | | 2 | 0.87 | 0.26 |
| | Black kite | | 5 | 0.91 | 0.16 |
| | Peregrine falcon | | 1 | 1.15 | . |
| | <i>All samples</i> | | 19 | 0.82 | 0.22 |
| | EF _{cis1} | Gull-billed tern | 1 | 0.49 | . |
| | | Gadwall | 6 | 0.51 | 0.07 |
| | | White stork | 4 | 0.59 | 0.11 |
| | | Black-headed gull | 2 | 0.49 | 0.02 |
| | | Black kite | 5 | 0.62 | 0.05 |
| | | Peregrine falcon | 1 | 0.48 | . |
| | | <i>All samples</i> | 19 | 0.55 | 0.09 |
| | EF _{cis2} | Gull-billed tern | 1 | 0.42 | . |
| | | Gadwall | 6 | 0.37 | 0.07 |
| | | White stork | 4 | 0.38 | 0.04 |
| | | Black-headed gull | 2 | 0.43 | 0.04 |
| Black kite | | 5 | 0.60 | 0.06 | |
| Peregrine falcon | | 1 | 0.44 | . | |
| <i>All samples</i> | | 19 | 0.44 | 0.11 | |
| Tetramethrin | R _{cis/trans} | White stork | 8 | 0.25 | 0.05 |
| | | Black kite | 2 | 0.20 | 0.03 |
| | | Common krestel | 3 | 0.25 | 0.04 |
| | | Booted eagle | 1 | 0.26 | . |
| | | Glossy ibis | 5 | 0.22 | 0.03 |
| | | Purple heron | 1 | 0.20 | . |
| | | <i>All samples</i> | 20 | 0.24 | 0.05 |
| | EF _{cis} | White stork | 7 | 0.42 | 0.20 |
| | | Black kite | 4 | 0.41 | 0.18 |
| | | Common krestel | 3 | 0.49 | 0.05 |
| | | Booted eagle | 1 | 0.46 | . |
| | | Glossy ibis | 5 | 0.55 | 0.04 |
| | | Purple heron | 1 | 0.61 | . |
| | | <i>All samples</i> | 19 | 0.48 | 0.13 |
| | EF _{trans} | Gadwall | 1 | 0.35 | . |
| | | White stork | 8 | 0.38 | 0.04 |
| | | Black kite | 3 | 0.39 | 0.01 |
| | | Common krestel | 4 | 0.39 | 0.02 |
| | | Booted eagle | 1 | 0.36 | . |
| | | Glossy ibis | 5 | 0.37 | 0.02 |
| | | Purple heron | 1 | 0.40 | . |
| | <i>All samples</i> | 24 | 0.36 | 0.08 | |

4.2.2 Anàlisi de mostres de l'Antàrtida

Mostreig i mètodes.

Al 2013 es varen recollir mostres d'animals morts de l'Antàrtida, concretament de elefants marins i de llops marins. D'aquestes dues espècies es tenien mostres del sistema nerviós, de greix corporal i de greix de l'aleta. El grup de la Universitat de Rio de Janeiro ens va cedir 11 d'aquestes mostres per comprovar la presència de piretroides. La [Taula 4.1](#) descriu les mostres analitzades.

Taula 4.1: Mostres d'animals de l'Antàrtida analitzades.

| Espècie | Sistema nerviós | Greix | Greix de l'aleta | TOTAL |
|----------------------------------|-----------------|----------|------------------|-----------|
| Elefant marí | 4 | 2 | 1 | 7 |
| Llop marí | 3 | 1 | 0 | 4 |
| Total mostres analitzades | 7 | 3 | 1 | 11 |

Per tal d'analitzar-les es van tractar igual que d'altres matrius similars, emprant els mateixos mètodes que amb altres mostres i que estan ja explicats. El mètode permetia avaluar la presència, i quantificar si era el cas, de 13 piretroides: bifentrina, cihalotrina, ciyflutrina, cipermetrina, deltametrina, fenvalerat, fluvalinat, fenpropratrina, permetrina, fenotrina, resmetrina, tetrametrina i tralometrina (Alonso et al., 2012).

Resultats.

Per a aquestes mostres els rang de LODs amb el que es treballava era des de 0,03 a 0,46 ng g⁻¹ lw. El rang de LOQs era de 0,10 a 1,54 ng g⁻¹ lw.

Cap de les mostres analitzades va donar positiu a la presència de piretroides.

4.2.3 Discussió de resultats

El primer resultat i més destacable d'aquest estudi fou, sens dubte, que aquestes aus bioacumulen piretroides i els transfereixen als ous i, per tant, estan exposats a aquests pesticides. Només un estudi recent en perdius de camps de cultiu de cereals francesos havia donat algun indicatiu de que això podia ser així (Millot et al., 2015). Malgrat això, tant aquest estudi en perdius com els de ous i pollastres de granja (dell'Oro et al., 2014; Y. G. Li et al., 2016) estudiaven aus que estaven directament exposades als piretroides mentre que, en el nostre cas, l'exposició als piretroides dins del la reserva Natural de Doñana no se suposa directa. La conclusió que es pot extreure és, doncs, que la dieta ha de ser la via d'exposició. A més, hi ha d'haver una dispersió pel medi, ja sigui natural per escorrentia de les aigües de

cultiu o possible dispersió aèria en particulat, com dispersió antropogènica amb l'abocament de residus contaminats en abocadors on algunes d'aquestes aus s'alimentaven. De fet, al dividir les espècies segons els hàbits alimentaris, es va comprovar que les espècies que s'alimentaven de fonts principalment antropogèniques tenien uns nivells de piretroides superiors.

Referent a l'anàlisi dels isòtops, es va dur a terme una extracció amb metanol dels lípids. Això va ser perquè els lípids interfereixen negativament en l'anàlisi del $\delta^{14}\text{C}$, fent que l'anàlisi no sigui reproduïble. Aquesta extracció, però podria afectar també al resultat de $\delta^{15}\text{N}$. Així doncs, es va fer una primera comprovació de que els nivells de $\delta^{15}\text{N}$ no es veien excessivament afectats per l'extracció lipídica de les mostres. La [Taula 4.2](#) mostra la comparativa dels valors de $\delta^{15}\text{N}$ i $\delta^{14}\text{C}$ obtinguts de per a la mateixa mostra tractada amb metanol i no tractada. Com s'observa, mentre els valors de $\delta^{15}\text{N}$ romanen pràcticament inalterats, per al $\delta^{14}\text{C}$ varien significativament amb el tractament.

Taula 4.2: Comparativa de valors de $\delta^{15}\text{N}$ i $\delta^{14}\text{C}$ entre mostres tractades amb metanol i no tractades

| Espècies | $\delta^{15}\text{N}$ mostres extretes amb MeOH | $\delta^{15}\text{N}$ mostres no tractades | $\delta^{14}\text{C}$ mostres extretes amb MeOH | $\delta^{14}\text{C}$ mostres no tractades |
|----------------|---|--|---|--|
| Agró roig | 11,6 | 11,4 | -29,1 | -31,0 |
| Agró roig | 13,8 | 13,9 | -27,1 | -29,5 |
| Agró roig | 12,7 | 12,6 | -27,7 | -30,8 |
| Morito | 13,1 | 12,8 | -24,4 | -27,4 |
| Morito | 16,2 | 16 | -26,2 | -29,6 |
| Xoriguer comú | 13,6 | 13,3 | -23,2 | -24,7 |
| Xoriguer comú | 11,5 | 11,5 | -23,0 | -26,8 |
| Cigonya blanca | 9,13 | 8,9 | -24,4 | -27,3 |
| Falcó peregrí | 11,7 | 11,4 | -20,2 | -22,4 |
| Milà negre | 10,6 | 10,7 | -24,7 | -26,4 |

En aquest estudi també es va comprovar que situar aquestes aus, part d'elles migratòries, dins la xarxa tròfica gràcies als isòtops estables de N i C en els seus ous no era gaire viable. A més el fet de que algunes espècies fossin migratòries complicava més l'anàlisi ja que els

períodes de dejú i de esforç físic poden alterar el catabolisme de les proteïnes i, per tant, el $\delta^{15}\text{N}$ (Karnovsky, Hobson, & Iverson, 2012). Tot i així, la comparativa intraespècie en diferents anys en algun cas sí que va donar bons resultats. Va ser el cas de les cigonyes que en dues campanyes de mostreig en anys consecutius van observar-se un decreixement dels nivells de $\delta^{15}\text{N}$. Això podria explicar-se per canvis en la dieta ja que fonts alimentàries antropogèniques solen tenir nivells de $\delta^{15}\text{N}$ inferiors (Caron-Beaudoin et al., 2013; Florin et al., 2011). A més, que el $\delta^{14}\text{C}$ també va variar entre aquestes dues campanyes, tot i que no de forma tant significativa com el $\delta^{15}\text{N}$, també corrobora la hipòtesi del canvi de dieta.

Referent a l'anàlisi de mostres de l'Antàrtida, es pot deduir que aquests animals que viuen tan apartats de fonts de emissió de piretroides no estan exposats a ells o que, en cas que ho estiguessin, els nivells que els arriben són tan baixos que són capaços de metabolitzar-los completament. En qualsevol cas, aquests resultats impliquen que els piretroides no són capaços de traslladar-se grans distàncies en quantitats suficients per ser un problema en ecosistemes llunyans, potser gràcies a la seva baixa persistència i fàcil degradació. Aquest fet ens permet assegurar, com ja succeïa amb la persistència, que els piretroides no poden ser considerats POPs.

4.3. Medi aquàtic.

Com s'ha discutit a la introducció d'aquesta tesi, els piretroides són principalment hidròfobs per tant, en el medi aquàtic serà difícil trobar-ne nivells a l'aigua. Tot i així, sí que en podem trobar als sediments i a la biota de l'ecosistema. A més, com s'ha discutit, en peixos solen ser força tòxics així que aquest ecosistema és especialment sensible a la presència de piretroides (veure apartats de [propietats físico-químiques](#) dels piretroides i de [presència ambiental i comportament](#) del capítol de [Introducció](#)).

En el cas d'aquesta tesi, es va centrar en l'estudi de la presència de piretroides en diverses espècies de peixos dels rius espanyols i en dofins de diverses espècies. La selecció de les mostres respongué al interès de conèixer els nivells en els rius espanyols sobre biota. Ja estudis previs havien detectat nivells en aigua i sediments d'alguns d'aquests rius, tot i que de forma intermitent depenent de l'època de l'any i la coincidència amb els períodes de cultiu propers (M. L. Feo, Ginebreda, et al., 2010). Per tant, la població de peixos dels rius podia estar exposada i era una bona candidata per monitoritzar la seva exposició a aquests insecticides.

A més, també es volien comprovar si la biota marina també era exposada als piretroides. Per fer-ho es va triar un "súper-depredador" (en anglès, *top predator*), és a dir, aquelles

espècies que es consideren que estan en el nivell superior de les cadenes alimentàries i les xarxes tròfiques. Aquesta tria respongué a la hipòtesi de que la dilució dels mars i oceans provocaria que els nivells en biota marina siguessin molt baixos però, si els piretroides es bioacumulen i biomagnifiquen, els nivells superiors de la xarxa tròfica serien els més adients per comprovar si hi ha residus de piretroides acumulats en aquesta biocenosi evitant falsos negatius per nivells inferior als LODs de la metodologia que podrien donar-se en els estrats inferiors de la xarxa tròfica.

4.3.1 Piretroides en biota d'ecosistemes d'aigua dolça

En aquest apartat es pretén presentar l'estudi de la presència de piretroides en peixos de rius ibèrics de la [Publicació 3](#). Concretament, l'estudi fou emmarcat dins el projecte CONSOLIDER "Evaluación y predicción de los efectos del cambio global en la cantidad y la calidad del agua en ríos ibéricos (SCARCE)". Sota el paraigües d'aquest projecte que englobava gran nombre d'estudis, el presentat en aquesta tesi fa referència a la presència de piretroides en la biota de rius de 4 conques diferents.

Com ja es coneixia el caràcter temporal de la presència de piretroides en les conques dels rius, l'estudi de l'acumulació dels piretroides en biota podia donar una visió més general i a llarg termini de l'exposició d'aquests ecosistemes als insecticides estudiats. A més, el fet de comprovar la presència a diverses espècies permetia fer una anàlisi més detallada de l'efecte interespecie de l'enantioselectivitat en l'acumulació.

Cal remarcar, també, que algunes d'aquestes espècies són de consum habitual entre els pescadors de riu, així que els nivells de piretroides d'aquests animals poden passar directament a ser ingerits per humans. Per tant, en aquest cas podem parlar de contaminació per piretroides en mostres que eventualment, poden entrar en l'alimentació humana i ser, per tant, una font de ingesta humana de piretroides.

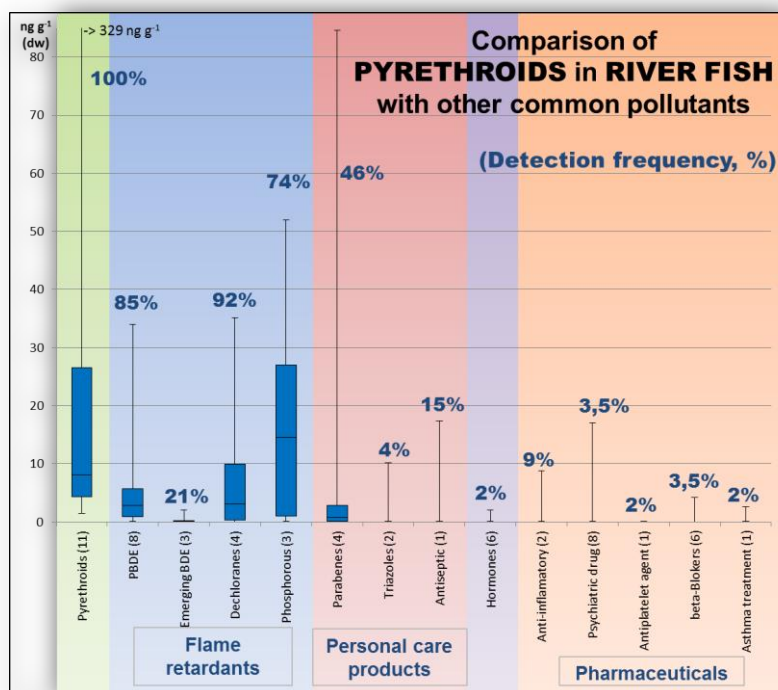
Publicació 3:

First report of pyrethroid bioaccumulation in wild river fish: A case study in Iberian river basins (Spain)

Cayo Corcellas ; Ethel Eljarrat ; Damià Barceló

Environment International (2015)

IF: 5,929





First report of pyrethroid bioaccumulation in wild river fish: A case study in Iberian river basins (Spain)



Cayo Corcellas^a, Ethel Eljarrat^{a,*}, Damià Barceló^{a,b}

^a Water and Soil Quality Research Group, Dep. of Environmental Chemistry, IDAEA-CSIC, Jordi Girona 18-26, 08034 Barcelona, Spain

^b Catalan Institute for Water Research (ICRA), H2O Building, Scientific and Technological Park of the University of Girona, Emili Grahit 101, 17003 Girona, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 2 August 2014

Accepted 11 November 2014

Available online 20 November 2014

Keywords:

Bioaccumulation

Cypermethrin

Enantioselectivity

Pyrethroids

River fish

ABSTRACT

For the first time, this work described pyrethroid bioaccumulation in edible river fish samples. We analyzed 42 whole fish samples collected in 4 different Iberian rivers. All samples were positive to these insecticides. Levels of concentration ranged from 12 to 4938 ng g⁻¹ lipid weight (lw). Moreover, isomeric characterization was carried out. Our results remarked a general preference of *cis* isomers in bioaccumulation. Finally, the enantiomeric evaluation showed that there was an enantioselective bioaccumulation of some pyrethroids, depending on the studied species. Pyrethroid concentrations were compared with levels obtained for other common pollutants, such as flame retardants, personal care products, hormones and pharmaceuticals. The highest values corresponded to pyrethroid insecticides, even though, pyrethroid levels are safe for human consumption taken into account the current regulations.

© 2014 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Pyrethroids are synthetic insecticides derived from the natural pyrethrins. Structurally they have 2 or 3 chiral centers. This means that they have 2 or 4 diastereomers and 4 or 8 enantiomers. The use of pyrethroids is extensive around the world. They are common in agronomics both on crops and directly over grain to store, in veterinary on cattle and pets, as domestic insecticides and even for health purposes against scabies, lice or vectors of some diseases such as malaria or typhus (Barr et al., 2010).

These insecticides were the alternative to other biocides, e.g. organochlorines and organophosphates, because of their low persistence and toxicity. However, even when it is known that pyrethroid environmental persistence is usually lower than 90 days (UH, 2011), it is also true that they are found in environmental samples, such as water and sediments (Feo et al., 2010b; Weston et al., 2013; Xue et al., 2005), food (Esteve-Turrillas et al., 2005; Garcia-Rodriguez et al., 2012), mammals (Alonso et al., 2012) and even human samples (Bouwman et al., 2006; Corcellas et al., 2012; Channa et al., 2012). The explanation to these findings may be the continuous, and sometimes excessive, use of these compounds.

The origin of these pyrethroids in the environment is very diverse. Agronomics should be an importance source. Despite this, some works

pointed out that pyrethroid presence in river water and sediments because of the agronomic workings is punctual and it depends on how long the pesticides were applied (Feo et al., 2010b). Besides, a lot of countries have already banned some of these insecticides in agronomics (EC, 1991; EPA, 1991). However, the usage of these biocides is also very common in non-agricultural sectors such as industry, government, and home and garden. For example, the last Pesticide Industry Sales and Usage Report (EPA, 2011) estimated that in 2007, over 1500 t of pyrethroids was used only in the U.S. Home and Garden market sector. Therefore, domestic and urban uses might be other focal points of their environmental presence (Kuivila et al., 2012; Lu et al., 2013; Weston and Lydy, 2010).

Moreover, pyrethroid toxic effects in water ecosystems are not negligible. For instance, LC₅₀ of bifenthrin in *Daphnia* and trout are 0.11 and 150 µg/L respectively (UH, 2011). Some authors had studied LC₅₀ of some other pyrethroids in fishes. Their values ranged from 0.06 µg/L (tefluthrin on trouts) to 19 µg/L (allethrin on trouts) (UH, 2011). Even when in literature there were no studies of pyrethroid bioaccumulation in wild fish tissues, some authors had studied the bioaccumulation in exposed fishes. The main objective of most of these studies was to calculate the Bioconcentration Factor (BCF) in fishes for concrete pyrethroids. These studies demonstrated high bioaccumulation but, as well, the possibility of depuration in appropriate conditions (Devillers et al., 1996; Jackson et al., 2009; Muir et al., 1994; Schimmel et al., 1983).

Lately, pyrethroid toxicology and exposition in mammals are being further investigated (Goulding et al., 2013; Jin et al., 2012; Xu et al., 2010; Zhang et al., 2008; Zhao et al., 2010). These works included new data about isomer-toxicology, even some of them were focused on enantioselective toxicology. For instance, *cis*-isomer of permethrin

Abbreviations: dw, dry weight; LC₅₀, Lethal Concentration at 50%; lw, lipid weight; LOD, limit of detection; LOQ, limit of quantification; MRL, Maximal Residue Level; MS, mass spectrometry.

* Corresponding author.

E-mail address: eeeqam@cid.csic.es (E. Eljarrat).

seems to be less metabolized and, consequently, more toxic than *trans*-permethrin in mice (Zhang et al., 2008). Besides, one of the *cis*-enantiomers presented more toxicity than the other (Jin et al., 2012). Moreover, human exposure to pyrethroids has been widely studied by urine analysis of their metabolites and related with some diseases, such as leukemia (Ding et al., 2012). However, these analyzed metabolites are nonspecific, so it was not possible to know the contribution of each pyrethroid (Barr, 2008; Barr et al., 2010; Ding et al., 2012; Koureas et al., 2012; Olsson et al., 2004) or their isomers.

With this background, we studied for the first time the potential bioaccumulation of pyrethroids in wild river fish. We analyzed 42 pooled edible fish samples from four Iberian river basins. In these samples we determined 12 different pyrethroids: *cis*-bifenthrin, cyfluthrin, cypermethrin, cyhalothrin, deltamethrin, fenvalerate, fluvalinate, permethrin, phenothrin, resmethrin, tetramethrin, and tralomethrin. In addition, given the relevance of isomerism on toxicology, we reanalyzed these samples with an enantiomeric-selective methodology.

2. Materials and methods

2.1. Standards and reagents

All analytical standards were purchased from Dr. Ehrenstorfer (Augsburg, Germany). As surrogate standards *d*₆-*trans*-permethrin and *d*₆-*trans*-cypermethrin were chosen and purchased from the same commercial firm. Organic solvents were obtained from J.T. Baker "for use in HPLC" quality (Deventer, The Netherlands). Standard solutions were prepared in ethyl acetate ("for gas chromatography" quality from Merck, Darmstadt, Germany). Calibration curves were prepared at different concentrations ranging between 0.4 and 150 ng mL⁻¹. Solid phase extraction (SPE) cartridges were obtained from Isolute Biotage (Uppsala, Sweden) (C18, 2 g 15 mL⁻¹) and from Interchim (Montluçon, France) (Basic alumina, 5 g 25 mL⁻¹).

2.2. Sampling

In the frame of the project SCARCE-Consolider-Ingenio, four Iberian river basins were sampled in 2010. Fig. 1 showed the distribution of

these four basins in the Iberian territory as well as the sampling points. Only one of this sample points corresponded to a reservoir. For each river, two fish species were selected for monitoring along the river. These species used to be one carp and one barbel species, when it was possible. Other species were also sampled, e.g. trouts, gudgeons and catfishes. Fish samples were collected, homogenized for species by a meat grinder, freeze-dried and stored at -20 °C until analyses. More details of this procedure were specified in previous works (Jakimska et al., 2013; Santin et al., 2013). Table A summarizes sample details such as species, sampling point and pool composition. With some species, for example barbels, juvenile and adult samples were differentiated by fork length; in this particular case, barbels with length lower than 30 cm were considered as juvenile.

2.3. Analytical methods

Sample treatment was adapted from Feo et al. (2012). Briefly, 0.3 g of freeze-dried sample was spiked overnight with 10 µL of a solution of 0.025 ng L⁻¹ and 0.0125 ng L⁻¹ of *d*₆-*trans*-permethrin and *d*₆-*trans*-cypermethrin, respectively. Extraction procedure was carried out with 20 mL of hexane:dichloromethane 2:1 and assisted by ultrasound for 15 min. This extraction was repeated twice and all solvent dried by a N₂ stream. A following tandem SPE (basic alumina and C18 cartridges, 30 mL acetonitrile as eluent) cleaned up. The eluent was evaporated under N₂ and the sample reconstituted 100 µL of ethyl acetate.

Analyses were performed on an Agilent Technologies 7890A coupled to a 7000A GC-MS Triple Quad. The columns chosen were a DB5-ms (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) (15 m × 0.25 mm × 0.1 µm) for the quantitative analysis and a BGB-172 (BGB Analytik, Switzerland) (30 m × 0.25 mm × 0.25 µm) for the enantiomeric determination. Details of chromatographic conditions to both achiral and chiral analyses are found in Corcellas et al. (in press). The selected mass spectrometry (MS) mode was negative chemical ionization with ammonium as reagent gas. All MS parameters are found in Feo et al. (2011).

In parallel, 1 g of sample was extracted with an equivalent extraction procedure in order to determine the lipid content gravimetrically.

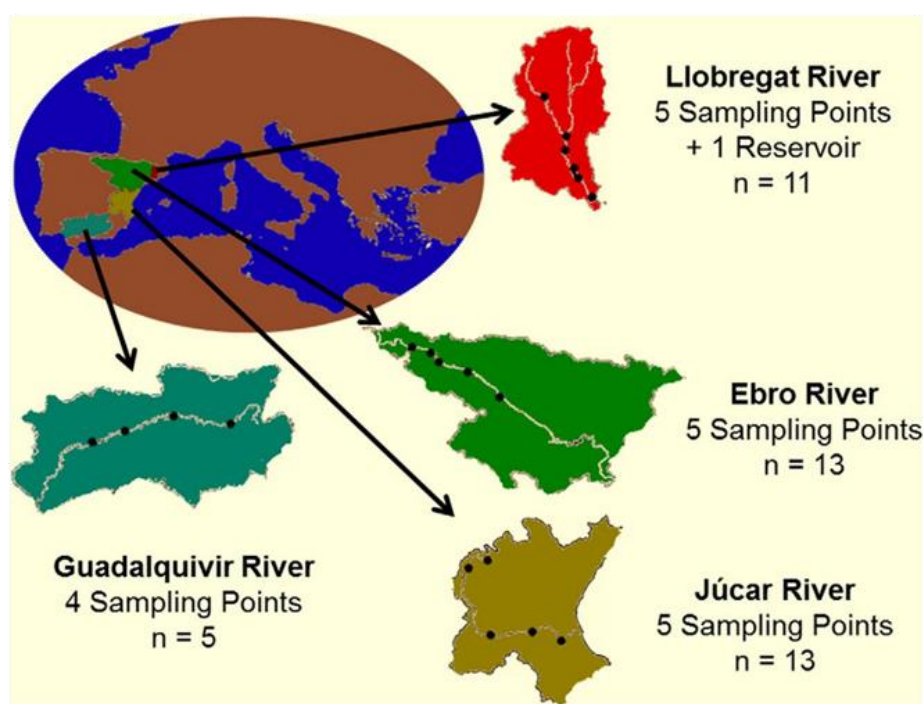


Fig. 1. Map of the four Iberian river basins, and sampling stations selected for each one (n = number of samples).

2.4. Quality assurance/control

For each batch of 12 samples, one methodological blank was carried out. Levels of blanks were always negligible (lower than 1% of the sample signals). Linearity was proven obtaining correlation coefficient higher than 0.98 in the studied concentration interval for all pyrethroids. The mean recovery was 79%, being 53% the lower value, obtained for deltamethrin. Limits of detection (LOD) ranged from 0.03 to 0.46 ng g⁻¹ lw and limits of quantification (LOQ) from 0.10 to 1.54 ng g⁻¹ lw.

2.5. Isomeric and enantiomeric analyses

After quantitative analysis, representative samples of each river and species were selected in order to be analyzed with the chiral column. This method allowed discerning the isomeric proportion of bifenthrin, cyhalothrin, cypermethrin, permethrin and tetramethrin. Fig. 2 showed the results obtained by both analyses for type I and type II standard pyrethroids.

Following Corcellas et al. (in press) indications, enantiomeric factors (EFs) for each enantiomeric pair were calculated with Eq. (1).

$$EF = A_i/A_T \quad (1)$$

where A_i is the area of the first eluting enantiomer and A_T is the sum of areas of both enantiomers. EF was defined for each enantiomeric pair: EF_{cis} and EF_{trans} for type I pyrethroids, and EF_{cis1} , EF_{cis2} , EF_{trans1} and EF_{trans2} for type II pyrethroids. A racemic mixture of an enantiomeric pair is always represented by an EF equal to 0.5.

Moreover, diastereoisomeric factors were also defined. First of all, $R_{cis/trans}$ was defined as the ratio between *cis* and *trans* isomers of the same pyrethroid. In the case of type II pyrethroids, this relationship was the ratio $(cis1 + cis2)/(trans1 + trans2)$. For type II pyrethroids more ratios are possible. For instance, $R_{cis1/cis2}$ was the proportion of the isomer *cis1* with respect to the isomer *cis2*. Analogously, $R_{trans1/trans2}$ was defined as the proportion of the isomer *trans1* with respect to the isomer *trans2*.

3. Results and discussion

3.1. Quantification analyses

Our study is the first one reporting pyrethroid levels in wild non-treated fish tissues. Pyrethroids were detected in all the analyzed samples. Table 1 summarized the results obtained as a sum of pyrethroids in each river basin (for individual sample results see Table B).

Total pyrethroid concentrations ranged from 12 to 4938 ng g⁻¹ lw. The highest value corresponded to a trout sample from a reservoir. In river course sample points, the highest concentration was of 1508 ng g⁻¹ lw, corresponding to a carp sample. Generally, carps were the fishes with more pyrethroid bioaccumulation capacity.

Other studies about pyrethroids in fish samples were not about wild biota, so the comparison of our levels with previous published was difficult. In a previous work, we found median concentrations for total pyrethroids of 7.04 and 68.4 ng g⁻¹ lw in adults and calves of Brazilian liver dolphins, respectively (Alonso et al., 2012). Thus, levels in dolphins were even two orders of magnitude lower than those found in the present work for river fish. The lower values obtained for dolphins could be explained by the capability of mammals to metabolize pyrethroids, with the conversion to non-toxic metabolites by hydrolysis (Demoute, 1989; Scollon et al., 2009). However, it should be also taken into account that samples were completely different (liver dolphin sample vs. whole fish sample) and came from different ecosystems (ocean vs. river) and water conditions, such as dissolved organic matter, could affect the bioaccumulation of pyrethroids (Haitzer et al., 1998). Regarding studies in fishes, the levels reported in exposed fishes were quite high, as well. For example, Muir et al. (1994) described levels of almost 30, 20, 40 and 20 ng g⁻¹ ww of *cis*-cypermethrin, fenvalerate, *cis*-permethrin and deltamethrin, respectively, in rainbow trout. These levels are in the same order of magnitude of our maximum levels (taking into account the transformation from lw to ww).

Nine pyrethroids out of the 12 included in the analytical work were detected. Bifenthrin, cyhalothrin and cypermethrin were ever present. Detection frequencies of the rest of the detected pyrethroids were 88%, 83%, 81%, 57% and 31% for fenvalerate, tetramethrin, permethrin, cyfluthrin and deltamethrin/tralomethrin, respectively. Tralomethrin

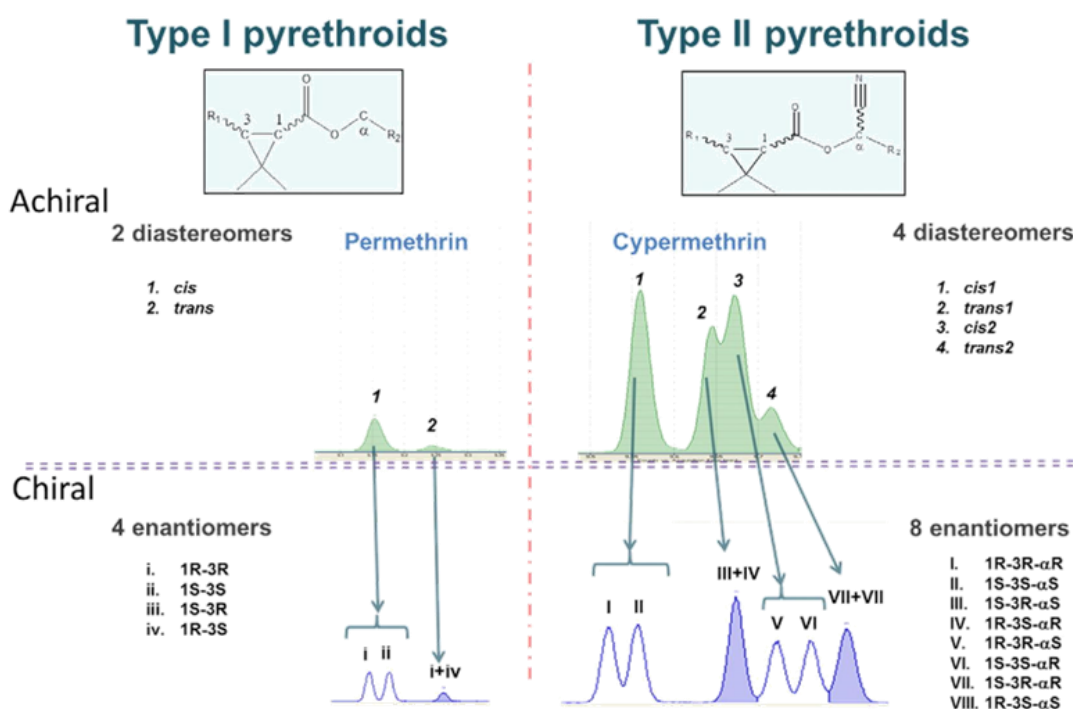


Fig. 2. Peak assignment for the chromatograms obtained in diastereomeric and enantiomeric analyses of type I and type II pyrethroids.

Table 1Summary of pyrethroid levels (expressed in ng g⁻¹ lw) obtained in fish samples collected from the four Iberian river basins (SP: sampling point).

| River basin (SP) | Barbels | | | Carp | | | Trouts | | | Other | | |
|------------------|---|---------|------|----------------------|----------|------|---------------------------------------|---------|------|---------------------------|---------|------|
| | Species name | Range | Mean | Species name | Range | Mean | Species name | Range | Mean | Species name | Range | Mean |
| Ebro | <i>L. graellsii</i> (5) | 53–154 | 114 | <i>C. carpio</i> (4) | 46–1017 | 307 | – | – | – | <i>Silurus glanis</i> (2) | 147–329 | 238 |
| Llobregat | <i>L. graellsii</i> (2 + 1 ^a) | 102–504 | 356 | <i>C. carpio</i> (5) | 152–1508 | 551 | <i>Salmo trutta</i> (1 ^a) | – | 4938 | – | – | – |
| Guadalquivir | <i>L. sclateri</i> (4) | 20–843 | 608 | <i>C. carpio</i> (1) | – | 140 | – | – | – | – | – | – |
| Júcar | <i>B. guiraonis</i> (2) | 12–123 | 68 | – | – | – | <i>Salmo trutta</i> (2) | 379–583 | 481 | <i>Gn Lozanoi</i> (5) | 114–670 | 327 |

^a This sampling point is a reservoir.

is converted to deltamethrin in a GC injector (Feo et al., 2010a), which means that results of deltamethrin are always the undifferentiated sum of these two pyrethroids. Samples never presented detectable levels of fluvalinate, phenothrin and resmethrin.

Pyrethroid distribution was different depending on the sampling point. Fig. 3a shows the median contribution of each pyrethroid to the total contamination for each river basin. For instance, permethrin was the predominant pyrethroid in the Ebro and Llobregat river basins, whereas the Guadalquivir and Júcar river basins were dominated by cypermethrin and tetramethrin, respectively. This fact could be due to different local insecticide practices. A confirmation of this hypothesis would be the similarity of patterns between Llobregat and Ebro rivers, because they are the geographically closest basin rivers. More local information about the use of pyrethroids would be necessary in order to describe a relationship between its dumping and bioaccumulation. Nonetheless, the presence of some pyrethroids like bifenthrin, whose agrarian use is banned (EC, 1991), supports the hypothesis that non-agricultural sectors contribute considerably to the pyrethroid contamination of the environment.

However, it should be pointed out that also differences in pattern distribution were observed between species collected at the same sampling point. As an example, Fig. 3b shows the pattern distribution for different species collected in the same sampling point of the Júcar River. In this case, the contribution of cyhalothrin decreased from barbels to gudgeons and trouts. In contrast, the highest contribution of permethrin was observed in trouts, followed by gudgeons, whereas it was not detected in barbels. It was supposed that each species bioaccumulates distinctly pyrethroids. For instance, Jackson et al. (2009) estimated the BCF of cyhalothrin for *Lepomis macrochirus* in 19 while the IUPAC database of agrochemicals (IUPAC, 2011) assumed that this value reach 1950 for the whole fish samples. In the case of fenvalerate, Schimmel

et al. (1983) estimated its BCF with carps in 1100 but Devillers et al.'s (1996) estimation with sheephead minnow (*Cyprinodon variegatus*) was of 570. These divergences could be due to different parameters like the dissolved organic carbon and the pyrethroid exposition (Muir et al., 1994). Given that our comparison is among individuals equally exposed, more studies are necessary to identify the exact causes of our results. One potential explanation could be the different metabolism of these species. Even when pyrethroids are structurally similar, small differences in metabolism could make some of them more bioavailable, more bioaccumulative or even more metabolizable. Other reasoning is about fish habits. Species monitored had different diet preferences and various strata. This could mean divergent direct exposure even when they came from the same river zone.

No significant differences were found between juvenile and adult samples, in both levels (ANOVA test, $\alpha > 0.01$) and profiles. No general trends on concentration were described against physical characteristics such as weight, longitude or even Fulton's condition factor. However, given that finding these trends was not the main objective of this first study, to check these results should need a more exhaustive sampling with a larger number of samples specifically selected in order to study these potential trends.

3.2. Pyrethroids versus other emerging pollutants

Levels of pyrethroids were compared with those of other pollutants analyzed in the same fish samples. Fig. 4 represented the comparison with levels of flame retardants, personal care products, hormones and pharmaceuticals. In this figure pyrethroid levels are recalculated in ng g⁻¹ dry weight (dw) in order to be compared with the rest of the published values. The first important difference among pyrethroid and most of other families was the detection frequency. Pyrethroids were

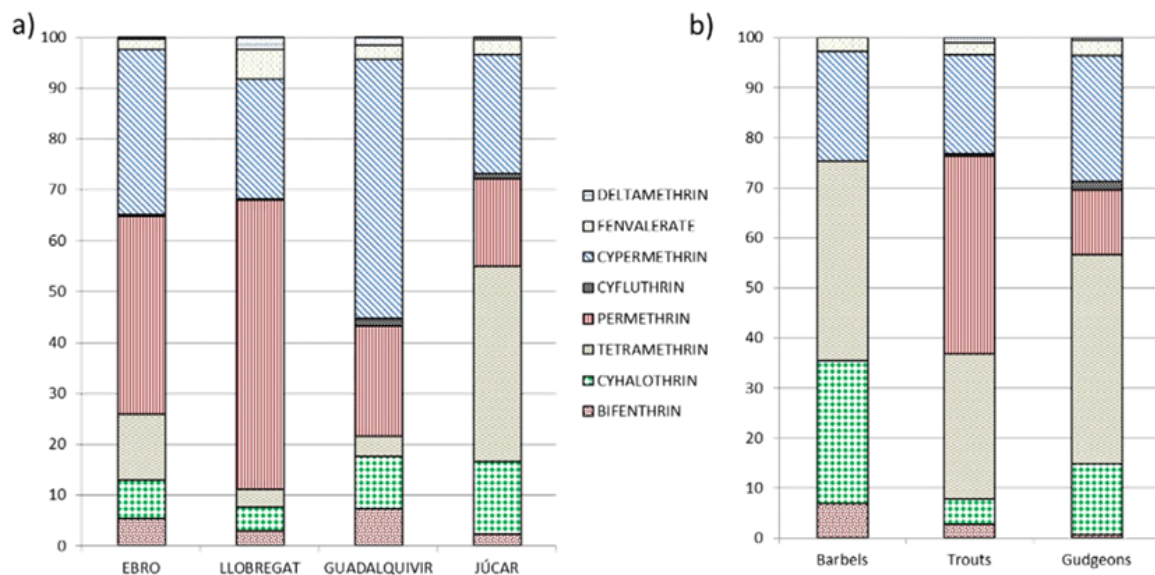


Fig. 3. Percentage (%) contribution of each pyrethroid by different a) river basins, and b) fish species (fishes collected at the same sampling point, JUC6).

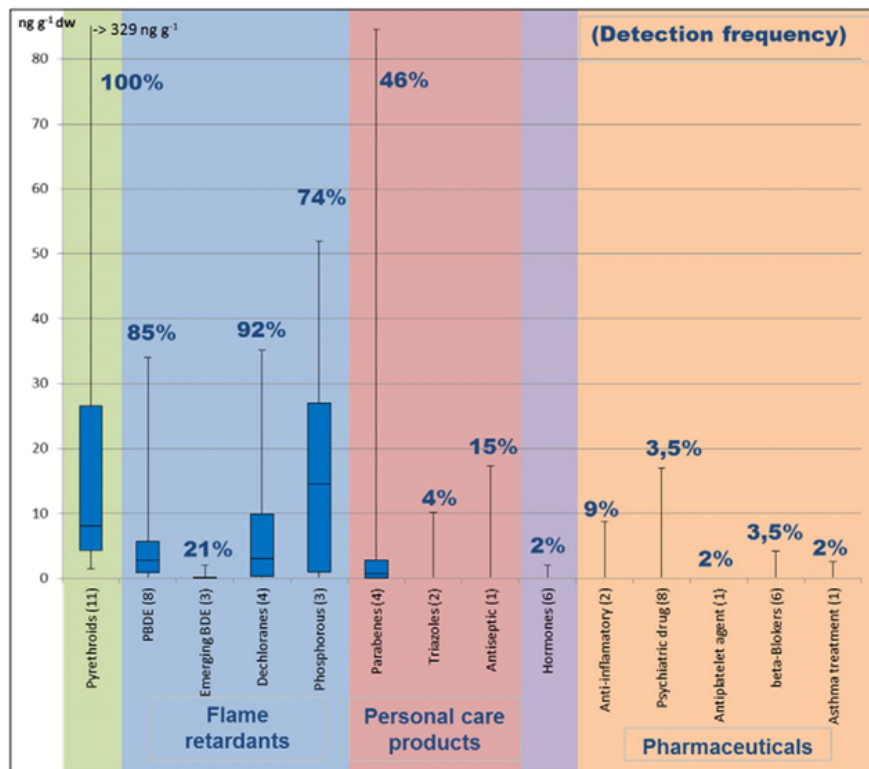


Fig. 4. Levels of different emerging pollutants analyzed in the same fish samples. Pyrethroid data corresponded to the present work, and data for the rest of the compounds were adapted from ref. Santin et al. (2013), Huerta et al. (2013), and Jakimska et al. (2013). Number of analytes of each family in parenthesis.

detected in all the samples. Only some of the flame retardants such as polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) and dechloranes had frequencies near to 100% (Santin et al., 2013). The rest of the contaminants presented frequencies lower than 50% (Huerta et al., 2013; Jakimska et al., 2013). Moreover, pyrethroid concentrations were the highest, followed by parabens and organophosphorous flame retardants, whose maximum levels were third and sixth of pyrethroid's, respectively. All these results remark the importance of including pyrethroids in environmental quality and monitoring studies, given that, even at non-lethal doses, pyrethroids are known as stressors (Forsgren et al., 2013).

3.3. Chiral analysis

Results obtained with the chiral column are summarized in Table 2. This method is less sensitive than the isomeric one, so, even when samples presented quantitative levels of pyrethroids, sometimes it was not possible to evaluate the enantiomeric contribution. This was the case of bifenthrin and tetramethrin.

3.3.1. Diastereomeric evaluation

Almost all the samples showed accumulation preference of the *cis* pyrethroid isomers. Thus, ratios among *cis* and *trans* isomers (*R*_{cis}/*R*_{trans})

Table 2
Diastereomeric ratios and enantiomeric fractions obtained for different pyrethroids in different fish species.

| Pyrethroid | Species | EF _{cis1} (EF _{cis}) | | EF _{cis2} | | <i>R</i> _{cis1} / <i>cis</i> ₂ | | <i>R</i> _{cis} / <i>trans</i> | |
|--------------|-----------|---|---------------------|--------------------|---------------------|--|-------------------------|--|-----------------------|
| | | Range | Enhanced enantiomer | Range | Enhanced enantiomer | Range | Enhanced diastereomer | Range | Enhanced diastereomer |
| Permethrin | Barbels | 0.27–0.47 | SPD | – | – | – | – | 2.65–11.1 | <i>cis</i> |
| | Carps | – | – | – | – | – | – | – | – |
| | Trouts | 0.41–0.45 | Rac | – | – | – | – | 0.60–2.20 | SPD |
| | Gudgeons | 0.58–0.76 | SPD | – | – | – | – | 1.18–4.08 | <i>cis</i> |
| | Catfishes | – | – | – | – | – | – | – | – |
| Cyhalothrin | Barbels | 0.20–0.38 | II | 0.46–0.49 | Rac | 0.38–0.57 | SPD | – | – |
| | Carps | – | – | – | – | – | – | – | – |
| | Trouts | – | – | – | – | – | – | – | – |
| | Gudgeons | 0.42–0.46 | Rac | 0.29–0.40 | VI | 0.29–0.35 | <i>cis</i> ₂ | – | – |
| | Catfishes | 0.38 | II | 0.46–0.47 | Rac | 0.64–0.65 | <i>cis</i> ₂ | – | – |
| Cyfluthrin | Barbels | 0.2 | II | – | – | – | <i>cis</i> ₁ | – | <i>cis</i> |
| | Carps | – | – | – | – | – | – | – | – |
| | Trouts | 0.39 | II | 0.60 | V | 1.61 | <i>cis</i> ₁ | 1.31 | <i>cis</i> |
| | Gudgeons | 0.20–0.37 | Rac | 0.12–0.23 | VI | – | – | – | – |
| | Catfishes | – | – | – | – | – | – | – | – |
| Cypermethrin | Barbels | 0.21–0.47 | SPD | 0.25–0.43 | SPD | 0.90–1.32 | SPD | 3.01–29.7 | <i>cis</i> |
| | Carps | 0.44 | Rac | 0.40 | VI | 0.92 | – | 3.16 | <i>cis</i> |
| | Trouts | 0.38–0.45 | SPD | 0.25–0.45 | SPD | 0.78–0.87 | <i>cis</i> ₂ | 2.27–4.23 | <i>cis</i> |
| | Gudgeons | 0.36–0.37 | II | 0.11–0.14 | VI | 0.39–0.42 | <i>cis</i> ₂ | 12.0–15.0 | <i>cis</i> |
| | Catfishes | 0.48–0.49 | Rac | 0.22–0.24 | VI | 1.14–1.15 | <i>cis</i> ₁ | 11.5–16.7 | <i>cis</i> |

Rac: racemic mixture; SPD: sampling point depending.

trans) were from 2.3 to 30 for cypermethrin, 1.3 for cyfluthrin, and from 0.6 to 11 for permethrin. The only exception was the case of tetramethrin. However, it is known that commercial mixtures are usually enriched in *trans*-tetramethrin. Concretely, it is habitual to find the *d-trans*-tetramethrin enantiomer (1*R*-3*S*-isomer) enhanced in some common domestic insecticides because it is the enantiomer with more insecticide activity (Corcellas et al., in press). Therefore, it is supposed that *trans*-tetramethrin could be more dumped to the environment.

Regarding permethrin, in previous works with biological matrices (dolphin liver and human breast milk) (Alonso et al., 2012; Corcellas et al., 2012), it was found always enriched in *cis*-isomer, which is also consistent with our findings in fish samples. In fact, some works revealed that in the case of mice, the *cis*-permethrin isomer was less metabolized than *trans*-permethrin, and it was also more accumulative and more toxic (Jin et al., 2012; Zhang et al., 2008). This selective accumulation of *cis*-permethrin we have described in our study, needs to be confirmed with further studies. More studies must be carried out in order to fill the gap of knowledge regarding potential selective bioavailability and metabolism of permethrin in fishes.

Isomers of cyhalothrin, cyfluthrin and cypermethrin were evaluated in this work for the first time in not exposed biota samples. Again, results showed that *cis* isomers were more abundant than *trans* isomers. However, even when generally *cis* isomers were enhanced, it should be taken into account that commercial mixtures could be enriched in *cis* isomers having, for example, $R_{cis}/trans \approx 2$ (Corcellas et al., in press). In this case, we cannot confirm a *cis/trans* selectivity in bioaccumulation of pyrethroids, without prior knowledge about the origin of the pyrethroids to which fishes are exposed and their $R_{cis}/trans$.

Moreover, the $R_{cis1}/cis2$ for these 3 pyrethroids was also calculated. This parameter ranged from 0.29 to 0.65 for cyhalothrin, indicating a higher contribution of the *cis2* isomer (commonly known as λ -cyhalothrin). It is important to remark that this isomer has the greatest insecticide power and it is enhanced in some commercial mixtures. In contrast, for cyfluthrin and cypermethrin, the preferential accumulation of *cis1* or *cis2* seemed to depend on the species. For instance, the *cis1*-cypermethrin was enhanced in catfish samples whereas the *cis2*-isomer was enriched in trout and gudgeon species. Nevertheless, given that this is the first study to describe diastereomeric behavior, differences in this ratio among species need to be further studied and those trends confirmed.

3.3.2. Enantiomeric interpretation

In order to analyze the enantiomeric accumulation, different EF values were calculated (Table 2). EFs could get values between 0 (there is no presence of the first eluting enantiomer) and 1 (there is no presence of the second eluting enantiomer). The medium value of 0.5 corresponds to the racemic mixture, indicating that both enantiomers are in the same proportion. Even when the standard deviation of EF ranged from 0.001 to 0.016 in standards (Corcellas et al., in press), for further discussions, we generally consider racemic mixtures to those with EF values of 0.5 ± 0.1 (a medium deviation value of 0.01 multiplied by a factor of 10 in order to include all those variables out of control that could affect differently in real samples).

Looking at the permethrin, calculated EF_{cis} values were very dissimilar. They ranged from 0.27 to 0.76. Values for trouts seemed to suggest racemic mixtures. In some sampling points, both gudgeons and barbels presented values too close to 0.5 to clarify any enantioselectivity. Notwithstanding, in other sampling points, these two species showed EF_{cis} values significantly higher (gudgeons) and lower (barbels) than 0.5, revealing clear enrichments of first eluting enantiomer and second, respectively. Those general differences among sampling points could show different commercial mixture uses. Additionally, in previous works (Corcellas et al., in press), we had described an enrichment of (1*S*-3*S*)-enantiomer in domestic permethrin mixtures. Results of gudgeon samples seemed to suggest either that the origin of their contamination was not the domestic use, or that the (1*R*-3*R*)-enantiomer was

enhanced in the environment. Otherwise, the enantioselective trend depending on the species needs to be proved. More studies involving higher number of samples should be carried out in order to corroborate these tendencies.

EF values of both *cis* enantiomeric pairs of cyhalothrin were lower than 0.5, with mean rates of 0.37 and 0.43 respectively. In this case, behaviors in barbel and catfish samples were similar. For EF_{cis1} , these species showed the first eluting enantiomer (1*R*-3*R*- α *R*-isomer) enhanced but EF_{cis2} showed a racemic enantiomeric mixture. On the other hand, gudgeon samples presented the opposite behavior: EF_{cis1} showed no enantiomeric selectivity but EF_{cis2} could indicate an (1*R*-3*R*- α *S*)-cyhalothrin enrichment. Knowing that, the gudgeon samples came from other rivers, different exposures are most probably the explanation to their different cyhalothrin patterns.

For cyfluthrin, EF_{cis1} was always lower than 0.39. EF_{cis2} of this pyrethroid could be calculated only for one sample, being 0.60. On the other hand, all samples presented concentrations of cypermethrin higher than the LOQ of the chiral method and all their EF values were lower than 0.5. Thus, *cis1* cypermethrin enantiomeric pair was enriched in the second eluting enantiomer (1*S*-3*S*- α *S*). Though, in the case of catfishes, this value was clearly near to racemic mixture. This indicated different enantio-accumulation of the same pyrethroid depending on the species, even in the same sampling point. Fig. 5 shows the chromatograms of cypermethrin for a barbel and a catfish in order to show graphically those results. Nonetheless, the *cis2* enantiomeric pair always presented an enhancement of the second eluting enantiomer (1*S*-3*S*- α *R*), as well for the catfish samples. Therefore, there was no correlation between enantioselectivity of one enantiomeric pair and the other. In commercial mixtures, only racemic patterns have been described (Corcellas et al., in press).

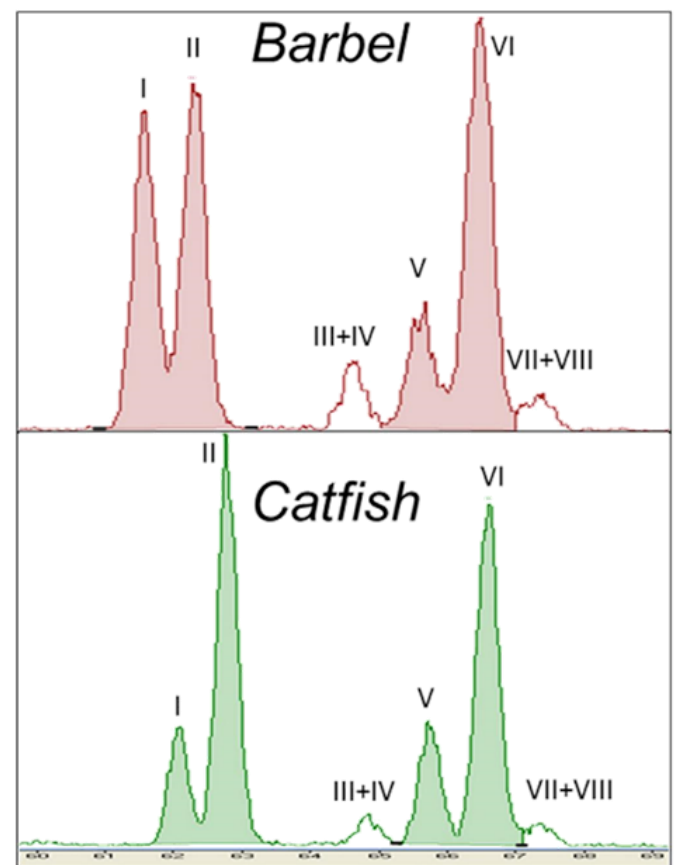


Fig. 5. Chromatograms obtained for the chiral determination of cypermethrin of barbel and catfish samples. Peak assignment following Fig. 2. (*cis* isomers shadowed).

4. Conclusions

Our work represents the first study showing the real bioaccumulation of pyrethroids in river wild fishes. Thus, the assumption of the safety of these insecticides is questioned. Nowadays, both European and American legislations establish maximum residue levels (MRL) of these pesticides for wild terrestrial animal products (EC, 2014; FAS, 2014). However, there is no legislation for fish. For example, the European Council laid down a MRL of 0.05 mg kg⁻¹ of cypermethrin for wild game food. After doing the required unit conversion, in this study, the sum of pyrethroid concentrations in wild fishes is near to 0.03 mg kg⁻¹ wet weight. Consequently, our study shows the importance of establishing new insecticide controls and the extension of their coverage to include edible fish groups. Besides, more investigations are necessary to evaluate this contamination in other sampling areas around the world, in which pyrethroids are extensively applied, as well.

At the same time, our results show that some enantioselective accumulation might be given in biota samples. Moreover, even if a concrete fish species showed enantioselective bioaccumulation for one specific pyrethroid, it did not mean that the fish presented the enantioselective bioaccumulation for other pyrethroids. Therefore, more research regarding enantioselective accumulation and enantiomeric toxicology is needed in order to establish which enantiomers cause a greater environmental risk.

Supplementary data to this article can be found online at <http://dx.doi.org/10.1016/j.envint.2014.11.007>.

Acknowledgment

This research was funded by the Spanish Ministry of Science and Innovation through the project SCARCE (Consolider Ingenio 2010 CSD2009-00065). This work has also been partly funded by the Generalitat de Catalunya (Consolidated Research Groups 2014 SGR 418 – Water and Soil Quality Unit). Biotage is acknowledged for SPE cartridges.

References

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., Torres, J.P.M., Lailson-Brito, J., Malm, O., Eljarrat, E., Barcelo, D., 2012. Pyrethroids: a new threat to marine mammals? *Environ. Int.* 47, 99–106.

Barr, D.B., 2008. Biomonitoring of exposure to pesticides. *J. Chem. Health Saf.* 15, 20–29.

Barr, D.B., Olsson, A.O., Wong, L.-Y., Udunka, S., Baker, S.E., Whitehead Jr., R.D., Magsumbol, M.S., Williams, B.L., Needham, L.L., 2010. Urinary concentrations of metabolites of pyrethroid insecticides in the general US population: National Health and Nutrition Examination Survey 1999–2002. *Environ. Health Perspect.* 118, 742–748.

Bouwman, H., Sereda, B., Meinhardt, H.M., 2006. Simultaneous presence of DDT and pyrethroid residues in human breast milk from a malaria endemic area in South Africa. *Environ. Pollut.* 144, 902–917.

Channa, K.R., Roellin, H.B., Wilson, K.S., Nost, T.H., Odland, J.O., Naik, I., Sandanger, T.M., 2012. Regional variation in pesticide concentrations in plasma of delivering women residing in rural Indian Ocean coastal regions of South Africa. *J. Environ. Monit.* 14, 2952–2960.

Corcellas, C., Feo, M.L., Paulo Torres, J., Malm, O., Ocampo-Duque, W., Eljarrat, E., Barcelo, D., 2012. Pyrethroids in human breast milk: occurrence and nursing daily intake estimation. *Environ. Int.* 47, 17–22.

Corcellas, C., Eljarrat, E., Barceló, D., 2014. Enantiomeric-selective determination of pyrethroids: application to human samples. *Anal. Bioanal. Chem.* <http://dx.doi.org/10.1007/s00216-014-7905-6> (in press).

Corcellas, C., Eljarrat, E., Barceló, D., 2014. Enantiomeric-selective determination of pyrethroids: application to human samples. *J. Chromatogr. A* (in press).

Demotte, J.P., 1989. A brief review of the environmental fate and metabolism of pyrethroids. *Pestic. Sci.* 27, 375–385.

Devillers, J., Bintein, S., Domine, D., 1996. Comparison of BCF models based on log P. *Chemosphere* 33, 1047–1065.

Ding, G., Shi, R., Gao, Y., Zhang, Y., Kamijima, M., Sakai, K., Wang, G., Feng, C., Tian, Y., 2012. Pyrethroid pesticide exposure and risk of childhood acute lymphocytic leukemia in Shanghai. *Environ. Sci. Technol.* 46, 13480–13487.

EC, 1991. Council Directive 91/414/EEC of 15 July 1991 concerning the placing of plant protection products on the market. *LC Eur* 1991/1021.

EC, 2014. EU Pesticides database ec.europa.eu/sanco_pesticides/public/; European Council.

EPA, 1991. In: Agency, E.P. (Ed.), U.S. EPA's Pesticide Programs (Washington, DC).

EPA, U.S., 2011. Pesticides Industry Sales and Usage: 2006 and 2007 Market Estimates. U.S. EPA, Washington.

Esteve-Turrillas, F.A., Pastor, A., de la Guardia, M., 2005. Determination of pyrethroid insecticide residues in vegetable oils by using combined solid-phases extraction and tandem mass spectrometry detection. *Anal. Chim. Acta.* 553, 50–57.

FAS, 2014. MRL database www.mrldatabase.com U.S. Department of Agriculture.

Feo, M.L., Eljarrat, E., Barcelo, D., 2010a. Determination of pyrethroid insecticides in environmental samples. *TrAC Trends Anal. Chem.* 29, 692–705.

Feo, M.L., Ginebreda, A., Eljarrat, E., Barcelo, D., 2010b. Presence of pyrethroid pesticides in water and sediments of Ebro River Delta. *J. Hydrol.* 393, 156–162.

Feo, M.L., Eljarrat, E., Barcelo, D., 2011. Performance of gas chromatography/tandem mass spectrometry in the analysis of pyrethroid insecticides in environmental and food samples. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 25, 869–876.

Feo, M.L., Eljarrat, E., Manaca, M.N., Dobano, C., Barcelo, D., Sunyer, J., Alonso, P.L., Menendez, C., Grimalt, J.O., 2012. Pyrethroid use-malaria control and individual applications by households for other pests and home garden use. *Environ. Int.* 38, 67–72.

Forsgren, K.L., Riar, N., Schlenk, D., 2013. The effects of the pyrethroid insecticide, bifenthrin, on steroid hormone levels and gonadal development of steelhead (*Oncorhynchus mykiss*) under hypersaline conditions. *Gen. Comp. Endocrinol.* 186, 101–107.

Garcia-Rodriguez, D., Cela-Torrijos, R., Lorenzo-Ferreira, R.A., Carro-Diaz, A.M., 2012. Analysis of pesticide residues in seaweeds using matrix solid-phase dispersion and gas chromatography–mass spectrometry detection. *Food Chem.* 135, 259–267.

Goulding, A.T., Shelley, L.K., Ross, P.S., Kennedy, C.J., 2013. Reduction in swimming performance in juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) following sublethal exposure to pyrethroid insecticides. *Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.* 157, 280–286.

Haitzer, M., Hoss, S., Traunspurger, W., Steinberg, C., 1998. Effects of dissolved organic matter (DOM) on the bioconcentration of organic chemicals in aquatic organisms – a review. *Chemosphere* 37, 1335–1362.

Huerta, B., Jakimska, A., Gros, M., Rodriguez-Mozaz, S., Barcelo, D., 2013. Analysis of multi-class pharmaceuticals in fish tissues by ultra-high-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 1288, 63–72.

IUPAC, 2011. PPDB <http://sitem.herts.ac.uk/aeru/iupac/index.htm>: IUPAC.

Jackson, S.H., Cowan-Ellsberry, C.E., Thomas, G., 2009. Use of quantitative structural analysis to predict fish bioconcentration factors for pesticides. *J. Agric. Food Chem.* 57, 958–967.

Jakimska, A., Huerta, B., Barganska, Z., Kot-Wasik, A., Rodriguez-Mozaz, S., Barcelo, D., 2013. Development of a liquid chromatography–tandem mass spectrometry procedure for determination of endocrine disrupting compounds in fish from Mediterranean rivers. *J. Chromatogr. A* 1306, 44–58.

Jin, Y., Liu, J., Wang, L., Chen, R., Zhou, C., Yang, Y., Liu, W., Fu, Z., 2012. Permethrin exposure during puberty has the potential to enantioselectively induce reproductive toxicity in mice. *Environ. Int.* 42, 144–151.

Koureas, M., Tsakalof, A., Tsatsakis, A., Hadjichristodoulou, C., 2012. Systematic review of biomonitoring studies to determine the association between exposure to organophosphorus and pyrethroid insecticides and human health outcomes. *Toxicol. Lett.* 210, 155–168.

Kuivila, K.M., Hladik, M.L., Ingersoll, C.G., Kemble, N.E., Moran, P.W., Calhoun, D.L., Nowell, L.H., Gilliom, R.J., 2012. Occurrence and potential sources of pyrethroid insecticides in stream sediments from seven U.S. metropolitan areas. *Environ. Sci. Technol.* 46, 4297–4303.

Lu, C.S., Adamkiewicz, G., Attfield, K.R., Kapp, M., Spengler, J.D., Tao, L., Xie, S.H., 2013. Household pesticide contamination from indoor pest control applications in urban low-income public housing dwellings: a community-based participatory research. *Environ. Sci. Technol.* 47, 2018–2025.

Muir, D.C.G., Hobden, B.R., Servos, M.R., 1994. Bioconcentration of pyrethroid insecticides and DDT by rainbow trout – uptake, depuration, and effect of dissolved organic carbon. *Aquat. Toxicol.* 29, 223–240.

Olsson, A.O., Baker, S.E., Nguyen, J.V., Romanoff, L.C., Udunka, S.O., Walker, R.D., Flemmen, K.L., Barr, D.B., 2004. A liquid chromatography–tandem mass spectrometry multiresidue method for quantification of specific metabolites of organophosphorus pesticides, synthetic pyrethroids, selected herbicides, and DEET in human urine. *Anal. Chem.* 76, 2453–2461.

Santin, G., Baron, E., Eljarrat, E., Barcelo, D., 2013. Emerging and historical halogenated flame retardants in fish samples from Iberian rivers. *J. Hazard. Mater.* 263, 116–121.

Schimmel, S.C., Garnas, R.L., Patrick, J.M., Moore, J.C., 1983. Acute toxicity, bioconcentration, and persistence of AC-222,705, benthic carb, chlorpyrifos, fenvalerate, methyl parathion, and permethrin in the estuarine environment. *J. Agric. Food Chem.* 31, 104–113.

Scollon, E.J., Starr, J.M., Godin, S.J., DeVito, M.J., Hughes, M.F., 2009. In vitro metabolism of pyrethroid pesticides by rat and human hepatic microsomes and cytochrome P450 isoforms. *Drug Metab. Dispos.* 37, 221–228.

UH, 2011. Pesticide Properties DataBase <http://sitem.herts.ac.uk/aeru/footprint/index2.htm>: University of Hertfordshire.

Weston, D.P., Lydy, M.J., 2010. Urban and agricultural sources of pyrethroid insecticides to the Sacramento–San Joaquin Delta of California. *Environ. Sci. Technol.* 44, 1833–1840.

Weston, D.P., Ramil, H.L., Lydy, M.J., 2013. Pyrethroid insecticides in municipal wastewater. *Environ. Toxicol. Chem.* 32, 2460–2468.

Xu, C., Tu, W.Q., Lou, C., Hong, Y.Y., Zhao, M.R., 2010. Enantioselective separation and zebrafish embryo toxicity of insecticide beta-cypermethrin. *J. Environ. Sci.* 22, 738–743.

Xue, N.D., Xu, X.B., Jin, Z.L., 2005. Screening 31 endocrine-disrupting pesticides in water and surface sediment samples from Beijing Guanting reservoir. *Chemosphere* 61, 1594–1606.

Zhang, S.-Y., Ueyama, J., Ito, Y., Yanagiba, Y., Okamura, A., Kamijima, M., Nakajima, T., 2008. Permethrin may induce adult male mouse reproductive toxicity due to cis isomer not trans isomer. *Toxicology* 248, 136–141.

Zhao, M.R., Chen, F., Wang, C., Zhang, Q., Gan, J.Y., Liu, W.P., 2010. Integrative assessment of enantioselectivity in endocrine disruption and immunotoxicity of synthetic pyrethroids. *Environ. Pollut.* 158, 1968–1973.

| Sampling Point | Common Name | Scientific Name | Number of individuals | Sampling Point | Common Name | Scientific Name | Number of individuals |
|--------------------|---------------------------------|-------------------------|-----------------------|-------------------|------------------------|-------------------------|-----------------------|
| JUCAR RIVER | | | | EBRO RIVER | | | |
| J1 | Iberian Gudgeon (adult) | <i>Gobio lozanoi</i> | 3 | E1 | Ebro Barbel (adult) | <i>Barbus graellsii</i> | 3 |
| | Iberian Gudgeon (juvenile) | | 6 | | Ebro Barbel (juvenile) | | 4 |
| | Brown Trout (adult) | <i>Salmon Trutta</i> | 3 | E2 | Ebro Barbel (juvenile) | <i>B. graellsii</i> | 3 |
| | Brown Trout (juvenile) | | 5 | | Common Carp | <i>Cyprinus carpio</i> | 1 |
| J2 | Iberian Gudgeon (juvenile) | <i>G. lozanoi</i> | 13 | E3 | Ebro Barbel (adult) | <i>B. graellsii</i> | 3 |
| | Brown Trout (adult) | <i>S. Trutta</i> | 1 | | Ebro Barbel (juvenile) | | 3 |
| J3 | Iberian Gudgeon (adult) | <i>G. lozanoi</i> | 4 | | Common Carp | <i>C. carpio</i> | 3 |
| | Iberian Gudgeon (juvenile) | | 10 | E4 | Ebro Barbel (adult) | <i>B. graellsii</i> | 3 |
| J4 | Iberian Gudgeon (adult) | <i>G. lozanoi</i> | 14 | | Ebro Barbel (juvenile) | | 3 |
| | Mediterranean Barbel | <i>Barbus guiraonis</i> | 1 | | Common Carp | <i>C. carpio</i> | 3 |
| J4 | Iberian Gudgeon (juvenile) | <i>G. lozanoi</i> | 7 | | Wels Catfish | <i>Silurus glanis</i> | 2 |
| | Mediterranean Barbel (adult) | <i>B. guiraonis</i> | 1 | E5 | Common Carp | <i>C. carpio</i> | 3 |
| | Mediterranean Barbel (juvenile) | | 2 | | Wels Catfish | <i>S. glanis</i> | 2 |

| LLOBREGAT RIVER | | | | GUADALQUIVIR RIVER | | | |
|-----------------|------------------------|-------------------------|---|--------------------|-------------------|-----------------------------|---|
| L1 | Ebro Barbel (adult) | <i>Barbus graellsii</i> | 3 | G1 | Andalusian Barbel | <i>Luciobarbus sclateri</i> | 1 |
| | Brown Trout (adult) | <i>Salmon Trutta</i> | 3 | G2 | Andalusian Barbel | <i>L. sclateri</i> | 1 |
| L2 | Ebro Barbel (adult) | <i>B. graellsii</i> | 3 | | Common Carp | <i>Cyprinus. carpio</i> | 9 |
| | Ebro Barbel (juvenile) | | 3 | G3 | Andalusian Barbel | <i>L. sclateri</i> | 9 |
| | Common Carp | <i>Cyprinus carpio</i> | 3 | G4 | Andalusian Barbel | <i>L. sclateri</i> | 9 |
| L3 | Ebro Barbel (adult) | <i>B. graellsii</i> | 2 | | | | |
| | Ebro Barbel (juvenile) | | 3 | | | | |
| | Common Carp | <i>C. carpio</i> | 1 | | | | |
| L4 | Common Carp | <i>C. carpio</i> | 3 | | | | |
| L5 | Common Carp | <i>C. carpio</i> | 3 | | | | |
| L6 | Common Carp | <i>C. carpio</i> | 3 | | | | |

Table A: Details of pooled fish samples analyzed in each river basin.

Table B: Results of quantification analyses obtained for each sample (ng g lw⁻¹).

| SAMPLE | Bifenthrin | Cyhalothrin | Tetramethrin | Permethrin | Cyfluthrin | Cypermethrin | Fenvalerate | Deltamethrin* | TOTAL |
|---------------|-------------------|--------------------|---------------------|-------------------|-------------------|---------------------|--------------------|----------------------|--------------|
| JUCAR | | | | | | | | | |
| J1_GL_a | 0.83 | 35.2 | 111 | 152 | nd | 118 | 8.04 | nd | 425 |
| J1_GL_j | 0.88 | 12.1 | 66.5 | 39.2 | 2.06 | 65.3 | 3.96 | nd | 190 |
| J1_ST_a | 2.50 | 9.36 | 14.8 | 69.2 | nd | 38.4 | 5.37 | nd | 140 |
| J1_ST_j | 3.22 | 27.5 | 297 | 182 | 6.37 | 95.6 | 6.36 | nd | 618 |
| J2_GL_a | 5.43 | 16.0 | 115 | 324 | 3.62 | 161 | 22.4 | 23.3 | 670 |
| J2_ST_a | 37.1 | 23.3 | 165 | 230 | nd | 95.9 | 14.1 | 18.6 | 583 |
| J3_GL_a | 0.65 | 18.4 | 109 | nq | 5.15 | 25.4 | 4.60 | nd | 163 |
| J3_GL_j | 1.19 | 22.2 | 17.4 | nq | 6.93 | 32.6 | 3.70 | nd | 84 |
| J4_BG_a | 0.42 | 13.1 | 98.2 | nq | nd | 4.82 | 6.70 | nd | 123 |
| J4_GL_a | 0.69 | 34.4 | 310 | nq | nd | 66.1 | 8.63 | nd | 420 |
| J5_BG_a | 1.68 | 5.75 | nq | nq | nd | 4.92 | nq | nd | 12 |
| J5_GL_a | 1.75 | 27.8 | 82.7 | nq | nd | 52.3 | nq | nd | 165 |
| J5_GL_j | 0.59 | 21.6 | 26.9 | nq | nd | 7.89 | 5.57 | nd | 63 |
| EBRO | | | | | | | | | |
| E1_BG_a | 4.87 | 1.89 | nd | 59.9 | 1.70 | 84.8 | 7.26 | nd | 160 |
| E1_BG_j | 5.37 | 1.58 | nd | 72.4 | 1.43 | 63.7 | 3.84 | nd | 148 |
| E2_CC | 1.92 | 3.54 | 3.47 | 24.1 | nd | 13.1 | nq | nd | 46 |
| E2_BG_j | 0.75 | 2.02 | 32.5 | nq | nd | 17.4 | nq | nd | 53 |
| E3_BG_a | 1.21 | 19.5 | 49.8 | 51.5 | nd | 43.7 | 2.74 | nd | 168 |
| E3_BG_j | 1.04 | 3.04 | 6.08 | 40.7 | nd | 19.7 | 0.77 | nd | 71 |
| E3_CC | 1.66 | 0.97 | nd | 32.7 | nd | 13.1 | nq | nd | 48 |
| E4_BG_a | 8.73 | 17.7 | 44.8 | 72.0 | nd | 27.8 | 2.07 | nd | 173 |
| E4_BG_j | 6.30 | 14.3 | 4.01 | 25.0 | nd | 29.3 | 2.66 | nd | 82 |
| E4_CC | 20.1 | 10.8 | 6.14 | 40.6 | nd | 30.7 | 6.33 | nd | 115 |

| | | | | | | | | | |
|--------------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| E4_SG | 29.2 | 70.9 | 34.5 | 61.2 | 3.46 | 109 | 11.4 | 9.75 | 329 |
| E5_CC | 66.5 | 12.0 | nq | 501 | 2.33 | 411 | 24.7 | nd | 1017 |
| E5_SG | 12.0 | 30.4 | 19.2 | 24.7 | 1.09 | 49.6 | 4.46 | 5.23 | 147 |
| LLOBREGAT | | | | | | | | | |
| L2_CC | 16.8 | 40.3 | 11.0 | 855 | 1.89 | 422 | 65.6 | 96.2 | 1508 |
| L2_BG_a | 12.8 | 30.6 | 28.1 | 308 | 1.34 | 60.6 | 6.44 | 5.31 | 453 |
| L2_BG_j | 13.8 | 17.8 | 39.8 | 368 | 0.18 | 108 | 6.94 | nd | 554 |
| L3_BG_a | 6.28 | 12.0 | 16.6 | 203 | 0.85 | 31.4 | 4.13 | 3.05 | 278 |
| L3_BG_j | 12.0 | 22.9 | 42.6 | 485 | 1.62 | 71.8 | 4.24 | 8.98 | 649 |
| L3_CC | 9.18 | 14.8 | 10.1 | 218 | 1.05 | 35.6 | 4.58 | 7.65 | 301 |
| L4_CC | 18.5 | 13.2 | 12.3 | 422 | 6.01 | 126 | 11.6 | 20.1 | 630 |
| L5_CC | 5.13 | 11.9 | nd | 93.1 | 1.05 | 48.7 | 5.65 | nd | 166 |
| L6_CC | 5.36 | 10.4 | 11.0 | 99.9 | nd | 17.9 | 6.94 | nd | 152 |
| L1_BG | 6.02 | 9.04 | 22.6 | 0.00 | 41.7 | 13.0 | 10.0 | nd | 102 |
| L1_ST | 72.9 | 67.6 | 169 | 0.00 | 3059 | 1520 | 49.8 | nd | 4938 |
| GUADALQUIVIR | | | | | | | | | |
| G1_LS | 0.64 | 9.50 | 1.12 | 3.95 | nq | 3.82 | 0.79 | nq | 20 |
| G2_CC | 14.5 | 2.11 | 1.79 | 20.1 | 3.80 | 93.8 | 3.00 | 0.92 | 140 |
| G2_LS | 81.4 | 4.77 | 97.7 | 169 | 35.2 | 351 | 28.2 | 25.7 | 793 |
| G3_LS | 31.5 | 2.94 | nq | 279 | 3.60 | 407 | 24.5 | 27.5 | 776 |
| G4_LS | 68.9 | 8.31 | 4.01 | 142 | 2.78 | 608 | 3.64 | 5.39 | 843 |

*These results correspond to the mixture of deltamethrin and tralomethrin.

4.3.2 Piretroides en biota d'ecosistemes marins

En aquest apartat es presentaran dos treballs sobre biota en medis marins. Com s'ha discutit prèviament, en ambdós casos es va triar estudiar dofins ja que són considerats súper-depredadors i podia ser més senzill trobar nivells fins i tot amb la dilució produïda pel mar. A més, el fet de tractar amb mamífers, implicava que el comportament esperat dels piretroides en aquests animals podia ser més similar al humà que no pas les altres espècies estudiades (aus i peixos).

4.3.2.1 Determinació en dofins del Plata

La publicació 4, va ser el primer treball a la bibliografia en trobar nivells de piretroides en dofins. Fins que vam publicar aquest treball, no hi havia cap article científic sobre nivells de piretroides en fauna salvatge, menys encara del medi marí. Els nivells presentats fins aleshores es limitaven a algun estudi en humans i en animals de granja exposats expressament.

En aquest cas es tractava de dofins de l'espècie *Pontoporia blainvillei*, comunament coneguts com dofins del Plata o dofins franciscans. El treball va ser una col·laboració amb la universitat de Rio de Janeiro, els quals ens van cedir les mostres. Es tractava d'individus varats a les costes Brasileres o morts en xarxes de pescadors que no havien pogut ser alliberats abans de la seva mort. Les zones de mostreig comprenien les zones costeres de São Paulo i de l'estat Rio Grande do Sul.

Publicació 4:

Pyrethroids: A new threat to marine mammals?

Mariana B. Alonso ; Maria Luisa Feo ; Cayo Corcellas
; Lara G. Vidal ; Carolina P. Bertozzi ; Juliana Marigo
; Eduardo R. Secchi ; Manuela Bassoi ; Alexandre F.
Azevedo ; Paulo R. Dorneles ; João Paulo M. Torres ;
José Lailson-Brito ; Olaf Malm ; Ethel Eljarrat ;
Damià Barceló

Environment International (2012)

IF (2015): 5,929





Pyrethroids: A new threat to marine mammals?

Mariana B. Alonso^{a,b,c}, Maria Luisa Feo^d, Cayo Corcellas^d, Lara G. Vidal^{a,b}, Carolina P. Bertozzi^c, Juliana Marigo^c, Eduardo R. Secchi^e, Manuela Bassoi^e, Alexandre F. Azevedo^b, Paulo R. Dorneles^{a,b}, João Paulo M. Torres^a, José Lailson-Brito^b, Olaf Malm^a, Ethel Eljarrat^{d,*}, Damià Barceló^d

^a Radioisotope Laboratory Eduardo Penna Franca (LREPF), Biophysics Institute Carlos Chagas Filho (IBCCF), Federal University of Rio de Janeiro (UFRJ), Brazil

^b Aquatic Mammal and Bioindicator Laboratory (MAQUA), School of Oceanography, Rio de Janeiro State University (UERJ), Brazil

^c Projeto BioPesca, Praia Grande, SP, Brazil

^d Department of Environmental Chemistry, IDAEA, CSIC, Jordi Girona 18–26, 08034 Barcelona, Spain

^e Turtles and Marine Mammals Laboratory, Institute of Oceanography, Federal University of Rio Grande (FURG), Rio Grande, RS, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 23 April 2012

Accepted 21 June 2012

Available online 15 July 2012

Keywords:

Bioaccumulation

Breast milk

Franciscana dolphin

Liver

Maternal transfer

Placenta

ABSTRACT

The present study constitutes the first investigation to demonstrate pyrethroid bioaccumulation in marine mammals, despite the assumption that these insecticides are converted to non-toxic metabolites by hydrolysis in mammals. Twelve pyrethroids were determined in liver samples from 23 male franciscana dolphins from Brazil. The median concentration values for total pyrethroids were 7.04 and 68.4 ng/g lw in adults and calves, respectively. Permethrin was the predominant compound, contributing for 55% of the total pyrethroids. Results showed a distinct metabolic balance of pyrethroids through dolphin life. High loads are received at the beginning of their lives and, when they reach sexual maturity, these mammals seem to degrade/metabolize pyrethroids. Maternal transfer of these compounds was also evaluated through the analysis of breast milk and placenta samples. Pyrethroids were detected in both matrices, with values between 2.53–4.77 ng/g lw and 331–1812 ng/g lw, respectively. Therefore, for the first time, a study shows mother-to-calf transfer of pyrethroids by both gestational and lactation pathways in dolphins.

© 2012 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

During the 1990s the pesticide use in Brazil rapidly increased as a consequence of globalization (trade liberalization) and agroindustrialization. Pesticides have been extensively used on crops in the country, including soybeans, sugarcane, tobacco, cotton and fruits (Dasgupta et al., 2001). According to Martinelli and Omoto (2006) insect control in cotton crops is responsible for an annual application of approximately 10,000 kg of insecticide active ingredients in Brazil. The major insecticide use in crops occurs in the Southeastern (SE) and Southern (S) Brazilian regions. In this context, the Brazilian states of São Paulo (SE region) and Rio Grande do Sul (S region) accounted for 81% of all pesticide use in the country during the 1990s (Dasgupta et al., 2001).

Besides the agricultural use, insecticides are also used for controlling insect-borne diseases, such as malaria, dengue, typhus and leishmaniasis, in Brazil. During the 1950s and 1960s the use of DDT was thought to be appropriate for achieving this goal (D'Amato et al., 2002). After a rapid spread of DDT resistance, other chemical insecticides including pyrethroids were introduced. However, resistance to these compounds has also been developed, becoming a big challenge

in vector control strategies (Hemingway and Ranson, 2000). Since 1996, the Brazilian Government Health Agency has supported the use of pyrethroids as vector control (Santos et al., 2007).

Pyrethroids are organic contaminants with high hydrophobicity ($\log K_{ow}$ ranging between 5.7 and 7.6) and very low water solubility (of a few $\mu\text{g/L}$) (Laskowski, 2002). For these reasons this group of insecticides tend to rapidly bind to suspended particulate matter or sediments (Hill, 1989; Solomon et al., 2001) and low concentration is generally present in water (Feo et al., 2010). Applied to land or for domestic purposes as vector control, pyrethroids can enter the aquatic environment through different processes such as atmospheric deposition, river runoff and municipal treatment discharges. Once associated with sediments, benthic organism exposure of pyrethroids can be via sediment particles (by ingestion or contact) or from interstitial water (Power and Chapman, 1992). In fish, exposure to pyrethroids can be through gill absorption due to their lipophilicity or through food webs.

Historically, concern has existed regarding aquatic organism exposure to pyrethroids, particularly arthropods and fish, because of the high degree of toxicity observed in standard laboratory studies (Mauck and Olson, 1976; Osti et al., 2007; Ural and Saglam, 2005). Pyrethroid 96 h LC50 for fish is typically in the range of 400–2200 ng/L (Stephenson, 1982; Werner and Moran, 2008). Moreover, a number of recent studies have also suggested the carcinogenic, neurotoxic,

* Corresponding author.

E-mail address: eeeqam@cid.csic.es (E. Eljarrat).

immunosuppressive and reproductive potential toxicity of pyrethroids in mammals (Jin et al., 2012; Schafer et al., 2008; Scollon et al., 2011).

However, pyrethroids are considered to be safe because they are converted to non-toxic metabolites, such as phenoxybenzoic acid, by oxidative metabolism in fish and by hydrolysis in mammals (Chambers, 1980; Demoute, 1989; Godin et al., 2007). This seems to be a consequence of the fact that most studies on exposure to pyrethroids are based on the determination of this metabolite in urine samples. Contrary to this assumption, recent works have shown the presence of pyrethroids in human breast milk, with levels up to 1200 ng/g lipid weight (lw) (median value) (Bouwman, 2009; Feo et al., 2012). However, no investigations have been found related to pyrethroid levels in tissues of aquatic organisms. There is only one study reporting the concentration level of cypermethrin in one muscle sample and one liver sample of crucian carp (5.4 ng/g and 7.2 ng/g, respectively) (Zhao et al., 2011).

Marine mammals are at the top of the food chain, which results in high exposure to a number of toxic compounds. Cetaceans have long been used as sentinel species for environmental contamination by organic pollutants. They have a large reserve of energy in the blubber, making them the ideal repository for high concentrations of lipophilic pollutants. Small odontocete cetaceans have also relatively low mobility and a long life span (Bjørge, 2001). Franciscana dolphin (*Pontoporia blainvillei*) is a small cetacean that occurs exclusively in western Atlantic coastal waters. They have limited movement patterns and a small home range (Bordino et al., 2007). Due to its near-shore distribution, this dolphin species are especially vulnerable to the effects of human activities.

The present study investigated the occurrence of twelve pyrethroid compounds (resmethrin, tetramethrin, bifenthrin, λ -cyhalothrin, deltamethrin, tralomethrin, fluvalinate, esfenvalerate, fenvalerate, permethrin, cyfluthrin, cypermethrin) in liver samples from franciscana dolphins along the Brazilian coast, Southwestern Atlantic. The present investigation is the first attempt to determine pyrethroid insecticide levels in marine mammal tissues, supporting their bioaccumulation.

2. Materials and methods

2.1. Area of study

Fig. 1 shows the selected area for this study. The Southeast Brazilian region, where São Paulo State is located, is one of the most developed areas in South America and many coastal ecosystems have historically received discharges of chemical contaminants from domestic, industrial and agricultural wastewaters (Bícego et al., 2006; Yogui et al., 2010). However, Rio Grande do Sul State, in the South Brazilian region, is characterized as an agricultural region, that receives organochlorine pesticides (e.g. DDT) discharges from the Plata River and Patos Lagoon drainages (Leonel et al., 2010; Menone et al., 2001).

2.2. Sample collection

A total of 23 liver samples from male dolphins were collected from two locations along the Brazilian Southeastern Coast (São Paulo State, SP – n = 12, from 2004 to 2008), and from the Southern Coast (Rio Grande do Sul State, RS – n = 11, from 1994 to 2000). Sampling locations ranged from a highly urbanized area (e.g. SP Coast) to a more agricultural zone (e.g. RS coast) (Fig. 1).

The collected samples come from individual dolphins found incidentally caught in fishing nets along the Brazilian coast by a broad set of cetacean research groups. The carcasses were classified as early decomposition stage following Geraci and Lounsbury (2005). Liver samples collected were placed in aluminum foil and stored frozen until lyophilization. Liver samples collected were placed in aluminum foil and stored frozen until lyophilization.

Information on sexual maturity stage was estimated from total length rather than generated by reproductive organ analyses. Franciscana dolphin is a small cetacean that can reach up to 175 cm (Bastida et al., 2007). It was assumed that males were sexually mature whenever longer than 115 cm for SP (Bertozzi, 2009) and 124 cm for RS (Danilewicz et al., 2000, 2004). Multivariate analysis

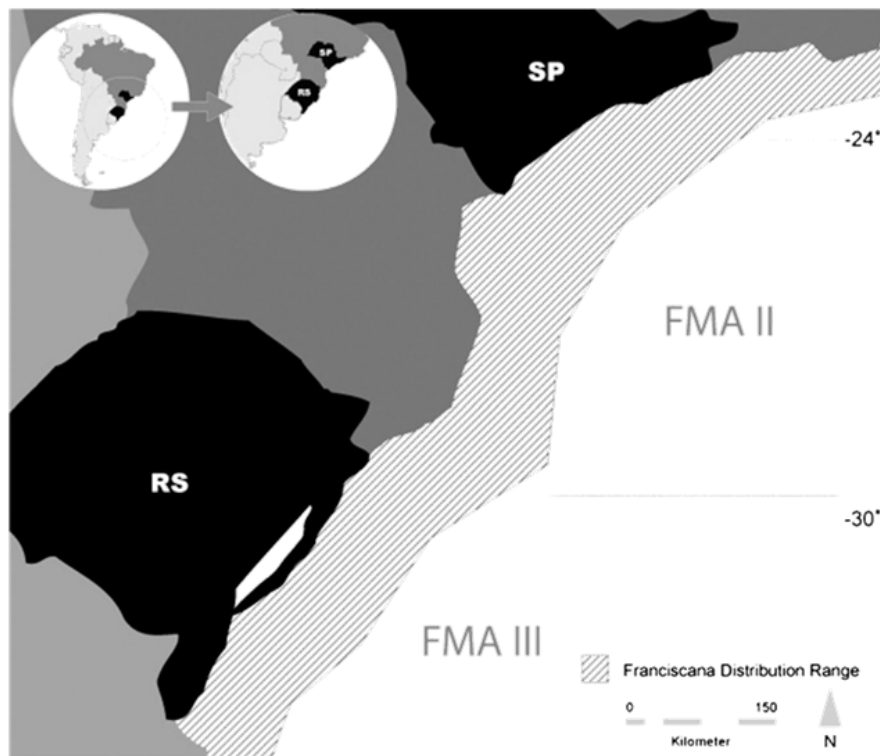


Fig. 1. Map of South America showing the Brazilian sampled states: SP – São Paulo (Southeastern coast) and RS – Rio Grande do Sul (Southern coast).

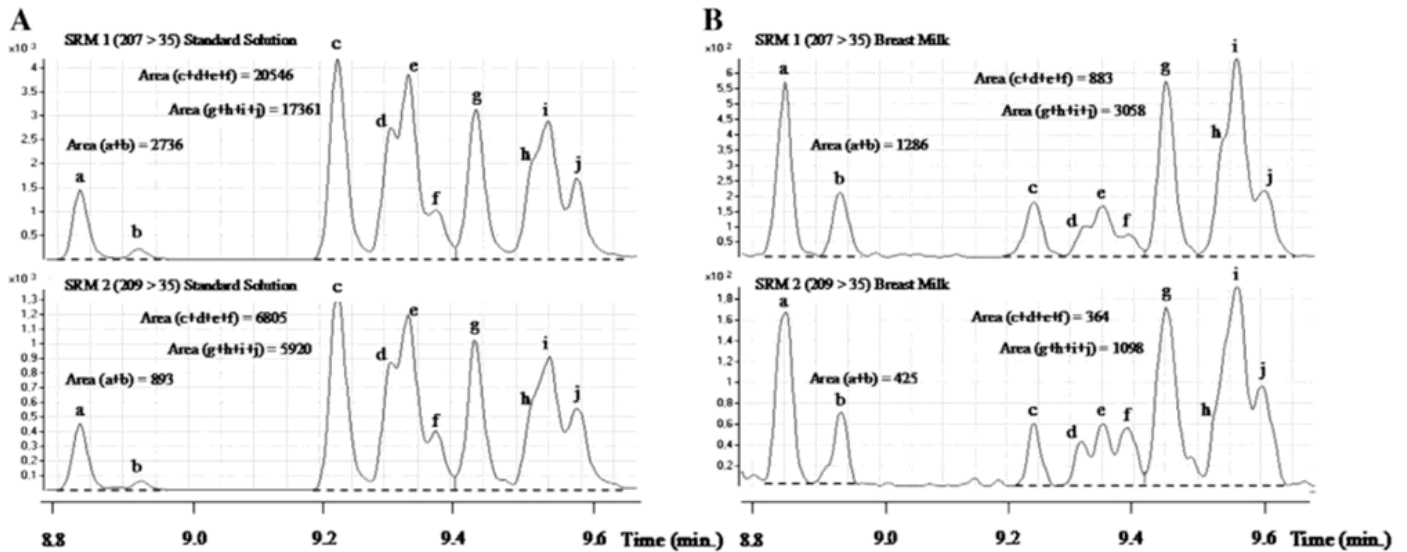


Fig. 2. Chromatograms obtained for the two monitored transitions (SRM1 (207>35) and SRM2 (209>35)) for permethrin (isomers a and b), cyfluthrin (isomers c, d, e and f) and cypermethrin (isomers g, h, i and j), in (A) standard solution and (B) breast milk dolphin sample.

of osteological features (Pinedo, 1991) and a study of molecular biology using mitochondrial DNA (Secchi et al., 1998) suggested the existence of at least two genetically and geographically separated franciscana populations. Individuals were separated in 3 groups of maturity: adults (sexually mature individuals), juveniles (immature animals from 100 cm up to the total length of sexual maturity) and calves (immature dolphins smaller than 100 cm).

Only male dolphins were analyzed in this study in order to investigate potential differences in pyrethroid concentrations among locations and to analyze the metabolic imbalance during the life cycle, in an attempt to avoid the well-known high variation in the burden of lipophilic pollutants of females due to reproductive stage (Dorneles et al., 2010; O'Shea and Tanabe, 2003).

In addition, and in order to assess the mother-to-calf transfer of pyrethroids, three samples of breast milk and three other of placenta were collected from pregnant and lactating dead females incidentally caught that inhabited São Paulo coastal waters from the same population in the same period that the males were sampled. The limited sampling number is a consequence of the great difficulty in obtaining these samples.

2.3. Standards and reagents

All certified pyrethroid standards were obtained from Dr. Ehrenstorfer (Augsburg, Germany). They consist of a standard mixture of six pyrethroids containing cyfluthrin, cypermethrin, deltamethrin, fenvalerate, permethrin and tetramethrin, and single analytical standards of bifenthrin, lambda-cyhalothrin, esfenvalerate, tau-fluvalinate, resmethrin and tralomethrin. d_6 -*trans*-permethrin and d_6 -*trans*-cypermethrin, used as internal standard, were also purchased from Dr. Ehrenstorfer. Hexane, dichloromethane and acetonitrile were obtained from Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA). The solvents used in this study were all pesticide grade.

Standard solutions were prepared in ethyl acetate. In order to check the linearity of the method, calibration curves were prepared at different concentrations ranging between 0.13 and 40 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$.

2.4. Sample preparation

Hepatic pyrethroid analyses were performed using a previously described method (Feo et al., 2012). Liver samples (0.1 g dry weight) were placed in 40 mL glass-centrifuge tubes. Samples were fortified with d_6 -*t*-PERME (4 ng) and d_6 -*t*-CYPE (2 ng) as surrogate standards. Samples were stirred and extracted by sonication with 20 mL of hexane:

dichloromethane (2:1) in a Raypa, UCI-200 bath for 15 min. Then, samples were centrifuged at 3500 rpm for 20 min. The organic phase remained at the top of the conical tube and was entirely transferred to a vial and evaporated under a nitrogen stream. This extraction step was repeated twice and all the solvent residues were collected together. The lipid content was determined gravimetrically. Extracts were cleaned up by elution through C18 (2 g/15 mL) coupled to basic alumina cartridges (5 g/25 mL) and conditioned with 25 mL of acetonitrile. Samples were eluted with 30 mL of acetonitrile. The acetonitrile extract was evaporated under a nitrogen stream and the residue was dissolved in 100 μL of ethyl acetate for GC–NCI–MS–MS analysis.

2.5. Instrumental analysis

GC–MS–MS analysis was performed in negative chemical ionization (Feo et al., 2011) mode on an Agilent Technologies 7890A GC system coupled to 7000A GC/MS Triple Quad. A DB-5 ms capillary column (15 m \times 0.25 mm i.d., 0.1 μm film thickness) containing 5%

Table 1

Analytical quality parameters of pyrethroid methodology applied to male franciscana dolphins liver samples.

| | Blank (ng/g lw) | Recovery (%) | RSD (%) | mLOD (ng/g lw) | mLOQ (ng/g lw) |
|---------------------------|--------------------|-----------------|------------|-------------------|-------------------|
| Resmethrin ^a | nd | 91 | 16 | 0.33 | 1.11 |
| Isomer I | | | | 0.44 | 1.46 |
| Isomer II | | | | 0.44 | 1.48 |
| Tetramethrin | 14.9 | 78 | 16 | 0.14 | 0.46 |
| Bifenthrin | 0.22 | 70 | 20 | 0.03 | 0.10 |
| λ -Cyhalothrin | nq | 82 | 20 | 0.07 | 0.25 |
| Deltamethrin/tralomethrin | 4.99 | 53 | 6 | 0.02 | 0.08 |
| Fluvalinate | nd | 68 | 20 | 0.46 | 1.54 |
| Esfenvalerate/fenvalerate | 3.39 | 57 | 6 | 0.16 | 0.54 |
| Permethrin ^a | 24.9 | 87 | 18 | 0.22 | 0.72 |
| Isomer I | | | | 0.24 | 0.80 |
| Isomer II | | | | 0.71 | 2.38 |
| Cyfluthrin ^b | 7.72 | 91 | 7 | 0.06 | 0.21 |
| Isomer I | | | | 0.11 | 0.37 |
| Isomer II+III+IV | | | | 0.09 | 0.30 |
| Cypermethrin ^b | 11.0 | 116 | 2 | 0.11 | 0.37 |
| Isomer I | | | | 0.18 | 0.60 |
| Isomer II+III+IV | | | | 0.10 | 0.34 |

nd = below mLOD; nq = below mLOQ.

^a mLODs and mLOQs were estimated for each isomer.

^b mLODs and mLOQs were estimated for the first eluting isomer and the three other isomers that coeluted.

Table 2
Basic statistics of pyrethroid concentrations (expressed in ng/g lw) in livers from franciscana dolphin males of Southeastern and Southern Brazil.

| | n | Tetramethrin | Bifenthrin | λ-Cyhalothrin | Delta/tralomethrin | Fluvalinate | Es/Fenvalerate | Permethrin | Cyfluthrin | Cypermethrin | Total |
|--------------------------|---|--------------|------------|---------------|--------------------|-------------|----------------|------------|------------|--------------|-----------|
| <i>Sao Paulo</i> | | | | | | | | | | | |
| Adults | 7 | | | | | | | | | | |
| Mean | | 5.24 | 1.08 | 1.06 | 2.29 | 0.93 | 0.18 | 18.9 | 0.58 | 3.73 | 33.9 |
| Median | | 3.56 | 1.01 | 0.31 | 2.68 | nq | nq | 18.7 | 0.56 | 4.34 | 31.5 |
| Range | | 0.59–15.4 | 0.07–2.56 | nq–4.10 | nd–5.93 | nq–4.36 | nq–1.27 | 4.48–41.8 | nd–1.72 | nq–6.05 | 7.04–59.5 |
| SD | | 5.22 | 0.83 | 1.46 | 2.37 | 1.72 | – | 13.4 | 0.66 | 2.42 | 19.0 |
| Juveniles | 2 | | | | | | | | | | |
| Mean | | 0.96 | 0.64 | 2.90 | 0.16 | 1.02 | 0.48 | 11.0 | 0.23 | 1.58 | 19.0 |
| Median | | 0.96 | 0.64 | 2.90 | 0.16 | 1.02 | 0.48 | 11 | 0.23 | 1.58 | 19.0 |
| Range | | 0.62–1.30 | nq–1.29 | 0.40–5.39 | nq–0.32 | nq–2.04 | nq–0.95 | 9.24–12.8 | nq–0.46 | 1.22–1.94 | 12.5–25.5 |
| SD | | 0.48 | 0.91 | 3.53 | 0.23 | 1.44 | 0.67 | 2.53 | 0.32 | 0.50 | 9.20 |
| Calves | 3 | | | | | | | | | | |
| Mean | | 3.09 | 0.77 | 0.39 | 0.98 | 1.07 | 0.50 | 31.6 | 1.10 | 4.02 | 43.6 |
| Median | | 2.59 | 0.85 | 0.35 | 0.96 | nq | 0.57 | 31.2 | 1.61 | 3.28 | 41.2 |
| Range | | 2.40–4.28 | 0.24–1.22 | nq–0.83 | nd–1.99 | nq–3.22 | nq–0.93 | 9.08–54.6 | nq–1.70 | 3.05–5.75 | 21.1–68.4 |
| SD | | 1.04 | 0.49 | 0.42 | 0.99 | 1.86 | 0.47 | 22.8 | 0.96 | 1.50 | 23.8 |
| <i>Rio Grande do Sul</i> | | | | | | | | | | | |
| Adults | 5 | | | | | | | | | | |
| Mean | | 4.21 | 0.21 | 0.47 | 0.86 | nq | 0.36 | 9.66 | 0.40 | 2.34 | 18.5 |
| Median | | 4.75 | 0.10 | 0.51 | 0.96 | nq | nq | 7.66 | nq | 2.47 | 16.8 |
| Range | | 0.86–8.99 | nq–0.83 | nd–0.98 | nq–1.65 | nd–nq | nq–0.93 | 5.08–20.4 | nd–1.43 | 1.59–2.98 | 9.85–28.6 |
| SD | | 3.42 | 0.35 | 0.47 | 0.77 | – | 0.49 | 6.12 | 0.63 | 0.60 | 7.21 |
| Juveniles | 5 | | | | | | | | | | |
| Mean | | 2.78 | 0.10 | 0.18 | 0.24 | 1.66 | 0.45 | 10.4 | 1.00 | 7.10 | 22.8 |
| Median | | 1.82 | nq | nq | nq | 1.66 | 0.48 | 9.04 | 1.33 | 2.54 | 18.0 |
| Range | | 1.60–4.91 | nd–0.28 | nd–0.92 | nd–0.72 | nq–5.58 | nq–0.91 | 7.70–18.0 | nq–1.81 | 2.03–24.8 | 14.1–46.0 |
| SD | | 1.85 | 0.14 | 0.41 | 0.34 | 2.49 | 0.44 | 4.32 | 0.74 | 9.91 | 13.1 |
| Calf | 1 | | | | | | | | | | |
| | | 6.67 | 0.10 | nq | 5.36 | nq | 3.64 | 11.1 | 3.45 | 4.93 | 35.3 |

nd = below mLOD; nq = below mLOQ.

phenyl methyl siloxane was used with helium as carrier gas at constant flow of 1 mL min⁻¹. The temperature program was from 100 °C (held for 1 min) to 230 °C at 15 °C min⁻¹, then from 230 to 310 °C (held for 2 min) at 10 °C min⁻¹, using the splitless injection mode during 0.8 min. Inject volume was 3 μL. The inlet temperature was set at 275 °C and ion source temperature at 250 °C. Ammonia was used as reagent gas at 2 × 10⁻⁴ Torr. More details on MS–MS condition and selected transitions were reported elsewhere (Feo et al., 2010, 2011).

2.6. Quality assurance

Quality parameters of the method had been evaluated. For this purpose, recovery tests were carried out by addition of each pyrethroid to a liver sample. These samples were previously analyzed in

order to determine pyrethroid presence before spiking (blank). Three replicates were prepared for the evaluation of the reproducibility of the method. The limits of detection of the method (mLOD), defined as 3 times the noise level, and the limit of quantification of the method (mLOQ), defined as 10 times the noise level, were calculated.

2.7. Statistical analyses

Statistical analyses were conducted using the SPSS 17.0 statistical package. The level of statistical significance was defined at p < 0.05. Non parametric statistical tests were used since the data were found to have a non-normal distribution (Shapiro Wilk's W test). Individual one-way analysis of variances (ANOVAs) followed post hoc by Tukey's honestly significant difference (HSD) tests were then used to determine which locations were significantly different between

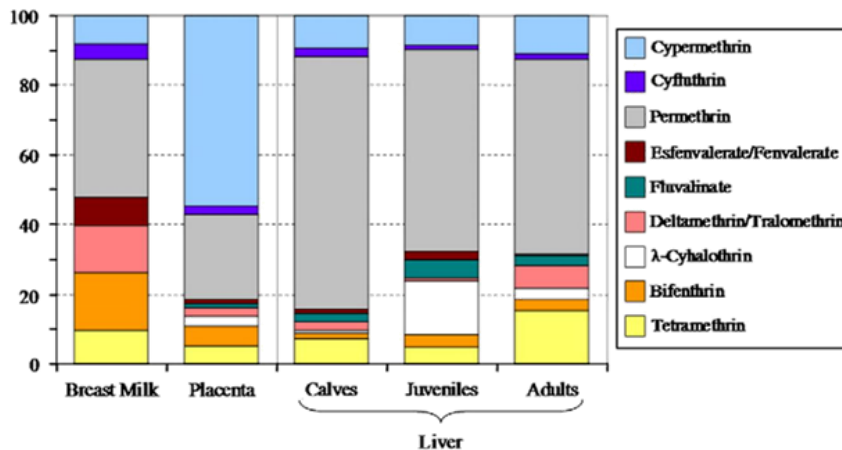


Fig. 3. Percentage contribution of each pyrethroid to total contamination in liver (calves, juveniles and adults), breast milk and placenta samples from franciscana dolphins of São Paulo coast.

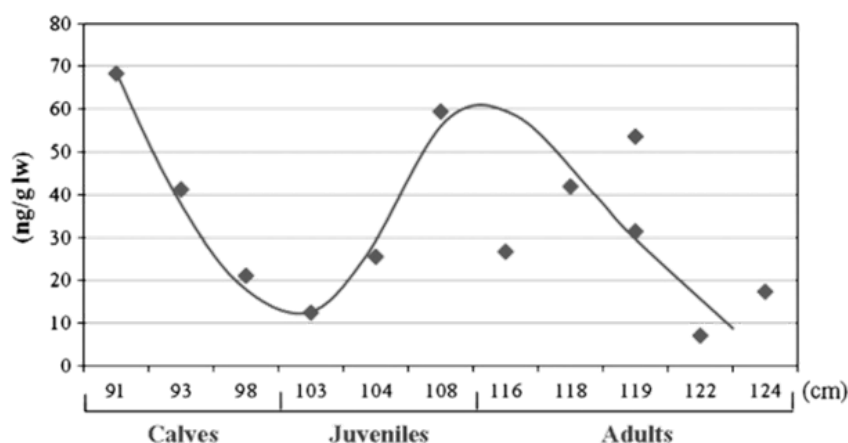


Fig. 4. Pyrethroid concentrations (ng/g lw) according to total body length (cm) of males franciscana dolphins from São Paulo coast, Brazil.

the concentrations and profile of pyrethroid compounds in age-groups (adults, juveniles and calves). Spearman's coefficients were calculated to understand the correlation between age groups, locations and concentrations and profiles of pyrethroid insecticides.

3. Results and discussion

3.1. Quality control

Quality parameters of the methodology applied for the determination of pyrethroid insecticides in liver dolphin samples were summarized in Table 1. Recoveries ranged between 53 and 116%, with relative standard deviation (RSD) values lower than 20%. mLODs ranged between 0.02 and 0.71 ng/g lw, and mLOQs ranged between 0.08 and 2.38 ng/g lw.

The GC–MS–MS identification of pyrethroids was based on the following criteria: (i) simultaneous responses for the two monitored transitions (SRM1 and SRM2) must be obtained at the same retention time than those of available standards; (ii) signal-to-noise ratios must be >3 ; and (iii) relative peak intensity ratio must be within $\pm 20\%$ of the theoretical values obtained with standard solutions. As an example, Fig. 2 shows the chromatograms obtained for permethrin, cyfluthrin and cypermethrin in a breast milk sample. Relative peak intensity ratios (SRM1 (207 > 35)/SRM2 (209 > 35)) were calculated for the milk sample, with values of 3.03, 2.43 and 2.79 for permethrin, cyfluthrin and cypermethrin, respectively. Similar values were obtained for the standard solution (3.06, 3.02 and 2.93), with RSDs lower than 20%.

3.2. Pyrethroid levels in dolphin livers

Hepatic pyrethroid concentrations in franciscana dolphins from two Brazilian states, SP and RS, are presented in Table 2. Results were expressed in lw and the dolphin samples were separated by age classes (adults, juveniles and calves). The lipid content in liver ranged from 2 to 16% (mean 5.9%, SD 4.2) and from 6 to 13% (mean 7.7%, SD 2.2) in São Paulo and Rio Grande do Sul male dolphins, respectively. No significant differences among states or sexual maturity were observed. All targeted pyrethroid compounds were detected in liver samples, with the exception of resmethrin that was not found in any sample. Deltamethrin and tralomethrin were detected in 73–75% of the samples and cyfluthrin in 82–83% of the samples from both states. In RS, tetramethrin and λ -cyhalothrin were detected in 82% of the samples while bifenthrin and fluvalinate were detected in 91%. The other pyrethroids were found in all samples from both study areas.

Total pyrethroid concentrations ranged from 7.04 (adult from SP) to 68.4 (calf from SP) ng/g lw. Permethrin was the compound that

presented the highest concentrations, which ranged from 4.48 ng/g lw (adult from SP) to 54.6 ng/g lw (calf from SP). The next compounds in descendent order of concentrations were cypermethrin (below mLOQ (nq) to 24.8 ng/g lw), followed by tetramethrin (0.59 to 15.4 ng/g lw), deltamethrin/tralomethrin (below mLOD (nd) to 5.93 ng/g lw), fluvalinate (nq to 5.58 ng/g lw), λ -cyhalothrin (nq to 5.39 ng/g lw), esfenvalerate/fenvalerate (nq to 3.64 ng/g lw), cyfluthrin (nd to 3.45 ng/g lw) and bifenthrin (nq to 2.56 ng/g lw).

Fig. 3 shows the mean percentage contribution of each pyrethroid to the total pyrethroid content in calf, juvenile and adult dolphins. Permethrin was the predominant pyrethroid in all samples, with mean percentage contribution of 73%, 58% and 56% in calf, juvenile and adult dolphins, respectively. The next contributing compounds are tetramethrin and cypermethrin, with contribution values between 5–15% and 8–11%, respectively.

To be able to compare concentrations in the two dolphin populations from the two selected areas, it is important to remark that franciscana dolphins have limited movement patterns and a small home range (Bordino et al., 2007). It is worth mentioning that a correct comparison should be carried out with samples collected in the same period. This is not the case, since the RS samples were collected during 1994–2000, while SP samples were taken between 2004 and 2008. As no information regarding the use of pyrethroids over these years, and assuming that such use has remained constant, we compare the concentration values obtained in the two different locations selected for this study. We found higher pyrethroid levels in dolphin samples collected in SP. This fact may indicate a greater use of pyrethroids in urban areas (SP) compared with their application for agricultural purposes (RS). Similar findings were observed by Weston et al. (2009a) in California, where the urban runoff contributed more to pyrethroid input than the discharge of irrigation runoff. Although, in the colder areas, as the temperate zone of RS, pyrethroids could become more toxic (Weston et al., 2009b, 2011) and could put franciscanas from Southern Brazil at risk even at lower concentrations. Regarding specific pyrethroids, significantly higher concentrations were found in dolphins from SP than in individuals from RS for bifenthrin and permethrin ($p=0.003$ and 0.043 , respectively). Also deltamethrin/tralomethrin concentrations presented significant differences, with values up to 5 times higher in calves from RS than in those from SP coast. These could be related to their use in Rio Grande do Sul State since 1980s for controlling stored grain insects (Lorini and Galley, 1999).

Total pyrethroid concentrations had a peculiar pattern of distribution according to the total length of the sampled dolphins (Fig. 4). The major concentrations appeared in the smallest individuals (calves) and decreased until dolphins reached youth. Then, the concentrations started to increase again when approaching the age of sexual maturation. Finally, concentration levels began to decline again. This profile

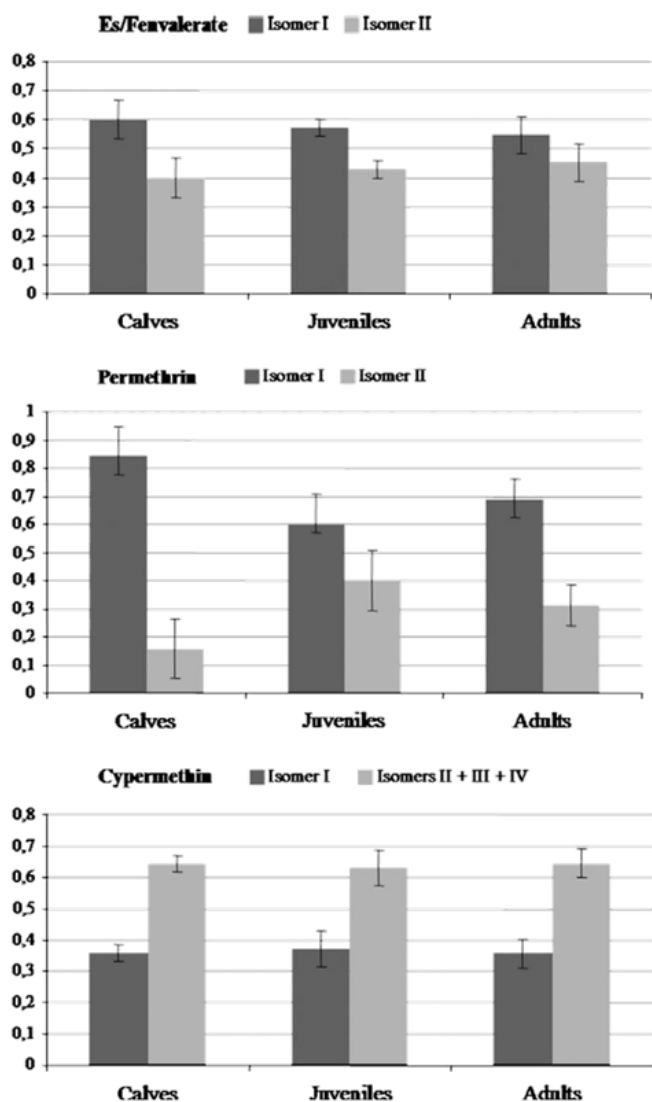


Fig. 5. IF values of esfenvalerate/fenvalerate, permethrin and cypermethrin isomers in calf, juvenile and adult liver samples from franciscana dolphins collected in Brazilian coast (SP and RS).

could be explained as follows: the high levels in calves may be due to a high load of pyrethroids received by the dolphin from maternal transfer. According to animal growth, pyrethroid concentrations could dilute in its body and then return to accumulate with predation on squids and fish until the sexual maturity. When adults, these

Table 3
Pyrethroids concentrations (expressed in ng/g lw) in milk and placenta from franciscana dolphin of Southeastern Brazil.

| | Breast Milk | | | Placenta | | |
|---------------------------|-------------|-----|-----|----------|-----|------|
| | n=1 | n=2 | n=3 | n=1 | n=2 | n=3 |
| Tetramethrin | 0.6 | 0.2 | 0.1 | 37 | 25 | 96 |
| Bifenthrin | 0.7 | 0.4 | 0.6 | 38 | 51 | 86 |
| λ -Cyhalothrin | nq | nq | nq | 22 | 9.3 | 49 |
| Deltamethrin/tralomethrin | 0.3 | 0.4 | 0.6 | nd | 13 | 39 |
| Fluvalinate | nq | nq | nq | 20 | 7.1 | nq |
| Esfenvalerate/fenvalerate | 0.4 | 0.2 | 0.2 | 6.9 | 12 | 10 |
| Permethrin | 2.3 | 0.9 | 0.8 | 259 | 103 | 385 |
| Cyfluthrin | 0.2 | 0.1 | 0.1 | 14 | 15 | 42 |
| Cypermethrin | 0.3 | 0.2 | 0.3 | 459 | 96 | 1106 |
| Total | 4.8 | 2.5 | 2.7 | 856 | 331 | 1812 |

nd = below mLOD; nq = below mLOQ.

mammals seem to be able to degrade/metabolize pyrethroid compounds. This would be the explanation for the fact that the lowest concentrations were found in the longer franciscana dolphins. However, it should be noted that this hypothesis is based on a very limited sample number. Therefore, future studies involving a larger number of individuals are required. Moreover, some other assumptions must be also confirmed through additional determinations. For instance, there are not currently available data reporting pyrethroid levels in fish in order to support the accumulation by food intake.

It is known that isomeric composition is an important toxicological parameter for a number of compounds. In order to quantify the weight of each isomer of selected pyrethroids in dolphin samples, the isomeric factor (IF) was calculated as the proportion of one isomer relative to the total of analyte:

$$IF_{ij} = A_{ij}/A_{IT} \quad (2)$$

where *i* is a pyrethroid, *j* is one isomer, A_{ij} is the area of the isomer *j* and A_{IT} is the total area of pyrethroid *i*. In this study, these IF values have been calculated in order to detect potential isomer-specific mechanisms. For instance, to determine whether there is a greater accumulation of a specific isomer or if there is a greater degradation of one of the isomers in the mammalian metabolism. Fig. 5 shows the IF values obtained for three different pyrethroids (esfenvalerate/fenvalerate, permethrin and cypermethrin) separated by age classes (calves, juveniles and adults). As can be seen, the behavior of esfenvalerate/fenvalerate was similar, with no significant differences between IF values for calves (0.53–0.67), juveniles (0.54–0.61) and adults (0.48–0.63). Also for cypermethrin there are no differences between the contribution of isomer I and the sum of isomers II + III + IV. In this case, the first eluting isomer is the less contributing, with IS values between 0.33 and 0.38 for calves, 0.30–0.49 for juveniles and 0.28–0.42 for adults. However, some differences can be observed for permethrin. IF values are similar for juveniles (mean value of 0.60) and adults (mean value of 0.69) indicating that there is no isomer-specific metabolism of this pyrethroid when dolphins reach sexual maturity and become able to degrade/metabolize pyrethroids. In contrast, IF values for calves (mean value of 0.84) showed a higher contribution of the first isomer compared with juveniles and adults. These results indicate that there may be an isomer-specific accumulation of the isomer II during the pyrethroid accumulation by food intake in juvenile dolphins. Obviously, it would be necessary to study a larger number of individuals in order to confirm this behavior. However, an enrichment of the isomer II of permethrin was also observed in a recent study on humans (Feo et al., 2012).

3.3. Maternal transfer of pyrethroids

Based on these results, we proceeded to evaluate the potential maternal transfer of these compounds through the analysis of breast milk and placenta samples. Breast milk reflects maternal body burden and the post-natal transfer of pyrethroids from mothers to calves, whereas placenta provides a good indication for pre-natal exposure. Three milk and three placenta samples of franciscanas from SP were analyzed. Pyrethroids were detected in both matrices, with values between 2.5–4.8 ng/g lw and 331–1812 ng/g lw, for breast milk and placenta, respectively (Table 3). So for the first time, this study shows the maternal transfer of pyrethroids by both gestational and lactation pathways.

It is interesting to note that pyrethroid distribution presented some differences between milk and placenta samples (Fig. 3). Similar to the distribution observed in liver samples, permethrin is the dominating pyrethroid in milk samples, with a mean contribution of 40% of the total. In placenta samples the contribution of permethrin decreased to 25%. Also for bifenthrin, the contribution decreased when we move from milk (17%) to placenta (6%) samples. Similar behavior

was also observed for tetramethrin (from 10% to 5%), deltamethrin/tralomethrin (from 13% to 3%), esfenvalerate/fenvalerate (from 8% to 1%) and cyfluthrin (from 5% to 2%). In contrast, other compounds presented higher contributions in placenta compared with those of milk samples. The most prominent was the case of cypermethrin, which becomes the dominant pyrethroid in placenta with a mean contribution of 55%, whereas their contribution in milk samples was only 8%. Moreover, λ -cyhalothrin and fluvalinate were not detected in milk samples, and their contributions in placenta were 3% and 1%, respectively. Analyzing this scenario we can assume that some pyrethroids, such as permethrin, bifenthrin, tetramethrin, deltamethrin/tralomethrin were maternally transferred through both gestational and lactation pathways, but mainly through the breast milk. In contrast, other pyrethroids, such as cypermethrin were basically transferred through gestational pathways by the placenta. The different pyrethroid behavior may be due to their physico-chemical properties.

4. Conclusions

Contrary to the assumption that pyrethroid insecticides converted to non-toxic metabolites by hydrolysis in mammals, the present study showed for the first time the presence of different pyrethroids in marine mammal tissues, supporting their bioaccumulation. The effects of these compounds are still unknown, but cypermethrin, permethrin and bifenthrin were classified by EPA as possible human carcinogens (Cox, 1996). In addition, it is known that cypermethrin is harmful to aquatic life even in low levels (Friberg-Jensen et al., 2003; Gowland et al., 2002; Jaensson et al., 2007).

Results showed a distinct metabolic balance of pyrethroids in the different life stages of dolphins: high levels in calves may be due to the maternal transfer, and when adults, these mammals seem to be able to degrade/metabolize pyrethroids. Maternal transfer was evaluated through the analysis of breast milk and placenta samples. And, for the first time, this study shows mother-to-calf transfer of pyrethroids by both gestational and lactation pathways. However, it should be noted that the hypothesis of a lack of metabolism in young specimens is based on a very limited sample number. Therefore, future studies involving a larger number of individuals are required before strong conclusions are drawn.

Taking into account the potential toxic effects of pyrethroids and the exposure to these pollutants in an early period of life, the need for further studies related to marine mammal exposure to these compounds becomes clear. Some recent works have also raised a similar concern in humans, as the presence of pyrethroids was found in human breast milk samples from different geographical areas (Africa, America and Europe) (Corcellas et al., 2012; Feo et al., 2012; Sereda et al., 2009).

Acknowledgments

This research was funded by the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness (CEMAGUA – CGL2007-64551/HID), Ministry of Education of Brazil – CAPES (fellowship to M.B. Alonso “Sandwich Programme” – PDEE; “Ciencias do Mar” – Proc. 23038.051661/2009-18), Brazilian Research Council – CNPq (grant #304826/2008-1 and #305303/2010-4) and scholarship to E.R. Secchi (PQ 305219/2008-1), FAPERJ (Jovem Cientista do Nosso Estado #101.449/2010), Mount Sinai School of Medicine (NY/USA), and Fogarty International Center NIH/USA (grant 1D43TW0640). The authors are grateful to the fishermen and to Projeto Biopesca, LTMM-FURG and Oceanographic Museum “Prof. Eliézer C. Rios” staff for the assistance in fieldwork, as well as Cetacean Society International (CSI), Society for Marine Mammalogy (SMM) and Yaqu Pacha. Thanks to all students from Laboratory of Environmental Chemistry (CSIC – Spain), Radioisotope Laboratory (UFRJ – Brazil), Aquatic Mammal and Bioindicator Laboratory (UERJ – Brazil) and Research Group “Ecologia e Conservação da Megafauna Marinha – EcoMega/CNPq”.

References

- Bastida R, Rodríguez D, Secchi ER, da Silva VMF. Mamíferos Acuáticos de Sudamérica y Antártida. Buenos Aires, Argentina: Vasquez Mazzini Editores; 2007.
- Bertozzi CP. Interação com a pesca: implicações na conservação da toninha, *Pontoporia blainvilliei* (Cetacea, Pontoporiidae) no litoral do estado de São Paulo, SP. PhD. São Paulo: Instituto Oceanográfico da Universidade de São Paulo; 2009.
- Bicego MC, Taniguchi S, Yogui GT, Montone RC, Silva DAM, Lourenço RA, et al. Assessment of contamination by polychlorinated biphenyls and aliphatic and aromatic hydrocarbons in sediments of the Santos and São Vicente Estuary System, São Paulo, Brazil. *Mar Pollut Bull* 2006;52:1804–16.
- Björge A. How persistent are marine mammal habitats in an ocean of variability? Habitat use, home range and site fidelity in marine mammals. In: Evans PGH, Raga JA, editors. *Marine mammals: biology and conservation*. New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers; 2001. p. 63–91.
- Bordini P, Wells RS, Stammer MA. Site fidelity of franciscana dolphins *Pontoporia blainvilliei* of Argentina. 17th biennial conference on the biology of marine mammals, Cape Town, South Africa; 2007.
- Bouwman HHK. Malaria control insecticides residues in breast milk: the need to consider infant health risks. *Environ Health Perspect* 2009;117:1477–80.
- Chambers J. An introduction to the metabolism of pyrethroids. *Residue Rev* 1980;73:101–24.
- Corcellas C, Feo ML, Torres JPM, Malm O, Campo-Duque W, Eljarrat E, Barceló D. Pyrethroids in human breast milk: occurrence and nursing daily intake estimation. *Environ Int* 2012;47:17–22.
- Cox C. Insecticide factsheet: cypermethrin. *J Pestic Reform* 1996;16:15–20.
- D’Amato C, Torres JPM, Malm O. DDT (dicloro difenil tricloroetano): toxicidade e contaminação ambiental – uma revisão. *Quim Nova* 2002;25:995–1002.
- Danilewicz DS, Secchi ER, Ott PH, Moreno I. Analysis of the age at sexual maturity and reproductive rates of franciscana (*Pontoporia blainvilliei*) from Rio Grande do Sul, Southern Brazil. *Comun Mus Ciênc Tecnol PUCRS* 2000;13:89–98.
- Danilewicz D, Claver JA, Perez Carrera AL, Secchi ER, Fontoura NF. Reproductive biology of male franciscanas (*Pontoporia blainvilliei*) (Mammalia: Cetacea) from Rio Grande do Sul, southern Brazil. *Fish Bull* 2004;102:581–92.
- Dasgupta S, Mamingi N, Meisner C. Pesticide use in Brazil in the area of agroindustrialization and globalization. *Environ Dev Econ* 2001;6:459–82.
- Demoute J. A brief review of the environmental fate and metabolism of pyrethroids. *Pest Sci* 1989;27:375–85.
- Dorneles PR, Lailson-Brito J, Durtu AC, Weijs L, Azevedo AF, Torres JPM, et al. Anthropogenic and naturally-produced organobrominated compounds in marine mammals from Brazil. *Environ Int* 2010;36:60–7.
- Feo ML, Eljarrat E, Barceló D. A rapid and sensitive analytical method for the determination of 14 pyrethroids in water samples. *J Chromatogr A* 2010;1217:2248–53.
- Feo ML, Eljarrat E, Barceló D. Performance of gas chromatography/tandem mass spectrometry in the analysis of pyrethroid insecticides in environmental and food samples. *Rapid Commun Mass Spectrom* 2011;25:869–76.
- Feo ML, Eljarrat E, Manaca MN, Dobaño C, Barceló D, Sunyer J, et al. Pyrethroid use-malaria control and individual applications by households for other pests and home garden use. *Environ Int* 2012;38:67–72.
- Friberg-Jensen U, Wendt-Rasch L, Woin P, Christoffersen K. Effects of pyrethroid insecticide cypermethrin on freshwater community studied under field conditions. I. Direct and indirect effects on abundance measures of organisms at different trophic levels. *Aquat Toxicol* 2003;63:357–71.
- Geraci JR, Lounsbury VJ. *Marine mammals ashore: a field guide for strandings*. 2nd ed. Baltimore: National Aquarium in Baltimore; 2005.
- Godin S, Crow J, Scollon E, Hughes M, DeVito M, Ross M. Identification of rat and human cytochrome P450 isoforms and a rat serum esterase that metabolize the pyrethroid insecticides deltamethrin and esfenvalerate. *Drug Metab Dispos* 2007;35:1664–71.
- Gowland B, Moffat C, Stagg R, Houlihan D, Davies I. Cypermethrin induces glutathione S-transferase activity in the shore crab, *Carcinus maenas*. *Mar Environ Res* 2002;54:169–77.
- Hemingway J, Ranson H. Insecticide resistance in insect vectors of human disease. *Annu Rev Entomol* 2000;45:371–91.
- Hill I. Aquatic organisms and pyrethroids. *Pest Sci* 1989;27:429–65.
- Jaensson A, Scott AP, Moore A, Kylin H, Olson KH. Effects of a pyrethroid pesticide on endocrine responses to female odours and reproductive behaviour in male parr of brown trout (*Salmo trutta* L.). *Aquat Toxicol* 2007;81:1–9.
- Jin Y, Liu J, Wang L, Chen R, Zhou C, Yang Y, et al. Permethrin exposure during puberty has the potential to enantioselectively induce reproductive toxicity in mice. *Environ Int* 2012;42:144–51.
- Laskowski D. Physical and chemical properties of pyrethroids. *Rev Environ Contam Toxicol* 2002;174:49–170.
- Leonel J, Sericano JL, Fillmann G, Secchi E, Montone RC. Long-term trends of polychlorinated biphenyls and chlorinated pesticides in franciscana dolphin (*Pontoporia blainvilliei*) from Southern Brazil. *Mar Pollut Bull* 2010;60:412–8.
- Lorini I, Galley DJ. Deltamethrin resistance in *Rhyzopertha dominica* (F.) (Coleoptera: Bostrichidae), a pest of stored grain in Brazil. *J Stored Prod Res* 1999;35:37–45.
- Martinelli S, Omoto C. Resistência de lepidópteros-praga a inseticidas na cultura do algodão no Brasil. *Rev Bras Ol Fibras* 2006;10:1167–82.
- Mauck L, Olson L. Toxicity of natural pyrethrins and five pyrethroids to fish. *Arch Environ Contam Toxicol* 1976;4:18–26.
- Menone ML, Moreno JEA, Moreno VJ, Lanfranchi AL, Metcalfe TL, Metcalfe CD. Organochlorine pesticides and PCBs in a southern Atlantic coastal lagoon watershed, Argentina. *Arch Environ Contam Toxicol* 2001;40:355–62.

- O'Shea TJ, Tanabe S. Persistent ocean contaminants and marine mammals: a retrospective overview. In: Vos JG, Bossart GD, Fournier M, O'Shea TJ, editors. Toxicology of marine mammals. London: Taylor and Francis; 2003. p. 99–134.
- Osti SC, Varoli F, Matushima E, Bernardi M. Comparative studies of deltamethrin acute toxicity in exotic and Brazilian fish. *J Braz Soc Ecotoxicol* 2007;2:101–6.
- Pinedo MC. Development and variation of the franciscana, *Pontoporia blainvillei*. PhD Thesis – University of California. 1991. 406 pp.
- Power E, Chapman P. Assessing sediment quality. In: Burton GA, editor. Sediment toxicity assessment. Boca Raton, FL, USA: Lewis; 1992. p. 1–8.
- Santos RLC, Fayal AS, Aguiar AEF, Vieira DBR, Póvoa MM. Evaluation of the residual effect of pyrethroids on Anopheles in the Brazilian Amazon. *Rev Saude Publica* 2007;41:276–83.
- Schafer T, Rijal S, Gross G. Complete inhibition of spontaneous activity in neuronal networks in vitro by deltamethrin and permethrin. *Neurotoxicology* 2008;29:203–12.
- Scollon EJ, Starr JM, Crofton KM, Wolansky MJ, DeVito MJ, Hughes MF. Correlation of tissue concentrations of the pyrethroid bifenthrin with neurotoxicity in the rat. *Toxicology* 2011;290:1–6.
- Secchi ER, Wang JY, Murray B, Rocha-Campos CC, White BN. Population differentiation in the franciscana (*Pontoporia blainvillei*) from two geographic locations in Brazil as determined from mitochondrial DNA control region sequences. *Can J Zool* 1998;76:1622–7.
- Sereda B, Bouwman H, Kylin H. Comparing water, bovine milk, and indoor residual spraying as possible sources of DDT and pyrethroid residues in breast milk. *J Toxicol Environ Health A* 2009;72:842–51.
- Solomon K, Giddings J, Maund S. Probabilistic risk assessment of cotton pyrethroids in aquatic ecosystems: 1. Distributional analyses of laboratory aquatic toxicity data. *Environ Toxicol Chem* 2001;20:652–9.
- Stephenson RR. Aquatic toxicology of cypermethrin. I. Acute toxicity to some freshwater fish and invertebrates in laboratory tests. *Aquat Toxicol* 1982;2:175–85.
- Ural MS, Saglam N. A study on the acute toxicity of pyrethroid deltamethrin on the fry rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum, 1792). *Pestic Biochem Physiol* 2005;83:124–31.
- Werner I, Moran K. Effects of pyrethroid insecticides on aquatic organisms. In: Gan J, Spurluck F, Hendley P, Weston D, editors. Synthetic pyrethroids: occurrence and behaviour in aquatic environments, vol. 991. ACS symposium series: American Chemical, Washington, DC; 2008.
- Weston DP, Holmes RW, Lydy MJ. Residential runoff as a source of pyrethroid pesticides to urban creeks. *Environ Pollut* 2009a;157:287–94.
- Weston DP, You J, Harwood AD, Lydy MJ. Whole sediment toxicity identification evaluation tools for pyrethroid insecticides: III. Temperature manipulation. *Environ Toxicol Chem* 2009b;28:173–80.
- Weston DP, Asbell AM, Hecht SA, Scholz NL, Lydy MJ. Pyrethroid insecticides in urban salmon streams of the Pacific Northwest. *Environ Pollut* 2011;159:3051–6.
- Yogui GT, Santos MCO, Bertozzi CP, Montone RC. Levels of persistent organic pollutants and residual pattern of DDTs in small cetaceans from the coast of Sao Paulo, Brazil. *Mar Pollut Bull* 2010;60:1862–7.
- Zhao D, Liu X, Shi W, Liu R. Determination of cypermethrin residues in crucian carp tissues by MSPD/GC-ECD. *Chromatographia* 2011;73:1021–5.

4.3.2.2 Determinació en dofins comuns

El segon treball en ecosistemes marins es va fer amb la col·laboració de l'Estació Biològica de Doñana i el CIRCE (Conservació, informació i recerca de cetacis). Gràcies a ells es van aconseguir les mostres de dofins comuns varats en les costes andaluses de la [Publicació 5](#). Els dofins comuns (*Delphinus delphis*) són una espècie que està en perill d'extinció en el Mediterrani. Per aquest motiu molts autors intenten entendre els contaminants als quals aquests cetacis estan exposats i tractar d'aclarir els factors pels quals el nombre d'individus d'aquesta espècie en el Mediterrani està decreixent.

L'objectiu d'aquest estudi era evidentment, comprovar la presència de piretroides en dofins del Mediterrani. Tot i així, també hi havia un objectiu més ambiciós: ser capaç d'entendre la distribució dels piretroides pels diferents òrgans d'aquests odontocets i, per extrapolació, dels mamífers en general. Amb aquesta informació, es pretenia obtenir unes directrius per tal de esbrinar el millor teixit per monitorejar la presència de piretroides en possibles campanyes posteriors.

Publicació 5:

TISSUE DISTRIBUTION OF PYRETHROID INSECTICIDES IN MEDITERRANEAN COMMON DOLPHINS

Cayo Corcellas ; Joan Giménez ; Renaud de Stephanis ;
Ethel Eljarrat ; Damià Barceló

Environmental Pollution (2017, enviat)

IF (2015): 4,839



TISSUE DISTRIBUTION OF PYRETHROID INSECTICIDES IN MEDITERRANEAN COMMON DOLPHINS

Cayo Corcellas¹, Joan Giménez², Renaud de Stephanis³, Ethel Eljarrat^{1*}, Damià Barceló^{1,4}

¹Water and Soil Quality Research Group, Department of Environmental Chemistry, Institute of Environmental Assessment and Water Research Studies (IDAEA), Spanish Council for Scientific Research (CSIC), Jordi Girona 18-26, 08034 Barcelona, Spain.

²Department of Conservation Biology, Estación Biológica de Doñana (EBD), Spanish Council for Scientific Research (CSIC), Américo Vespucio 26, Isla Cartuja, 41092, Sevilla, Spain.

³Conservation, Information and Research on Cetaceans (CIRCE), Cabeza de Manzaneda 3, Algeciras-Pelayo, 11390 Cádiz, Spain.

⁴Catalan Institute for Water Research (ICRA), H2O Building, Scientific and technological Park of the University of Girona, Emili Grahit 101, 17003 Girona, Spain.

* E-mail contact: eeeqam@idaea.csic.es

Abstract

Recently, pyrethroid insecticides (PYR) have been proposed to be included in environmental quality and monitoring studies in the Mediterranean Sea due to its occurrence in dolphin samples in similar concentrations than some persistent organic pollutants. Here, eleven specimens of common dolphin (*Delphinus delphis*) were analysed for determination of pyrethroid insecticides in their tissues. All individuals were found stranded in the Spanish Mediterranean coast. Samples of blubber, brain, kidney, liver and muscle were processed to assess the PYR exposure and their distribution among different dolphin tissues. PYR residues were found in all samples, with permethrin being the main contributor to the pyrethroid burden. Levels of PYRs in liver ranged from 17.1 to 155 ng g⁻¹ dry weight (68.8-2306 ng g⁻¹ lipid weight). Total body burden was estimated between 1.25 and 6.64 mg of PYR, being blubber the main tissue contributor. Besides, distribution of PYR in tissues showed that the preferred matrix to monitor these pollutants should be liver in dead animals. However, blubber could be used in live specimens. The convenience of expressing results in dw basis was also discussed.

Keywords: *Delphinus delphis*, Insecticides, Marine pollution, Pyrethroids, Permethrin, Tissue distribution.

Introduction

Pyrethroids (PYRs) are semi-synthetic insecticides derived from pyrethrins, with high lipophilic behaviour. They are structurally related with the chrysanthemic acid and their esters. They are classified as Type I and II depending on their structure. Both types have chiral centres, which makes them optically active. Type I usually present 2 enantiomeric pairs whereas Type II can have 4 enantiomeric pairs, what it means 8 isomeric configurations.

The use of PYRs is widespread around the globe. They are very common in agricultural and livestock sectors but also they are used for domestic purposes, as well for disease control programmes to ensure Public Health. In the 2011, it was estimated that 1500 tonnes were used in the home and garden sectors in the United States of America (U.S. EPA, 2011). Information on PYRs use in Spain highlight that 11570 tonnes were packed as retail sales products in 2007.(INE, 2015).

Although PYRs can be mostly metabolized by mammals, birds and other species (Barr et al., 2010; Demoute, 1989; Mir-Tutusaus et al., 2014), the huge quantities which are dumped into the ecosystems make them ubiquitous in the environment (M. L. Feo, Ginebreda, et al., 2010; Weston & Lydy, 2010; Yoshida, 2009) and even in biota (Alonso et al., 2012; Corcellas et al., 2016; Corcellas, Eljarrat, & Barceló, 2015b) and humans (Corcellas et al., 2012; Channa et al., 2012). However, PYRs are highly extended because of their low toxicity for mammals and birds. Nevertheless, recent studies in mammals at non-lethal doses points out to their potential carcinogenic behaviour (Bassil et al., 2007) as much as their endocrine disruption activity (Cinzia et al., 2013; Yuanxiang Jin et al., 2011). Moreover, this toxicity could depend on the isomerism. Therefore, *cis* diastereoisomers would be more toxic than *trans* (S.-Y. Zhang et al., 2008) and possibly, one of the enantiomers more active than the other (Yuanxiang Jin et al., 2012).

Recently, it was demonstrated the presence of PYRs in aquatic ecosystems, both in rivers (Corcellas et al., 2015b) and the seas (Alonso et al., 2012; Aznar-Alemany, Giménez, de Stephanis, Eljarrat, & Barceló, 2017). In top predators such as dolphins, pyrethroids were found in liver (Aznar-Alemany et al., 2017), breast milk, placenta, muscle, blubber, cord and even foetuses (M. B. Alonso et al., 2015; Alonso et al., 2012). Liver median values in adults were 300 ng g⁻¹ lw in Spanish coastal specimens (Aznar-Alemany et al., 2017) and 7.04 ng g⁻¹ lw in other species of Brazilian dolphins (Alonso et al., 2012) with 87% and 100% of positive samples, respectively. These studies recommended the monitoring of these pesticides in aquatic ecosystems due to their toxicity. For some contaminants, such as persistent organic pollutants (POPs), the importance of monitoring these contaminants in marine ecosystems had been largely proved (Hall, Hugunin, et al., 2006; Reijnders, 1986), and even some models had been tested (Hall, McConnell, et al., 2006). In marine ecosystems, studies have been mainly performed in odontocetes because these species are top

predators (de Moura, Hauser-Davis, Lemos, Emin-Lima, & Siciliano, 2014; Kucklick et al., 2011) and have been proposed as sentinels of the health of marine habitats (Santos & Pierce, 2015). Nevertheless, other species such as whales have also been monitored (Godard-Coding et al., 2011). For these monitoring, biopsies of free-ranging animals are preferred but these samples are composed basically of skin and the outer blubber layer (Fossi, Casini, & Marsili, 2007). The distribution of POPs in dolphin tissues has been hardly studied in several species (Gui, Yu, He, Tu, & Wu, 2014; Tornero, Borrell, Forcada, & Aguilar, 2004; Yordy, Wells, et al., 2010). Firstly, it was assumed that these lipophilic compounds tended to accumulate in fat tissue such as the blubber layer due to their high lipid content (Aguilar, 1985). After that, some studies criticised this assumption arguing that in mammals there were some tissues that accumulated more POPs than others (H. Shen et al., 2012) and even the blubber was not always homogeneous (Yordy, Pabst, et al., 2010). Because of that, and in order to clarify a good methodology for PYRs monitoring in marine ecosystems, determining the distribution of PYRs in cetacean tissues is necessary.

In the present study we studied the endangered subpopulation of Mediterranean short-beaked common dolphins (*Delphinus delphis*) from the Alboran Sea. Common dolphins used to be abundant and widespread all over the Mediterranean but in the 1970s its numbers began to decrease rapidly. Its decline has been attributed to several factors such as overfishing, habitat degradation, climate change, bycatch and contamination (Bearzi et al.). Then, the assessment of its contaminant burden is important in order to properly conserve this endangered subpopulation.

Our goal was to determine the PYR distribution in common dolphins tissues in order to show some potential differences among tissues, check the lipophilic tissue preference and elucidate which tissue is more suitable for monitoring and future analyses. Therefore, we determined 13 common PYRs (cis-bifenthrin, cyfluthrin, cypermethrin, λ -cyhalothrin, deltamethrin, fenvalerate, fenpropathrin, fluvalinate, permethrin, phenothrin, resmethrin, tetramethrin, tralomethrin) in blubber, brain, kidney, liver and muscle of eleven stranded common dolphins.

Materials and methods

Standards and Reagents

All analytical standards were purchased to Dr. Ehrenstrofer (Augsburg, Germany). As surrogate standards d_6 -*trans*-permethrin and d_6 -*trans*-cypermethrin were chosen and purchased to the same commercial firm. Organic solvents were obtained from J.T. Baker "for use in HPLC" quality (Deventer, The Netherlands). Standard solutions were prepared in ethyl acetate. Calibration curves were

prepared at different concentrations ranging between 0.4 and 150 ng mL⁻¹. Solid phase extraction (SPE) cartridges were obtained from Isolute Biotage (Uppsala, Sweden) (C18, 2 g / 15 mL) and from Interchim (Montluçon, France) (Basic alumina, 5g / 25 mL).

Sampling

Eleven individuals were analyzed in order to determine levels of PYRs in different tissues. A total of 38 samples were analyzed including 10 samples of muscle, 10 of kidney, 7 of liver, 6 of blubber and 5 of brain tissues (see Table 1). Samples of stranded individuals were collected from 2004 to 2009 in the Spanish coast of the Alboran Sea (western Mediterranean Sea). Samples were collected and kept frozen at -20°C until the analyses were carried out.

Table 1: Information about the analysed samples.

| Individual | Tissues | | | | | # Matrices |
|--------------|---------|-------|--------|-------|--------|------------|
| | Blubber | Brain | Kidney | Liver | Muscle | |
| A | X | X | | | | 2 |
| B | X | X | X | | X | 4 |
| C | | | X | | X | 2 |
| D | | | X | X | X | 3 |
| E | | | X | | X | 2 |
| F | X | X | X | X | X | 5 |
| G | X | | X | X | X | 4 |
| J | X | | X | X | X | 4 |
| K | | | X | X | X | 3 |
| L | | X | X | X | X | 4 |
| M | X | X | X | X | X | 5 |
| TOTAL | 6 | 5 | 10 | 7 | 10 | 38 |

Analytical methods

Sample treatments were adapted from Feo et al. (Maria Luisa Feo et al., 2012). Briefly, different amounts between 0.05 to 0,3 g of sample was exactly weight depending on the fat content of the sample, i.e., the fattier the tissue was the less amount of sample was weight. These were spiked over night with 0.25 ng and 0.125 ng of d₆-*trans*-permethrin and d₆-*trans*-cypermethrin, respectively. Extraction procedure was carried out with 20 mL of hexane:dichloromethane (2:1) and assisted by ultrasounds during 15 minutes. This extraction was repeated twice and the solvent was dried by a N₂ stream. The solvent was cleaned-up by a tandem SPE (basic alumina and C18 cartridges, 30 mL acetonitrile as eluent) cleaned the dried extract up. The eluent was evaporated under N₂ and the sample reconstituted in 100 µL of ethyl acetate.

Analyses were performed on an Agilent Technologies 7890A coupled to a 7000A GC-MS Triple Quad. The chosen column was a DB5-ms (15 m x 0.25 mm x 0.1 μm). Details of chromatographic condition analyses are found in Corcellas et al. (Corcellas, Eljarrat, & Barceló, 2015a). The selected mass spectrometry (MS) mode was the negative chemical ionization, with ammonium as reagent gas. All MS parameters are found in Feo et al. (M. L. Feo et al., 2011). It was remarkable that deltamethrin and tralomethrin were indifferenciated with these methodologies because the high temperature of the GC inlet convert tralomethrin in deltamethrin (Valverde et al., 2002).

The lipid content in samples was determined gravimetrically in parallel with an equivalent extraction procedure of 1 g of sample.

Quality assurance/control

These methodologies were previously tested and details of its reproducibility and linearity can be found in previous studies (Corcellas et al., 2015a; M. L. Feo et al., 2011). The mean recovery with our matrices was 79%, being 53% the lower value, obtained for deltamethrin. Limits of detection (LOD) ranged from 0.02 to 0.71 ng g^{-1} lipid weigh (lw) and limits of quantification (LOQ) from 0.08 to 2.38 $\text{ng g}^{-1}\text{lw}$. For each batch of 11 samples, one methodological blank was carried out. Levels of blanks were subtracted to all corresponding samples in case blank signal was higher than 1% of the sample signal.

Total Body load calculation

In order to study the accumulation process in each tissue, an approximation of the total body (TB) load was calculated. As the weight of different organs was not measured in the studied specimens, the relationship between organs weights and individual length was used as a proxy (Ridgway & Brownson, 1984; Tornero et al., 2004). With these proportional parameters among tissues, the weight of each organ of each individual was estimated based on its length. After that, multiplying this estimated weight by the $\sum_{13}\text{PYR}$ in ww basis, the amount of PYR in each organ was obtained. All tissue values were summed to obtain the TB load.

Results and discussion

Levels of $\sum_{13}\text{PYRs}$ in samples

Detection of PYRs was positive for all samples considered. General levels of $\sum_{13}\text{PYR}$ ranged from 20.5 to 6730 ng g^{-1} lw (0.73 – 218 ng g^{-1} wet weight (ww), 2.92 to 360 ng g^{-1} dry weight (dw)). Individual values can be found in [Supplementary Information A to C](#). A summary of basic statistics of these results can be found in [Table 2](#), expressed in the three weight basis, *i.e.* dw, lw and ww.

Table 2: Basic statistic of results. Concentration of \sum_{13} PYRs in dolphin tissues (ng g⁻¹).

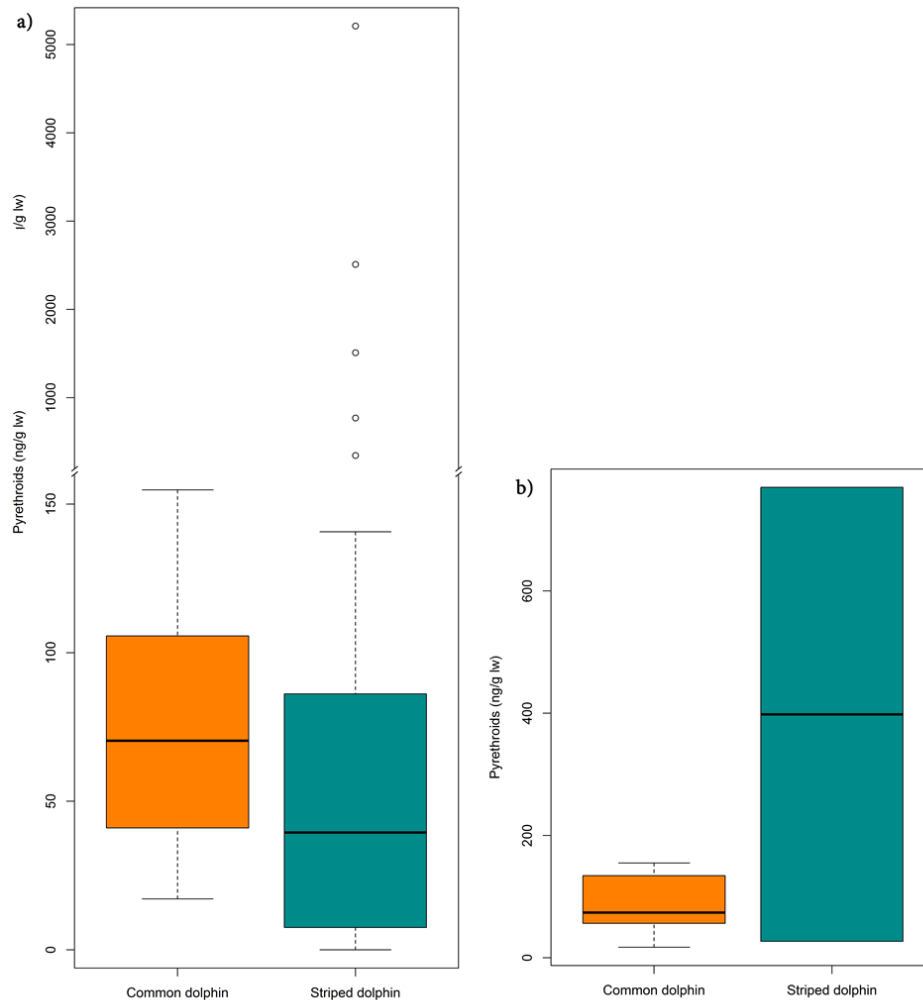
| | Wet weight (ww) | | | Dry weight (dw) | | | Lipid weight (lw) | | |
|----------------|------------------------------|--------------------|---------------|------------------------------|--------------------|---------------|------------------------------|--------------------|---------------|
| | Arithmet ic mean (±SD) | Geometr ic mean | Rang e | Arithmet ic mean (±SD) | Geometr ic mean | Rang e | Arithmet ic mean (±SD) | Geometr ic mean | Rang e |
| Blubber | 65.3 ± 76.0 | 42.9 | 11.7- 218 | 121 ± 122 | 81.5 | 16.9- 360 | 145 ± 149 | 99 | 20.5- 437 |
| Brain | 10.1 ± 8.17 | 5.69 | 0.73- 18.3 | 40.3 ± 32.7 | 22.8 | 2.92- 73.1 | 253 ± 213 | 160 | 28.0- 551 |
| Kidney | 17.6 ± 14.1 | 11.3 | 1.42- 37.2 | 77.6 ± 61.3 | 49.8 | 6.82- 162 | 822 ± 734 | 531 | 67.2- 2460 |
| Liver | 23.6 ± 16.8 | 18.3 | 6.39- 48.9 | 76.5 ± 51.7 | 60.0 | 17.1- 155 | 942 ± 752 | 628 | 68.8- 2310 |
| Muscle | 18.6 ± 18.6 | 10.1 | 1.49- 51.9 | 68.6 ± 71.2 | 36.8 | 5.98- 208 | 2550 ± 2490 | 1420 | 192- 6730 |

In other odontocete species analyzed (Mariana B. Alonso et al., 2015; Alonso et al., 2012; Aznar-Alemany et al., 2017) levels of PYRs in liver were found to be up to 68.4 ng g⁻¹lw in Franciscana dolphin (*Pontoporia blainvillei*) samples and to 5210 ng g⁻¹ lw in striped dolphin (*Stenella coeruleoalba*) ones. In blubber and muscle tissues they reach up to 101 and 860 ng g⁻¹ lw, respectively, in samples of Franciscana dolphin, and to 135 and 620 ng g⁻¹ lw, respectively, in samples from Guiana dolphin (*Sotalia guianensis*). All these values were in concordance with the range of our studied matrices (*i.e.* 68.8-2306 ng g⁻¹ lw in liver, 20.5-437 ng g⁻¹ lw in blubber, and 192-6725 ng g⁻¹ lw in muscle). Franciscana and Guiana dolphins tends to present mean levels a little bit lower than ours, but several factors may explain this fact. First of all, those species were from Brazil coast and the PYR dumping in there could probably not be the same as Spanish. Moreover, the dilution effect in the Atlantic Ocean is presumably bigger than in the Mediterranean Sea. Furthermore, comparing different species is always difficult due to differences in diet, habitat and even some metabolic mechanisms.

From the same Alboran Sea, striped dolphins presented levels of pyrethroids much similar to common dolphins. Mean value of PYR levels in liver for all individuals of common dolphins was 76.50 ± 51.64 ng g⁻¹ lw, while for striped dolphins it was 300.00 ± 934.24 ng g⁻¹ lw with and differences were significant (Kruskal–Wallis test, H=1.11, 1 d.f., P=0.29). However, when only adult females were compared, means were 84.94 ± 51.01 and 398.12 ± 525.15 for common and striped dolphins,

respectively, without significant differences in distribution ($H=0.11$, 1 d.f., $P= 0.74$). In [Figure 1](#) are both comparisons represented.

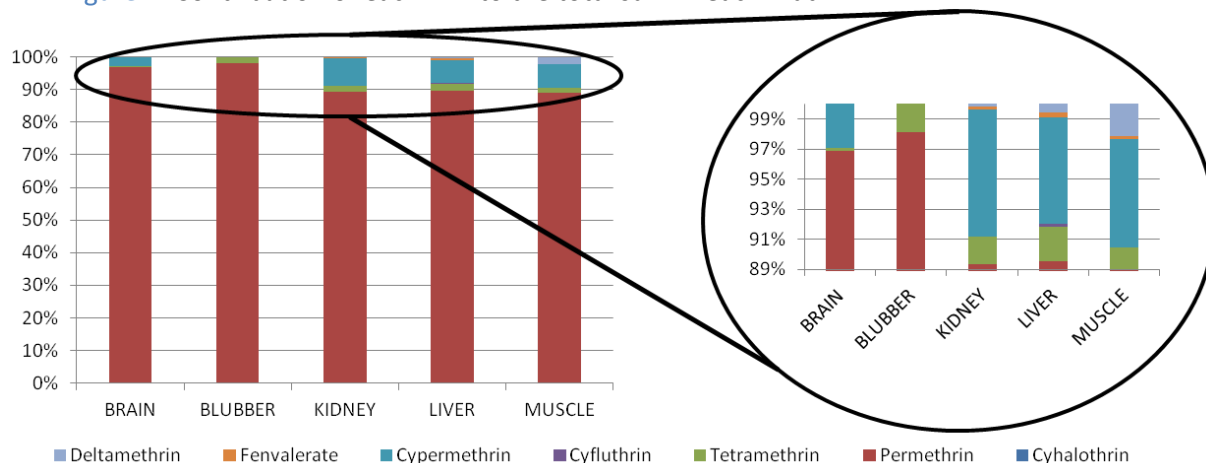
Figure 1: Levels of PYR in striped and common dolphin livers. a) All individuals included b) only adult females' values.



Regarding specific PYRs, 100% of samples presented permethrin and 61% tetramethrin, both of them belonging to type I PYRs. Only 63% of samples presented some of type II PYR. For instance, in 61% of samples cypermethrin was quantified, while fenvalerate was determined in 47% of samples. Cyhalothrin and deltamethrin/tralomethrin were present in 13% of samples, whereas cyfluthrin only in 2.6%. The rest of PYRs (cis-bifenthrin, fenpropathrin, fluvalinate, phenothrin, resmethrin) were never detected at quantifiable amounts. In [Figure 2](#), the content of each pyrethroid in each matrix is represented as a percentage. It was clear that permethrin was the main PYR in all samples with more than 89% of contribution in the total PYR sum in all matrices. In the same coastal area, permethrin and tetramethrin were the main contributors of pyrethroid pollution in liver of striped dolphins (Aznar-Aleman et al., 2017). This similar pattern could be due to a similar exposition to these insecticides through diet (Edwards, Millburn, & Hutson, 1987) because both species seems to feed on

similar preys due to its overlap in stable isotope signatures (Giménez et al.). However, the profile corresponding to Brazilian dolphins was differently dominated by permethrin and cypermethrin (M. B. Alonso et al., 2015), perhaps due to different pyrethroid dumping.

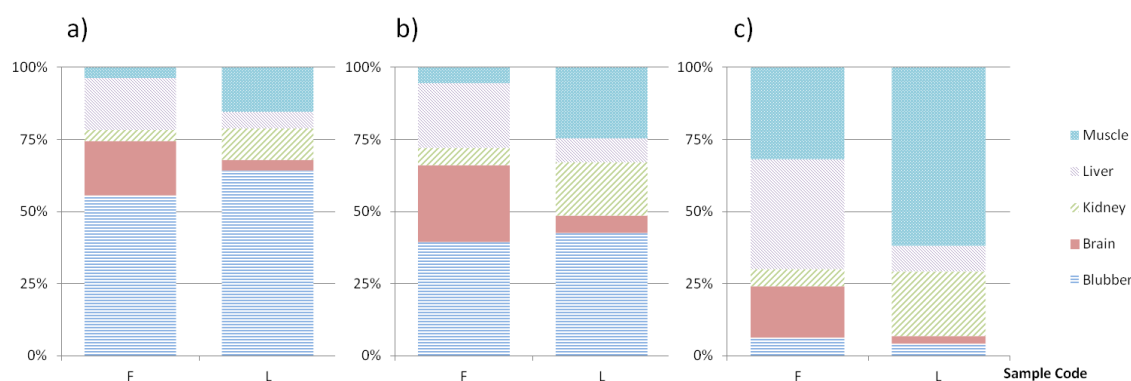
Figure 2: Contribution of each PYR to the total sum in each matrix.



Regarding the distribution of the rest of PYR in tissues, it seemed to respond to some physico-chemical characteristics of these pollutants. For instance, the most hydrophilic tissues (muscle, kidney and liver) presented different proportions of deltamethrin/tralomethrin and fenvalerate, but they were not detected in brain and blubber. It would be related with the log K_{ow} of these PYR (lower than 5,01). However, the lipophilic behaviour was not the only reason for these results. On the contrary, recent studies with human brain cells showed that deltamethrin permeation through the blood brain barrier is a passive transport concentration-dependent. Moreover, the binding with serum albumin and plasma proteins/lipoproteins could limit this transport (Amaraneni et al., 2016; Bruckner, 2014). Cypermethrin presented higher contributions in brain than in blubber showing more affinity for this tissue. This might suggest that cypermethrin is able to penetrate the hematoencephalic barrier more easily than other pyrethroids.

Given the length of the animals, we could know that all males were juveniles and young adults, while females were young adults and adults (Borrell & Aguilar, 2005; Hall, McConnell, et al., 2006; Murphy, Pinn, & Jepson, 2013). Because of these differences in age, both sexes were not comparable in the present study. After sex classification, statistical analyses were carried out and no correlation was found among PYR level and length nor tissue (at 99% of confidence). Figure 3 shows the levels of pyrethroids in tissues versus the individual length by sex. As it is clear, in case of males the lack of samples didn't let describe a trend. In the case of females, dispersion was too high to detect any tendency. The variability in pollutant values in females could be due to losses of body burden pollution through births, the consequential maternal transfer and lactation (Alonso et al., 2012; Borrell & Aguilar, 2005).

Figure 3: Distribution of PYRs in different tissues for two individuals: a) ww basis, b) dw basis, c) lw basis.

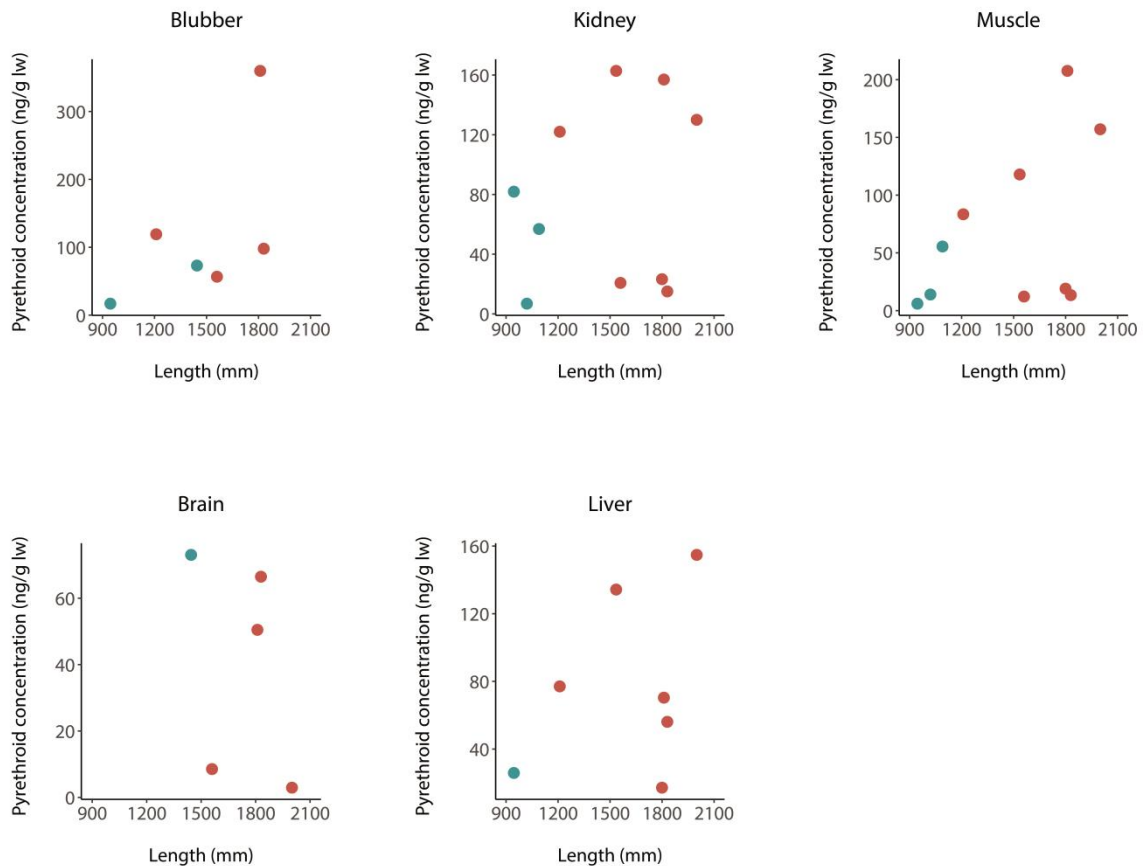


Expression of PYRs results in ww, lw or dw

Results expressed in different weight basis were compared for each tissue. Only two of the individuals were sampled for all the 5 different studied tissues. Therefore, comparison among tissue was done with these two dolphins. In Figure 4 the contribution (%) of \sum_{13} PYRs in each tissue relative to the total amount of \sum_{13} PYRs in the individual is represented. Dry weight and wet weight bases presented similar profiles except for the contribution of blubber, which was lower in dw normalization. With this dw basis, blubber was the tissue in which most of PYRs were found ($\approx 40\%$), as expected given the lipophilic behaviour of PYRs. The rest of tissues presented between 12 to 17% of the total \sum_{13} PYRs in each individual. On the other hand, lw normalization presented a completely different pattern. The blubber presented only the 5% of PYRs but the highest concentration of PYRs per lipid unit was in the muscle (47%). The rest of tissues presented between 10% (brain) and 24% (liver) of contribution to the total.

These results mean that changing bases produce important differences in result discussion. Even when lipid weight normalization is valid for most of POPs, for PYRs it seemed not to be so suitable. One important characteristic of POPs is that they are accumulated preferably in lipid tissues (Gui et al., 2014; Yordy, Pabst, et al., 2010). Therefore, most of tissues presented similar POP amounts in lipid weight basis, even when some differences were described in some special tissues. For example the outer blubber layer of cetaceans presented a slow equilibrium with the inner blubber layer, which is more metabolically active (Herman et al., 2008). Nonetheless, PYR are more easily metabolized not only by the common cytochrome P₄₅₀ complexes (Godard-Codding et al., 2011; Nakamura et al., 2007) but as well by other enzymes involved in this process, i.e., the carboxylesterases (Crow, Borazjani, Potter, & Ross, 2007). That fact could make that in some tissues the metabolization of PYRs were more effective. Besides, it is known that pyrethroid distribution through mammalian bodies are helped by lipoproteins bindings, what could interfere in permeation through tissues (Amaraneni et al., 2016). For that reason, the lipophilic character is not so

Figure 4: Representation of levels of PYRs vs. length in each tissue, separately for males (green) and females (red).



conclusive in the PYR distribution in tissues. Given those difficulties in the understanding of lipid-normalized PYR levels, lw basis is not the best choice in order to compare levels among individuals or even species.

Since water content is also depending on a lot of undesirable factors such as tissue characteristics, decomposition condition, between others, the best option to compare data about levels of PYRs in biota should be dw normalization.

Total Body load

The TB load was calculated only for the two individuals that presented all 5 matrices. In Table 3 TB results are presented as well as reference values used in this estimation. The TB load was of 1.25 and 6.64 mg of PYRs. In the blubber, near the 80% of the total of PYRs would be accumulated while in the muscle it would be around the 18%. In both individuals the contribution of the rest of analyzed organs contribute in less than 5% of the total amount of PYRs. These results have to be treated carefully because the calculation is just an approximation due to the lack of real organ weights and it

was calculated only for two individuals. Even that, this is a first approach to understand PYR behaviour in dolphin tissues.

When authors have evaluated total body load of POPs in cetaceans, they have estimated that more than 90% of this value corresponded to blubber contribution. However, since lipid is mobilized constantly, this tissue became the main source of these contaminants for the rest of tissues (Yordy, Wells, et al., 2010). This is in concordance with our results. For pyrethroids contribution of blubber was a little lower than for POPs but it may also be due to estimation of each tissue contribution.

PYR levels by tissues

As it is showed in [Table 2](#), brain was the tissue with lower levels of PYRs, with a geometric mean of $22.8 \text{ ng g}^{-1} \text{ dw}$. This could point out that the blood-brain barrier is able to partially avoid the penetration of pyrethroids in brain, which would be very useful taking into account that PYR main effect as insecticide is to act in the nervous system and its effects in nervous system could be toxic for mammals (Hansen et al., 2017; Islam, Zaman, Duarah, Raju, & Chattopadhyay, 2017; Varro et al., 2017). Following, muscle, kidney and liver presented similar ranges ($5.98\text{-}208$, $6.82\text{-}163$ and $17.1\text{-}155 \text{ ng g}^{-1} \text{ dw}$, respectively) and geometrical means of 36.8 , 49.8 and $60.0 \text{ ng g}^{-1} \text{ dw}$, respectively. Thus, liver seemed to present less inter-individual variation in PYR levels than the other two tissues (standard deviations of muscle, kidney and liver were 71.1 , 61.3 and $51.7 \text{ ng g}^{-1} \text{ dw}$, respectively). Finally, the most polluted tissue was the blubber (geometrical mean = $85.1 \text{ ng g}^{-1} \text{ dw}$, range from 16.9 to $360 \text{ ng g}^{-1} \text{ dw}$) which is consistent with the lipophilic behaviour of PYRs.

Altogether, for monitoring purposes, blubber seemed to be the suitable tissue to analyse due to its high amount of pollutant and the possibility of obtaining this tissue in free ranging animals through remote biopsy (Giménez, De Stephanis, Gauffier, Esteban, & Verborgh). However, the extraction procedure carried out in the present study present some analytical difficulties with very fatty samples. Moreover, because of the small amount obtained in regular monitoring sampling schemes through biopsy darting, this matrix could show false negatives. Furthermore, some authors have discussed about differences in blubber composition and potentially different accumulation of organic compounds in different animal blubber layers or even the body area this blubber was taken (Gui et al., 2014; Tornero et al., 2004; Yordy, Pabst, et al., 2010). On the other hand, liver tissue seemed to give consistent information, with amounts of pollution high enough to show the exposure of dolphins to PYRs. Even when levels of pyrethroids in liver could represent better the recent exposure to this compounds, levels in liver were usually close to muscle and kidney ones, what gave a general idea of pollution exposure of the internal organs of the individual, regardless it was recent or long term exposure. To sum up, we recommend the monitoring of liver as the preferred tissue in

stranded animals while blubber would be the suitable tissue for the monitoring of free ranging individuals.

Conclusions

In the present study pyrethroid residues were found in tissues of all the dolphins analysed. Concretely, permethrin was found in 100% of samples. Levels of pyrethroids were in the range of previous studies. Given the ever-presence of these insecticides in dolphin samples, the main achievement of this study was to compare different dolphin tissues in order to clarify the best matrix to monitor these pollutants. Results point out that blubber could be a good tissue for these purposes, even though the present analytical methodology could show some false negatives. For stranded individuals, liver would be a better choice, given that this tissue showed representative levels of internal organs. However, it is important to understand that there were differences among tissues such as liver, blubber and brain. That meant that levels found from studies which analysed different tissues would be not directly compared.

As expected because of the lipophilic behaviour of pyrethroids, the main amount of pyrethroids was accumulated in blubber while internal organs accumulations represented less than 5% of the total load.

Finally, this study showed as well the importance of the basis in which results are provided. Lipid weight was not the better option for these metabolizable pollutants. Dry weight basis would be the selected normalization procedure due to present PYR levels results.

Acknowledgements

This work has been financially supported by the Generalitat de Catalunya (Consolidated Research Groups 2014 SGR 418 – Water and Soil Quality Unit), Loro Parque Foundation (Project Flame), CEPESA and EcoCet Project (CGL2011-25543, National Research Plan by the Ministry of Economy and Competitiveness). R. de Stephanis and J. Giménez were supported by the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness, through the Severo Ochoa Programme for Centres of Excellence in R+D+I (SEV-2012-0262) and R. de Stephanis by the Subprograma Juan de la Cierva. Thanks are due to the Consejería de Agricultura, Pesca y Medio Ambiente and the Agencia de Medio Ambiente y Agua of the Junta de Andalucía, specially to María Soledad Vivas, Carolina Fernández and Eduardo Fernández and to all the people who helped in the sample collection. Biotage is acknowledged for SPE cartridges.

References

- Aguilar, A. (1985). Compartmentation and reliability of sampling procedures in organochlorine pollution surveys of cetaceans. [Review]. *Residue Reviews*, 95, 91-114.
- Alonso, M. B., Feo, M. L., Corcellas, C., Gago-Ferrero, P., Bertozzi, C. P., Marigo, J., Flach, L., Meirelles, A. C. O., Carvalho, V. L., Azevedo, A. F., Torres, J. P. M., Lailson-Brito, J., Malm, O., Diaz-Cruz, M. S., Eljarrat, E., & Barceló, D. (2015). Toxic heritage: Maternal transfer of pyrethroid insecticides and sunscreen agents in dolphins from Brazil. [Article]. *Environmental Pollution*, 207, 391-402. doi: 10.1016/j.envpol.2015.09.039
- Alonso, M. B., Feo, M. L., Corcellas, C., Gago-Ferrero, P., Bertozzi, C. P., Marigo, J., Flach, L., Meirelles, A. C. O., Carvalho, V. L., Azevedo, A. F., Torres, J. P. M., Lailson-Brito, J., Malm, O., Eljarrat, E., Diaz-Cruz, M. S., & Barceló, D. (2015). A poisonous cocktail for my baby: Maternal transfer of pyrethroid insecticides and UV filters in dolphins from Brazil – Part 1. *Environmental Pollution*, 207, 391-402.
- 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., Torres, J. P. M., Lailson-Brito, J., Malm, O., Eljarrat, E., & Barcelo, D. (2012). Pyrethroids: A new threat to marine mammals? *Environment International*, 47, 99-106. doi: 10.1016/j.envint.2012.06.010
- Amaraneni, M., Sharma, A., Pang, J., Muralidhara, S., Cummings, B. S., White, C. A., Bruckner, J. V., & Zastre, J. (2016). Plasma protein binding limits the blood brain barrier permeation of the pyrethroid insecticide, deltamethrin. *Toxicology Letters*, 250–251, 21-28. doi: <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2016.03.006>
- Aznar-Aleman, Ò., Giménez, J., de Stephanis, R., Eljarrat, E., & Barceló, D. (2017). Insecticide pyrethroids in liver of striped dolphin from the Mediterranean Sea. [Article]. *Environmental Pollution*, 225, 346-353. doi: 10.1016/j.envpol.2017.02.060
- Barr, D. B., Olsson, A. O., Wong, L.-Y., Udunka, S., Baker, S. E., Whitehead, R. D., Jr., Magsumbol, M. S., Williams, B. L., & Needham, L. L. (2010). Urinary Concentrations of Metabolites of Pyrethroid Insecticides in the General US Population: National Health and Nutrition Examination Survey 1999-2002. *Environmental Health Perspectives*, 118(6), 742-748. doi: 10.1289/ehp.0901275
- Bassil, K. L., Vakil, C., Sanborn, M., Cole, D. C., Kaur, J. S., & Kerr, K. J. (2007). Cancer health effects of pesticides: systematic review. *Canadian family physician Medecin de famille canadien*, 53(10), 1704-1711.
- Bearzi, G., Reeves, R. R., Notarbartolo-Di-Sciara, G., Politi, E., Canadas, A., Frantzis, A., & Mussi, B. (2003). Ecology, status and conservation of short-beaked common dolphins *Delphinus delphis* in the Mediterranean Sea. [Article]. *Mammal Review*, 33(3-4), 224-252. doi: 10.1046/j.1365-2907.2003.00032.x
- Borrell, A., & Aguilar, A. (2005). Differences in DDT and PCB residues between common and striped dolphins from the southwestern Mediterranean. [Article]. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 48(4), 501-508. doi: 10.1007/s00244-004-0039-7
- Bruckner, J. (2014). Role of the blood-brain barrier in limiting CNS uptake of pyrethroid insecticides: findings with hCMEC cells as a proxy (1064.14). *The FASEB Journal*, 28(1 Supplement).
- Cinzia, N., Manuel, C., Donatella, F., Rosita, G., Antonio, D. S., Cerasa, L. S., Isabel, S., Valentina, D., & Roberto, C. (2013). Effects of early life permethrin exposure on spatial working memory and on monoamine levels in different brain areas of pre-senescent rats. *Toxicology*, 303(1), 162-168. doi: 10.1016/j.tox.2012.09.016

- Corcellas, C., Andreu, A., Sergio, F., Hiraldo, F., Eljarrat, E., & Barceló, D. (2016). Pyrethroids insecticides in wild bird eggs from a World Heritage Listed Park: A case study in Doñana National Park (Spain). *Environment International*, Submitted.
- Corcellas, C., Eljarrat, E., & Barceló, D. (2015a). Enantiomeric-selective determination of pyrethroids: application to human samples. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*(407), 779-786. doi: 10.1007/s00216-014-7905-6
- Corcellas, C., Eljarrat, E., & Barceló, D. (2015b). First report of pyrethroid bioaccumulation in wild river fish: A case study in Iberian river basins (Spain). *Environment International*, 75, 110-116.
- Corcellas, C., Feo, M. L., Paulo Torres, J., Malm, O., Ocampo-Duque, W., Eljarrat, E., & Barcelo, D. (2012). Pyrethroids in human breast milk: Occurrence and nursing daily intake estimation. *Environment International*, 47, 17-22. doi: 10.1016/j.envint.2012.05.007
- Crow, J. A., Borazjani, A., Potter, P. M., & Ross, M. K. (2007). Hydrolysis of pyrethroids by human and rat tissues: Examination of intestinal, liver and serum carboxylesterases. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 221(1), 1-12. doi: 10.1016/j.taap.2007.03.002
- Channa, K. R., Roellin, H. B., Wilson, K. S., Nost, T. H., Odland, J. O., Naik, I., & Sandanger, T. M. (2012). Regional variation in pesticide concentrations in plasma of delivering women residing in rural Indian Ocean coastal regions of South Africa. *Journal of Environmental Monitoring*, 14(11), 2952-2960. doi: 10.1039/c2em30264k
- de Moura, J. F., Hauser-Davis, R. A., Lemos, L., Emin-Lima, R., & Siciliano, S. (2014). Guiana Dolphins (*Sotalia guianensis*) as Marine Ecosystem Sentinels: Ecotoxicology and Emerging Diseases. In D. M. Whitacre (Ed.), *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, Vol 228 (Vol. 228, pp. 1-29). New York: Springer.
- Demoute, J. P. (1989). A brief review of the environmental fate and metabolism of pyrethroids. [Article; Proceedings Paper]. *Pesticide Science*, 27(4), 375-385. doi: 10.1002/ps.2780270406
- Edwards, R., Millburn, P., & Hutson, D. H. (1987). The toxicity and metabolism of the pyrethroids cis- and trans-cypermethrin in rainbow trout, *Salmo gairdneri*. [Article]. *Xenobiotica*, 17(1), 1175-1193. doi: 10.3109/00498258709047172
- EPA, U. S. (2011). Pesticides Industry Sales and Usage: 2006 and 2007 Market Estimates. Washington: U.S. EPA.
- Feo, M. L., Eljarrat, E., & Barcelo, D. (2011). Performance of gas chromatography/tandem mass spectrometry in the analysis of pyrethroid insecticides in environmental and food samples. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 25(7), 869-876. doi: 10.1002/rcm.4936
- Feo, M. L., Eljarrat, E., Manaca, M. N., Dobano, C., Barcelo, D., Sunyer, J., Alonso, P. L., Menendez, C., & Grimalt, J. O. (2012). Pyrethroid use-malaria control and individual applications by households for other pests and home garden use. *Environment International*, 38(1), 67-72. doi: 10.1016/j.envint.2011.08.008
- Feo, M. L., Ginebreda, A., Eljarrat, E., & Barcelo, D. (2010). Presence of pyrethroid pesticides in water and sediments of Ebro River Delta. *Journal of Hydrology*, 393(3-4), 156-162. doi: 10.1016/j.jhydrol.2010.08.012
- Fossi, M. C., Casini, S., & Marsili, L. (2007). Potential toxicological hazard due to endocrine-disrupting chemicals on Mediterranean top predators: State of art, gender differences and methodological tools. *Environmental Research*, 104(1), 174-182. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.envres.2006.06.014>
- Giménez, J., Cañadas, A., Ramírez, F., Afán, I., Garcia-Tiscar, S., Fernandez-Maldonado, C., Castillo, J. J., & de Stephanis, R. (2017). Intra-and interspecific niche partitioning in striped and common

- dolphins inhabiting the southwestern Mediterranean Sea. *Marine Ecology Progress Series*, 567, 199-210.
- Giménez, J., De Stephanis, R., Gauffier, P., Esteban, R., & Verborgh, P. (2011). Short communications: Biopsy wound healing in long-finned pilot whales (*Globicephala melas*). [Article]. *Veterinary Record*, 168(4). doi: 10.1136/vr.c5284
- Godard-Codding, C. A. J., Clark, R., Fossi, M. C., Marsili, L., Maltese, S., West, A. G., Valenzuela, L., Rowntree, V., Polyak, I., Cannon, J. C., Pinkerton, K., Rubio-Cisneros, N., Mesnick, S. L., Cox, S. B., Kerr, I., Payne, R., & Stegeman, J. J. (2011). Pacific Ocean-Wide Profile of CYP1A1 Expression, Stable Carbon and Nitrogen Isotope Ratios, and Organic Contaminant Burden in Sperm Whale Skin Biopsies. [Article]. *Environmental Health Perspectives*, 119(3), 337-343. doi: 10.1289/ehp.0901809
- Gui, D., Yu, R., He, X., Tu, Q., & Wu, Y. (2014). Tissue distribution and fate of persistent organic pollutants in Indo-Pacific humpback dolphins from the Pearl River Estuary, China. *Marine Pollution Bulletin*, 86(1–2), 266-273. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.marpolbul.2014.07.007>
- Hall, A. J., Hugunin, K., Deaville, R., Law, R. J., Allchin, C. R., & Jepson, P. D. (2006). The risk of infection from polychlorinated biphenyl exposure in the harbor porpoise (*Phocoena phocoena*): A case-control approach. *Environmental Health Perspectives*, 114(5), 704-711. doi: 10.1289/ehp.8222
- Hall, A. J., McConnell, B. J., Rowles, T. K., Aguilar, A., Borrell, A., Schwacke, L., Reijnders, P. J. H., & Wells, R. S. (2006). Individual-based model framework to assess population consequences of polychlorinated biphenyl exposure in bottlenose dolphins. [Article; Proceedings Paper]. *Environmental Health Perspectives*, 114, 60-64. doi: 10.1289/ehp.8053
- Hansen, M. R. H., Jors, E., Lander, F., Condarco, G., Debes, F., Bustillos, N. T., & Schlunssen, V. (2017). Neurological Deficits After Long-term Pyrethroid Exposure. [Article]. *Environmental Health Insights*, 11, 1-11. doi: 10.1177/1178630217700628
- Herman, D. P., Matkin, C. O., Ylitalo, G. M., Durban, J. W., Hanson, M. B., Dahlheim, M. E., Straley, J. M., Wade, P. R., Tilbury, K. L., Boyer, R. H., Pearce, R. W., & Krahn, M. M. (2008). Assessing age distributions of killer whale *Orcinus orca* populations from the composition of endogenous fatty acids in their outer blubber layers. *Marine Ecology Progress Series*, 372, 289-302. doi: 10.3354/meps07709
- INE. (2015), 2015, from http://www.ine.es/daco/daco42/eip93/eip_2007.html
- Islam, J., Zaman, K., Duarah, S., Raju, P. S., & Chattopadhyay, P. (2017). Mosquito repellents: An insight into the chronological perspectives and novel discoveries. [Article]. *Acta Tropica*, 167, 216-230. doi: 10.1016/j.actatropica.2016.12.031
- Jin, Y., Liu, J., Wang, L., Chen, R., Zhou, C., Yang, Y., Liu, W., & Fu, Z. (2012). Permethrin exposure during puberty has the potential to enantioselectively induce reproductive toxicity in mice. *Environment International*, 42, 144-151. doi: 10.1016/j.envint.2011.05.020
- Jin, Y., Wang, L., Ruan, M., Liu, J., Yang, Y., Zhou, C., Xu, B., & Fu, Z. (2011). Cypermethrin exposure during puberty induces oxidative stress and endocrine disruption in male mice. *Chemosphere*, 84(1), 124-130. doi: 10.1016/j.chemosphere.2011.02.034
- Kucklick, J., Schwacke, L., Wells, R., Hohn, A., Guichard, A., Yordy, J., Hansen, L., Zolman, E., Wilson, R., Litz, J., Nowacek, D., Rowles, T., Pugh, R., Balmer, B., Sinclair, C., & Rosel, P. (2011). Bottlenose Dolphins as Indicators of Persistent Organic Pollutants in the Western North Atlantic Ocean and Northern Gulf of Mexico. [Article]. *Environmental Science & Technology*, 45(10), 4270-4277. doi: 10.1021/es1042244

- Mir-Tutusaus, J. A., Masís-Mora, M., Corcellas, C., Eljarrat, E., Barceló, D., Sarrà, M., Caminal, G., Vicent, T., & Rodríguez-Rodríguez, C. E. (2014). Degradation of selected agrochemicals by the white rot fungus *Trametes versicolor*. *Science of the Total Environment*, 500–501(0), 235-242. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.08.116>
- Murphy, S., Pinn, E. H., & Jepson, P. D. (2013). The short-beaked common dolphin (*Delphinus delphis*) in the north-east Atlantic: distribution, ecology, management and conservation status. *Oceanography and Marine Biology: An Annual Review*, 51, 193-280.
- Nakamura, Y., Sugihara, K., Sone, T., Isobe, M., Ohta, S., & Kitamura, S. (2007). The in vitro metabolism of a pyrethroid insecticide, permethrin, and its hydrolysis products in rats. *Toxicology*, 235(3), 176-184. doi: 10.1016/j.tox.2007.03.016
- Reijnders, P. J. H. (1986). Reproductive failure in common seals feeding on fish from polluted coastal waters. [Article]. *Nature*, 324(6096), 456-&. doi: 10.1038/324456a0
- Ridgway, S., & Brownson, R. (1984). Relative brain sizes and cortical surface areas in odontocetes. *Acta Zool Fenn*, 172, 149-152.
- Santos, M. B., & Pierce, G. J. (2015). Marine mammals and good environmental status: science, policy and society; challenges and opportunities. *Hydrobiologia*, 750(1), 13-41.
- Shen, H., Henkelmann, B., Rambeck, W. A., Mayer, R., Wehr, U., & Schramm, K.-W. (2012). Physiologically based persistent organic pollutant accumulation in pig tissues and their edible safety differences: An in vivo study. *Food Chemistry*, 132(4), 1830-1835. doi: 10.1016/j.foodchem.2011.12.015
- Tornero, V., Borrell, A., Forcada, J., & Aguilar, A. (2004). Tissue distribution of retinoids in common dolphins *Delphinus delphis*. *Marine Ecology Progress Series*, 280, 275-283. doi: 10.3354/meps280275
- Valverde, A., Aguilera, A., Rodriguez, M., & Boulaid, M. (2002). What are we determining using gas chromatographic multiresidue methods: tralomethrin or deltamethrin? *Journal of Chromatography A*, 943(1), 101-111. doi: 10.1016/s0021-9673(01)01414-5
- Varro, P., Kovacs, M., & Vilagi, I. (2017). The insecticide esfenvalerate modulates neuronal excitability in mammalian central nervous system in vitro. [Article]. *Toxicology Letters*, 267, 39-44. doi: 10.1016/j.toxlet.2016.12.012
- Weston, D. P., & Lydy, M. J. (2010). Urban and Agricultural Sources of Pyrethroid Insecticides to the Sacramento-San Joaquin Delta of California. *Environmental Science & Technology*, 44(5), 1833-1840. doi: 10.1021/es9035573
- Yordy, J. E., Pabst, D. A., McLellan, W. A., Wells, R. S., Rowles, T. K., & Kucklick, J. R. (2010). Tissue-specific distribution and whole-body burden estimates of persistent organic pollutants in the bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*). [Article]. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 29(6), 1263-1273. doi: 10.1002/etc.152
- Yordy, J. E., Wells, R. S., Balmer, B. C., Schwacke, L. H., Rowles, T. K., & Kucklick, J. R. (2010). Partitioning of Persistent Organic Pollutants between Blubber and Blood of Wild Bottlenose Dolphins: Implications for Biomonitoring and Health. [Article]. *Environmental Science & Technology*, 44(12), 4789-4795. doi: 10.1021/es1004158
- Yoshida, T. (2009). Simultaneous determination of 18 pyrethroids in indoor air by gas chromatography/mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1216(26), 5069-5076. doi: 10.1016/j.chroma.2009.04.087
- Zhang, S.-Y., Ueyama, J., Ito, Y., Yanagiba, Y., Okamura, A., Kamijima, M., & Nakajima, T. (2008). Permethrin may induce adult male mouse reproductive toxicity due to cis isomer not trans isomer. *Toxicology*, 248(2-3), 136-141. doi: 10.1016/j.tox.2008.03.018

Table 3: Reference values and results of TB load calculation for the F and L individuals.

| Individual | Length (cm) | Parameter | Blubber | Brain | Kidney | Liver | Muscle | TB load (μg) |
|--------------------------------|-------------|--|---------|--------|--------|-------|--------|---------------------------|
| Ref1(Tornero et al., 2004) | 187 | Reference weight (kg) | 22,34 | - | 3,4 | 2,2 | 34,87 | - |
| Ref2(Ridgway & Brownson, 1984) | 193,1 | Reference weight (kg) | - | 0,8356 | - | - | - | - |
| F | 183 | Estimated weight (kg) | 21,86 | 0,79 | 3,33 | 2,15 | 34,12 | 1248 |
| | | $\sum_{13}\text{PYRs}$ (μg) | 1077 | 13,16 | 11,21 | 34,51 | 112,5 | |
| | | % TB load | 86,3 | 1,1 | 0,9 | 2,8 | 9,0 | |
| L | 181 | Estimated weight (kg) | 21,62 | 0,78 | 3,29 | 2,13 | 33,75 | 6637 |
| | | $\sum_{13}\text{PYRs}$ (μg) | 4710 | 9,89 | 122,5 | 42,58 | 1753 | |
| | | % TB load | 71,0 | 0,1 | 1,8 | 0,6 | 26,4 | |
| Mean | - | % TB load | 79 | 0,6 | 1,4 | 1,7 | 18 | - |

Supplementary Information A.: Results of quantification analyses (ng g⁻¹ ww) (quantified PYRs only).

| Individual | Tissue | Type I PYRs | | Type II PYRs | | | | | TOTAL |
|------------|---------|-------------|--------------|--------------|-------------|--------------|---------------------------|-------------|-------|
| | | Permethrin | Tetramethrin | Cyfluthrin | Cyhalothrin | Cypermethrin | Deltamethrin ^a | Fenvalerate | |
| A | Blubber | 49.8 | ND | ND | ND | NQ | ND | ND | 49.8 |
| | Brain | 18.3 | ND | ND | ND | NQ | ND | ND | 18.3 |
| B | Blubber | 32.7 | 0.74 | ND | ND | NQ | ND | ND | 33.5 |
| | Brain | 1.57 | ND | ND | ND | 0.56 | ND | ND | 2.13 |
| | Kidney | 3.89 | ND | ND | 0.10 | 1.42 | ND | ND | 5.31 |
| | Muscle | 2.82 | 0.04 | ND | ND | 0.47 | ND | 0.02 | 3.35 |
| C | Kidney | 1.42 | ND | ND | 0.07 | NQ | ND | ND | 1.42 |
| | Muscle | 4.10 | ND | ND | ND | ND | ND | ND | 4.10 |
| D | Kidney | 32.5 | 1.61 | ND | ND | 2.50 | 0.27 | 0.09 | 37.0 |
| | Liver | 41.1 | 0.40 | ND | ND | 1.92 | 0.31 | 0.10 | 43.9 |
| | Muscle | 25.4 | 0.73 | ND | ND | 2.52 | 4.05 | 0.07 | 32.7 |
| E | Kidney | 10.5 | 0.04 | ND | ND | 0.39 | ND | ND | 10.9 |
| | Muscle | 13.9 | ND | ND | ND | ND | ND | ND | 13.9 |

Supplementary Information A.: Results of quantification analyses (ng g⁻¹ ww) (quantified PYRs only) (continuació).

| Individual | Tissue | Type I PYRs | | Type II PYRs | | | | | TOTAL |
|------------|---------|-------------|--------------|--------------|-------------|--------------|---------------------------|-------------|-------|
| | | Permethrin | Tetramethrin | Cyfluthrin | Cyhalothrin | Cypermethrin | Deltamethrin ^a | Fenvalerate | |
| F | Blubber | 48.2 | 1.05 | ND | ND | NQ | ND | NQ | 49.2 |
| | Brain | 16.6 | NQ | ND | ND | NQ | ND | ND | 16.6 |
| | Kidney | 3.36 | NQ | ND | ND | NQ | ND | 0.01 | 3.37 |
| | Liver | 14.5 | 0.15 | ND | ND | 1.11 | 0.19 | 0.08 | 16.0 |
| | Muscle | 2.66 | ND | ND | 0.13 | 0.63 | ND | ND | 3.30 |
| G | Blubber | 29.2 | 0.62 | ND | ND | NQ | ND | NQ | 29.8 |
| | Kidney | 25.6 | 0.95 | ND | ND | 3.92 | ND | 0.12 | 30.6 |
| | Liver | 20.9 | NQ | ND | ND | 1.98 | 0.42 | 0.08 | 23.3 |
| | Muscle | 23.5 | 0.53 | ND | ND | 3.87 | ND | 0.11 | 28.0 |
| J | Blubber | 11.3 | 0.34 | ND | ND | NQ | ND | ND | 11.7 |
| | Kidney | 17.2 | 0.13 | ND | ND | 1.19 | ND | NQ | 18.5 |
| | Liver | 5.13 | 0.11 | 0.21 | ND | 1.26 | ND | 0.03 | 6.74 |
| | Muscle | 1.49 | ND | ND | 0.07 | ND | ND | ND | 1.49 |

Supplementary Information A.: Results of quantification analyses (ng g⁻¹ ww) (quantified PYRs only) (continuació).

| Individual | Tissue | Type I PYRs | | Type II PYRs | | | | | TOTAL |
|------------------------|---------|-------------|--------------|--------------|-------------|--------------|---------------------------|-------------|-------|
| | | Permethrin | Tetramethrin | Cyfluthrin | Cyhalothrin | Cypermethrin | Deltamethrin ^a | Fenvalerate | |
| K | Kidney | 5.64 | ND | ND | ND | 0.48 | ND | 0.03 | 6.15 |
| | Liver | 6.22 | 0.10 | ND | ND | NQ | ND | 0.07 | 6.39 |
| | Muscle | 5.30 | ND | ND | 0.08 | 0.34 | ND | ND | 5.64 |
| L | Blubber | 213 | 4.37 | ND | ND | NQ | ND | NQ | 218 |
| | Brain | 11.7 | 0.05 | ND | ND | 0.91 | ND | NQ | 12.6 |
| | Kidney | 34.8 | 0.29 | ND | ND | 2.08 | ND | 0.08 | 37.2 |
| | Liver | 15.8 | 1.55 | ND | ND | 2.53 | ND | 0.13 | 20.0 |
| | Muscle | 47.5 | 0.84 | ND | ND | 3.52 | ND | 0.13 | 51.9 |
| M | Brain | 0.69 | 0.04 | ND | ND | NQ | ND | NQ | 0.73 |
| | Kidney | 22.7 | NQ | ND | ND | 3.07 | ND | 0.07 | 25.8 |
| | Liver | 45.4 | 0.88 | ND | ND | 2.52 | ND | 0.09 | 48.9 |
| | Muscle | 38.7 | 0.58 | ND | ND | 2.48 | ND | 0.11 | 41.9 |
| % of positives samples | | 100 | 61 | 2.6 | 13 | 61 | 13 | 47 | 100 |

^a Deltamethrin label included both deltamethrin and tralomethrin.

Supplementary Information B.: Results of quantification analyses (ng g⁻¹ lw) (quantified PYRs only).

| Individual | Tissue | Lipid % | Type I PYRs | | Type II PYRs | | | | | TOTAL |
|------------|---------|------------------|-------------|--------------|--------------|-------------|--------------|---------------------------|-------------|---------|
| | | | Permethrin | Tetramethrin | Cyfluthrin | Cyhalothrin | Cypermethrin | Deltamethrin ^a | Fenvalerate | |
| A | Blubber | 56 | 88.66 | ND | ND | ND | NQ | ND | ND | 88.66 |
| | Brain | 3.3 | 550.7 | ND | ND | ND | NQ | ND | ND | 550.7 |
| B | Blubber | 49 | 67.28 | 1.52 | ND | ND | NQ | ND | ND | 68.79 |
| | Brain | 3.0 | 51.94 | ND | ND | ND | 18.62 | ND | ND | 70.56 |
| | Kidney | 1.4 | 277.57 | ND | ND | 7.15 | 101.66 | ND | ND | 379.22 |
| | Muscle | 1.0 | 269.62 | 4.29 | ND | ND | 44.86 | ND | 2.14 | 320.92 |
| C | Kidney | 2.1 | 67.18 | ND | ND | 3.31 | NQ | ND | ND | 67.18 |
| | Muscle | 0.8 | 538.78 | ND | ND | ND | ND | ND | ND | 538.78 |
| D | Kidney | 2.3 ^b | 1393.92 | 69.14 | ND | ND | 107.3 | 11.68 | 4.06 | 1586.1 |
| | Liver | 1.9 | 2162.5 | 21.28 | ND | ND | 101.1 | 16.38 | 5.1 | 2306.37 |
| | Muscle | 0.7 | 3663.95 | 105.15 | ND | ND | 364.42 | 585.33 | 10.82 | 4729.67 |
| E | Kidney | 2.3 ^b | 450.37 | 1.66 | ND | ND | 16.77 | ND | ND | 468.8 |
| | Muscle | 0.8 ^b | 1803.18 | ND | ND | ND | ND | ND | ND | 1803.18 |

Supplementary Information B.: Results of quantification analyses (ng g⁻¹ lw) (quantified PYRs only) (continuació).

| Individual | Tissue | Lipid % | Type I PYRs | | Type II PYRs | | | | | TOTAL |
|------------|---------|------------------|-------------|--------------|--------------|-------------|--------------|---------------------------|-------------|---------|
| | | | Permethrin | Tetramethrin | Cyfluthrin | Cyhalothrin | Cypermethrin | Deltamethrin ^a | Fenvalerate | |
| F | Blubber | 41 | 116.32 | 2.54 | ND | ND | NQ | ND | NQ | 116.32 |
| | Brain | 4.9 | 341.33 | NQ | ND | ND | NQ | ND | ND | 341.33 |
| | Kidney | 2.9 | 114.95 | NQ | ND | ND | NQ | ND | 0.45 | 115.4 |
| | Liver | 2.2 | 659.46 | 6.79 | ND | ND | 50.44 | 8.81 | 3.65 | 729.14 |
| | Muscle | 0.5 | 491.21 | ND | ND | 24.72 | 116.26 | ND | ND | 607.47 |
| G | Blubber | 21 | 141.66 | 3.01 | ND | ND | NQ | ND | NQ | 144.67 |
| | Kidney | 4.2 | 612.99 | 22.83 | ND | ND | 93.82 | ND | 2.79 | 732.43 |
| | Liver | 3.3 ^b | 632.15 | NQ | ND | ND | 60.1 | 12.77 | 2.28 | 707.3 |
| | Muscle | 1.1 | 2155.81 | 48.93 | ND | ND | 355.43 | ND | 10.49 | 2570.66 |
| J | Blubber | 57 | 19.87 | 0.59 | ND | ND | NQ | ND | ND | 20.46 |
| | Kidney | 2.3 ^b | 737.12 | 5.63 | ND | ND | 51.07 | ND | NQ | 793.82 |
| | Liver | 2.1 | 247.47 | 5.45 | 10.06 | ND | 60.63 | ND | 1.35 | 324.97 |
| | Muscle | 0.8 ^b | 192.34 | ND | ND | 8.64 | ND | ND | ND | 192.34 |

Supplementary Information B.: Results of quantification analyses (ng g⁻¹ lw) (quantified PYRs only) (continuació).

| Individual | Tissue | Lipid % | Type I PYRs | | Type II PYRs | | | | | TOTAL |
|------------|---------|------------------|-------------|--------------|--------------|-------------|--------------|---------------------------|-------------|---------|
| | | | Permethrin | Tetramethrin | Cyfluthrin | Cyhalothrin | Cypermethrin | Deltamethrin ^a | Fenvalerate | |
| K | Kidney | 1.2 | 469.65 | ND | ND | ND | 39.63 | ND | 2.29 | 511.57 |
| | Liver | 9.3 | 66.95 | 1.08 | ND | ND | NQ | ND | 0.8 | 68.83 |
| | Muscle | 0.3 | 1635.47 | ND | ND | 24.12 | 105.05 | ND | ND | 1740.52 |
| L | Blubber | 50 | 427.75 | 8.76 | ND | ND | NQ | ND | NQ | 436.51 |
| | Brain | 4.5 | 257.34 | 1.17 | ND | ND | 19.98 | ND | NQ | 278.5 |
| | Kidney | 1.5 | 2298.18 | 19.3 | ND | ND | 137.81 | ND | 5.18 | 2460.46 |
| | Liver | 2.1 | 770.38 | 75.84 | ND | ND | 123.69 | ND | 6.42 | 976.33 |
| | Muscle | 0.8 ^b | 6144.4 | 108.55 | ND | ND | 455.34 | ND | 16.37 | 6724.67 |
| M | Brain | 2.6 | 26.5 | 1.54 | ND | ND | NQ | ND | NQ | 28.04 |
| | Kidney | 2.3 ^b | 972.34 | NQ | ND | ND | 131.65 | ND | 2.83 | 1106.82 |
| | Liver | 3.3 ^b | 1375.68 | 26.52 | ND | ND | 76.3 | ND | 2.66 | 1481.16 |
| | Muscle | 0.7 | 5820.46 | 87.39 | ND | ND | 372.04 | ND | 16.65 | 6296.54 |

^a Deltamethrin label included both deltamethrin and tralomethrin.

^b The lipid content of these samples was estimated.

Supplementary Information C.: Results of quantification analyses (ng g⁻¹ dw) (quantified PYRs only).

| Individual | Tissue | Dried Residue % | Type I PYRs | | Type II PYRs | | | | | TOTAL |
|------------|---------|-------------------|-------------|--------------|--------------|-------------|--------------|---------------------------|-------------|--------|
| | | | Permethrin | Tetramethrin | Cyfluthrin | Cyhalothrin | Cypermethrin | Deltamethrin ^a | Fenvalerate | |
| A | Blubber | 68.1 ^b | 73.08 | ND | ND | ND | NQ | ND | ND | 73.08 |
| | Brain | 25.0 ^b | 73.06 | ND | ND | ND | NQ | ND | ND | 73.06 |
| B | Blubber | 59.0 ^b | 55.47 | 1.25 | ND | ND | NQ | ND | ND | 56.72 |
| | Brain | 25.0 ^b | 6.28 | ND | ND | ND | 2.25 | ND | ND | 8.53 |
| | Kidney | 25.7 | 15.16 | ND | ND | 0.39 | 5.55 | ND | ND | 20.71 |
| | Muscle | 27.5 | 10.26 | 0.16 | ND | ND | 1.71 | ND | 0.08 | 12.21 |
| C | Kidney | 20.8 | 6.82 | ND | ND | 0.34 | NQ | ND | ND | 6.82 |
| | Muscle | 29.5 | 13.91 | ND | ND | ND | ND | ND | ND | 13.91 |
| D | Kidney | 22.7 | 143.08 | 7.10 | ND | ND | 11.01 | 1.20 | 0.42 | 162.81 |
| | Liver | 32.7 | 125.86 | 1.24 | ND | ND | 5.88 | 0.95 | 0.30 | 134.23 |
| | Muscle | 27.8 | 91.29 | 2.62 | ND | ND | 9.08 | 14.58 | 0.27 | 117.85 |
| E | Kidney | 19.2 | 54.60 | 0.20 | ND | ND | 2.03 | ND | ND | 56.83 |
| | Muscle | 25.1 | 55.57 | ND | ND | ND | ND | ND | ND | 55.57 |

Supplementary Information C.: Results of quantification analyses (ng g⁻¹ dw) (quantified PYRs only) (continuació).

| Individual | Tissue | Dried Residue % | Type I PYRs | | Type II PYRs | | | | | TOTAL |
|------------|---------|-------------------|-------------|--------------|--------------|-------------|--------------|---------------------------|-------------|--------|
| | | | Permethrin | Tetramethrin | Cyfluthrin | Cyhalothrin | Cypermethrin | Deltamethrin ^a | Fenvalerate | |
| F | Blubber | 50.3 ^b | 95.90 | 2.09 | ND | ND | NQ | ND | NQ | 97.99 |
| | Brain | 25.0 ^b | 66.46 | NQ | ND | ND | NQ | ND | ND | 66.46 |
| | Kidney | 22.3 | 15.04 | NQ | ND | ND | NQ | ND | 0.06 | 15.10 |
| | Liver | 28.6 | 50.74 | 0.52 | ND | ND | 3.88 | 0.68 | 0.28 | 56.10 |
| | Muscle | 24.6 | 10.82 | ND | ND | 0.54 | 2.56 | ND | ND | 13.38 |
| G | Blubber | 25.0 ^b | 116.78 | 2.48 | ND | ND | NQ | ND | NQ | 119.26 |
| | Kidney | 25.1 | 102.14 | 3.80 | ND | ND | 15.63 | ND | 0.46 | 122.04 |
| | Liver | 30.3 | 68.85 | NQ | ND | ND | 6.55 | 1.39 | 0.25 | 77.03 |
| | Muscle | 33.6 | 69.90 | 1.59 | ND | ND | 11.52 | ND | 0.34 | 83.35 |
| J | Blubber | 69.1 ^b | 16.38 | 0.49 | ND | ND | NQ | ND | ND | 16.87 |
| | Kidney | 22.6 | 75.98 | 0.58 | ND | ND | 5.26 | ND | NQ | 81.83 |
| | Liver | 26.1 | 19.70 | 0.43 | 0.80 | ND | 4.83 | ND | 0.11 | 25.87 |
| | Muscle | 24.8 | 5.98 | ND | ND | 0.27 | ND | ND | ND | 5.98 |
| K | Kidney | 26.4 | 21.39 | ND | ND | ND | 1.80 | ND | 0.10 | 23.30 |

Supplementary Information C.: Results of quantification analyses (ng g⁻¹ dw) (quantified PYRs only) (continuació).

| Individual | Tissue | Dried Residue % | Type I PYRs | | Type II PYRs | | | | | TOTAL |
|------------|---------|-------------------|-------------|--------------|--------------|-------------|--------------|---------------------------|-------------|--------|
| | | | Permethrin | Tetramethrin | Cyfluthrin | Cyhalothrin | Cypermethrin | Deltamethrin ^a | Fenvalerate | |
| K | Liver | 37.3 | 16.67 | 0.27 | ND | ND | NQ | ND | 0.20 | 17.14 |
| | Muscle | 29.7 | 17.86 | ND | ND | 0.26 | 1.15 | ND | ND | 19.01 |
| L | Blubber | 60.5 ^b | 352.62 | 7.22 | ND | ND | NQ | ND | NQ | 359.84 |
| | Brain | 25.0 ^b | 46.67 | 0.21 | ND | ND | 3.62 | ND | NQ | 50.50 |
| | Kidney | 23.7 | 146.60 | 1.23 | ND | ND | 8.79 | ND | 0.33 | 156.96 |
| | Liver | 28.4 | 55.52 | 5.47 | ND | ND | 8.91 | ND | 0.46 | 70.36 |
| | Muscle | 25.0 | 189.71 | 3.35 | ND | ND | 14.06 | ND | 0.51 | 207.62 |
| M | Brain | 25.0 ^b | 2.76 | 0.16 | ND | ND | NQ | ND | NQ | 2.92 |
| | Kidney | 19.8 | 114.22 | NQ | ND | ND | 15.46 | ND | 0.33 | 130.02 |
| | Liver | 31.6 | 143.77 | 2.77 | ND | ND | 7.97 | ND | 0.28 | 154.79 |
| | Muscle | 26.7 | 145.17 | 2.18 | ND | ND | 9.28 | ND | 0.42 | 157.04 |

^a Deltamethrin label included both deltamethrin and tralomethrin.

^b The dried residue of these samples was estimated.

4.3.3. Discussió de resultats

4.3.3.1 Exposició a piretroides

Els resultats de tots tres estudis mostren que el 100% dels individus presentaven nivells de piretroides als seus teixits. Aquest resultat ens permet afirmar que els piretroides són bioacumulables tot i que els estudis de metabolització en mamífers feien preveure el contrari (R. Lavado et al., 2014; Nakamura et al., 2007; Satoh & Hosokawa, 1998). Una hipòtesi per tal d'explicar aquests dos fets contradictoris alhora podria ser que la sobre-exposició de piretroides, junt amb d'altres possibles contaminants, saturin els sistemes de metabolització de xenobiòtics i aquests no siguin capaços d'eliminar completament els piretroides. D'aquesta manera, els piretroides s'anirien metabolitzant contínuament en el cos del individu però mai s'arribarien a eliminar completament ja que l'exposició a ells seria superior a la seva capacitat metabòlica. Malgrat que, potser, semblaria que aquesta hipòtesi no seria viable en un medi tan diluït com un mar o oceà, la contaminació dels cetacis és un fet i la seva exposició a molts contaminants antropogènics també tant al Mediterrani (Borrell & Aguilar, 2005; Fossi et al., 2007) com a oceans com l'Atlàntic (Mariana B. Alonso et al., 2015; Gui et al., 2014) o l'Indo-Pacífic (Gui et al., 2014). Fins i tot alguns autors han proposat mètodes d'avaluació de la contaminació marina fent un seguiment de l'expressió de les monooxigenases en biòpsies de cetacis (Godard-Codding et al., 2011). Evidentment, aquest mètode de control de la salut ambiental és molt poc específic i només és capaç de determinar l'exposició global a xenobiòtics.

Exposició dels peixos de riu

Els nivells que es van arribar a trobar en peixos de riu (de fins a 4938 ng g⁻¹ lw) estan en concordança amb altres estudis que s'han realitzat posteriorment a la publicació d'aquest article. Per exemple, a més dels dofins analitzats ens les [Publicació 4](#) i [5](#), en dofins ratllats que es van trobar varats a les costes andaluses es van arribar a quantificar nivells de piretroides de fins a 5210 ng g⁻¹ lw (Aznar-Aleman et al., 2017). Tot i això cal tenir en compte que aquests peixos es van mostrejar completament, es a dir, la mostra era representativa de tot l'individu. Per contra, l'anàlisi dels dofins analitzava únicament el fetge.

Tenint en compte que les espècies de peix estudiades eren comestibles, seria pertinent calcular l'exposició humana a aquests insecticides per aquesta via i estimar un TDI. A més, i com a conseqüència, caldria regular un màxim permès, com en el cas d'altres aliments. Actualment la legislació de la UE al respecte no es pronuncia en el cas concret de la presència

de piretroides sobre els productes de la pesca (EC, 2014). Això no obstant, sí que hi ha legislació sobre MRL de determinats piretroides, com la cipermetrina, en animals de caça. En aquest cas, el màxim permès seria de $0,05 \mu\text{g g}^{-1} \text{ ww}$. En el pitjor dels casos estudiats, en aquest estudi es van trobar nivells de piretroides totals de $0,03 \mu\text{g g}^{-1} \text{ ww}$. Tot i que, considerant aquests valors, semblaria que no hi ha risc per als humans, la proximitat en l'ordre dels valors fa pensar que també en pesca lliure caldria verificar aquests nivells permesos i fer avaluacions i estudis per tal d'assegurar la innocuïtat per als consumidors.

D'aquest estudi, també cal destacar la comparativa referent a d'altres contaminants. Com es pot comprovar a l'article, els piretroides eren els contaminants més abundants en els peixos de riu, tant pel que fa a la omnipresència en les mostres com pels nivells màxims assolits. Només alguns POPs i contaminants emergents com els PBDEs i els declorans tenien una ubiqüitat propera al 100%. Aquest perfil, és estrany comparat amb altres descrits. En llet materna, per exemple, es van descriure nivells mitjans de DDT 7,6 vegades superiors als mitjans per a piretroides sobre les mateixes donants de Sud-Àfrica (Bouwman et al., 2006). Val a dir, però, que el DDT tenia gran presència degut al control del vector portador de la malària. En estudis recents en dofins ratllats, els piretroides ocupaven el 3r lloc en nivells mitjans més elevats de contaminants, darrera dels productes naturals halogenats i dels PBDEs (Aznar-Alemaný et al., 2017).

Cal recordar, a més, que la toxicitat dels piretroides en els peixos és superior a la d'altres animals i que els ecosistemes aquàtics són molt sensibles a aquests contaminants (veure apartat de [toxicologia](#) del capítol [Introducció](#)). En aquest sentit, trobar aquests nivells de piretroides en la biocenosi d'aquest medi és preocupant pel que fa a la salut d'aquest medi.

Per últim, en aquest estudi es va comprovar que animals pescats en la mateixa àrea del riu presentaven perfils diferents de piretroides. Aquest fet, pot implicar que segons l'estrat dins el riu que el peix ocupa l'exposició a piretroides podria ser diferent. No només això, peixos del mateix punt de mostreig presentaven perfils isomèrics diferents, la qual cosa semblà més degut a una bioacumulació selectiva segons l'espècie. En qualsevol cas, d'aquests resultats se n'extreu la conclusió que als rius mostrejats hi arriba un còctel de piretroides al qual esta exposada tota la biota que hi habita.

[Exposició dels dofins](#)

En piretroides, a més, cal recordar que la metabolització mitjançant citocroms provoca l'aparició de metabòlits que han demostrat ser disruptors endocrins per a mamífers

(Yuanxiang Jin et al., 2011; R. Lavado et al., 2014). Així doncs, donat que els mamífers, i en aquest cas els dofins, acumulen els piretroides i els van metabolitzant lentament, l'exposició a aquests productes estrogènics serà contínua al llarg de la seva vida, tant si l'exposició a piretroides és continuada com si són exposicions periòdiques. A més, amb els nostres estudis es va demostrar la presència dels piretroides al cervell dels dofins i, donat que aquests insecticides interfereixen sobre el sistema nerviós, caldria avaluar millor l'efecte dels piretroides sobre òrgan. Per tant, els efectes toxicològics a llarg termini dels nivells de piretroides reportats en aquesta tesi és una línia d'investigació que requerirà molta més dedicació per part de la comunitat científica.

En els nostres estudis vam comprovar que semblava haver una tendència, en mascles, en tenir gran quantitat de piretroides al néixer, anar-los eliminant poc a poc mentre són considerats cries lactants i de bioacumular major quantitat de piretroides durant el creixement del dofí per, un cop arribat a l'adulthood, anar disminuint els nivells. Tot això, segons el publicat en la [publicació 4](#). La gran exposició al néixer només pot explicar-se amb la transferència materna, fet estudiat en molts altres estudis de mamífers (M. B. Alonso et al., 2015; Corrion et al., 2005; Viel et al., 2017; M. Zhao et al., 2014). El increment de piretroides durant l'adolescència i decreixement a l'adulthood podria explicar-se per dues vies. La primera faria referència a la dependència dels enzims metabolitzadors de contaminants amb l'edat. Com ja s'ha discutit, l'eficàcia dels enzims i, inclòs, la seva preferència isomero-selectiva, depèn de les isoformes que el caracteritzin, les quals, en mamífers, poden canviar amb l'edat (Hines, Simpson, & McCarver, 2016; Song et al., 2017). Amb aquesta hipòtesi, al arribar a l'adulthood els individus serien capaços de metabolitzar millor els piretroides. Aquesta explicació, no obstant, té la contra de què implica que fins a l'adulthood les isoformes dels enzims no són les definitives, mentre que els estudis citats sobre aquest tema durant diferencien les isoformes infantils amb les adultes, amb el que semblaria que durant la última infància i l'adolescència hi hauria una transició de isoformes dels enzims que no explicaria l'increment de nivells de piretroides. A més, durant la primera infància els nivells eren decreixents així que caldria donar alguna altra explicació com la dilució dels piretroides pel cos del infant gràcies al creixement ràpid del individu.

La segona explicació, podria ser un balanç entre l'exposició a piretroides via dieta i eliminació lenta a través dels mecanismes de metabolització. Segons aquesta explicació, després del *input* inicial de piretroides via transferència materna, l'exposició a piretroides seria baixa, ja que només es deuria a la transferència via llet materna. A més, com en el cas de l'anterior hipòtesi, el ràpid creixement del individu provoca una dilució de la concentració de

contaminant per tot el cos. Així doncs, la diferència de pendent entre cria i adolescent es donaria en el moment de canvi de dieta. És sabut que els infants i adolescents tenen una relació de ingesta alimentària per kilogram de pes corporal superior al dels adults. Si els piretroides s'ingereixen via alimentària, l'exposició relativa al pes corporal durant l'adulthood serà inferior que en els estadis previs. Així doncs, es podria explicar que els nivells de piretroides augmentin fins a l'adulthood, moment en el qual lentament el metabolisme tendeix a buscar un equilibri entre quantitat de piretroides ingerits amb metabolitzats. Aquesta hipòtesi quedaria reforçada per la resta d'estudis que també fan preveure que la principal via d'exposició de piretroides és l'alimentària.

Per acabar aquesta discussió, cal matisar, però, que en d'altres estudis realitzats sobre la presència de piretroides en dofins, aquesta tendència descrita en aquesta [publicació 4](#) no ha sigut reproduïble (M. B. Alonso et al., 2015; Aznar-Aleman et al., 2017). Tot i així, factors com poca la disponibilitat de mostres recollides en períodes similars de temps i que la quantitat de mostres sigui representativa de cada grup (cries, juvenils i adults) és un problema en tots aquests estudis. Per tal de poder garantir aquest fet caldria fer un estudi molt més representatiu.

4.3.3.2 Preses de mostra per a la determinació de piretroides

Referent a la [publicació 5](#), a més dels nivells trobats, es varen estudiar una sèrie de factors que afectaven fins aleshores als nostres estudis. Per començar, calia saber si l'exposició mesurada en els diferents estudis sobre dofins es referia a una exposició pròxima al mostreig o una de representativa a l'exposició a llarg termini. També hi havia dubtes sobre el millor teixit per analitzar i, per últim, l'expressió de les dades.

Com s'exposa en aquesta publicació, es van analitzar diferents teixits. Els resultats demostraren la necessitat de mostrejar òrgans amb alt contingut en greix ja que en teixits com ara el muscular la presència de piretroides era més escassa (de 3,30 ng g⁻¹ a 51.9 ng g⁻¹ ww) i els valors fàcilment podien ser falsos negatius. El cervell, és un tipus de mostra difícil d'obtenir així que ja no es plantejava com a potencial teixit per a monitorejos. A més, el cervell sovint no és representatiu de la contaminació acumulada ja la barrera hemo-encefàlica acostuma a evitar la penetració d'alguns xenobiòtics al cervell. A la bibliografia s'ha comprovat l'efecte filtrador d'aquesta barrera amb els piretroides (Amaraneni et al., 2016). Per tant, quedaven per triar el greix, els ronyons i el fetge. Entre els valors de piretroides el fetge acostumava a donar uns valors amb menors dispersions amb la qual cosa, per estudis a llarg termini, seria un òrgan més adient ja que les tendències serien molt més fàcils de comprovar i atribuir a factors

ambientals i d'exposició i no tant a diferències interindividuais o factors puntuals del mostreig que deuriem afectar als nivells en ronyons però que no som capaços de controlar. Per últim, el greix semblava la matriu més adient per al mostreig ja que la presència de piretroides era en uns nivells acceptables (de $11,7 \text{ ng g}^{-1}$ a $218 \text{ ng g}^{-1} \text{ ww}$). Tot i així, per al seu anàlisi l'extracció dels piretroides era més complexa. Degut al contingut en greix, la quantitat de mostra que es podia analitzar era molt petita ($0,05 \text{ g}$) ja que una major quantitat saturava els cartutxos de SPE. Per tant, amb la metodologia emprada aquesta matriu també podria donar falsos negatius degut a la poca quantitat de mostra analitzada.

Així doncs, es determinà que la millor opció de presa de mostra per a la determinació dels piretroides en dofins era prendre una biòpsia del fetge. Ara bé, aquest procediment només es pot dur a terme en animals morts. Tenint això com a limitació, es va proposar la presa de biòpsies cutànies en animals vius per al mostreig d'aquests cetacis, mètode molt emprat en la determinació d'altres contaminants en dofins i balenes (Barón et al., 2015; Kucklick et al., 2011). D'aquestes biòpsies caldria prendre la part greixosa per tal d'analitzar-la. El fet de requerir molt poca quantitat de mostra per a l'anàlisi, en aquest cas, és oportú ja que la resta de mostra es pot emprar per d'altres anàlisis sobre aquests individus vius.

Finalment, pel que fa als resultats obtinguts, es va comprovar que per als piretroides no és representatiu triar una base lipídica per expressar-los. Donat que són metabolitzables per diversos teixits, que es poden unir a proteïnes amfifíliques, i que es troben en dispersió contínua per l'organisme, donar-los amb la referència lipídica produeix dificultat alhora d'entendre els resultats. Per exemple, en base lipídica el múscul semblaria ser on més quantitat de piretroides s'acumulen, arribant a valors de gairebé $6725 \text{ ng g}^{-1} \text{ lw}$. Això, realment, no és així. El múscul era on es quantificaven menys piretroides però, donat que aquest teixit té molt poca quantitat de greix, al fer la relació de la quantitat de piretroides respecte del greix apareixien valors molt grans. Per tant, malgrat que fins al moment en que es va fer aquest estudi la base triada sempre era la lipídica, per similitud amb altres contaminants orgànics, no és la més adient.

Evidentment, la base de ww és la més representativa de la quantitat de piretroides a la mostra. Aquesta no deixa entreveure problemes de malinterpretació de dades obtingudes ja que el nivell de piretroides és proporcional a la quantitat de mostra. Malgrat això, s'ha de tenir en compte que sovint es tracta de mostres obtingudes d'animals morts i varats a les costes, raó per la qual, des de que l'animal es morí fins que es va mostrejar poden haver deshidratacions. A més, per tal d'aturar els processos metabòlics i de degradació de les

mostres, aquestes es congelen i prèviament a l'anàlisi es descongelen. Aquest fet provoca l'efecte de l'exudació, és a dir, la pèrdua d'aigua del teixit degut a la ruptura de cèl·lules i la pèrdua de les estructures terciàries i quaternàries de les proteïnes que mantenen l'aigua lligada del teixit. Així doncs, aquests resultats en ww podrien no ser reproduïbles degut a la pèrdua d'aigua des de que l'animal mor fins a que la mostra s'analitza. Així doncs, la base més adient per expressar els resultats dels nivells de piretroides en mostres biològiques seria el dw.

4.4. Discussió global bioacumulació a la biota salvatge.

Com s'ha comprovat els residus de piretroides es presenten en totes les espècies no antàrtiques estudiades d'ambdós medis, terrestres i aquàtics. Això permet confirmar que encara que molts éssers vius siguin capaços de metabolitzar-los, l'exposició als piretroides per part de la fauna salvatge és massa gran com per a què puguin eliminar-los completament del seu organisme. Per tant, es pot confirmar la bioacumulació dels piretroides en aquests éssers. Els nivells als ecosistemes aquàtics semblen presentar nivells més elevats en la biota que no pas els terrestres, com senyala gràficament la [Figura 7](#), en la qual es representen els rangs de piretroides obtinguts en aquests estudis. Cal tenir en compte, però, que no són valors comparables ja que uns fan referència a ous, els altres a fetges i els altres a individus homogeneïtats.

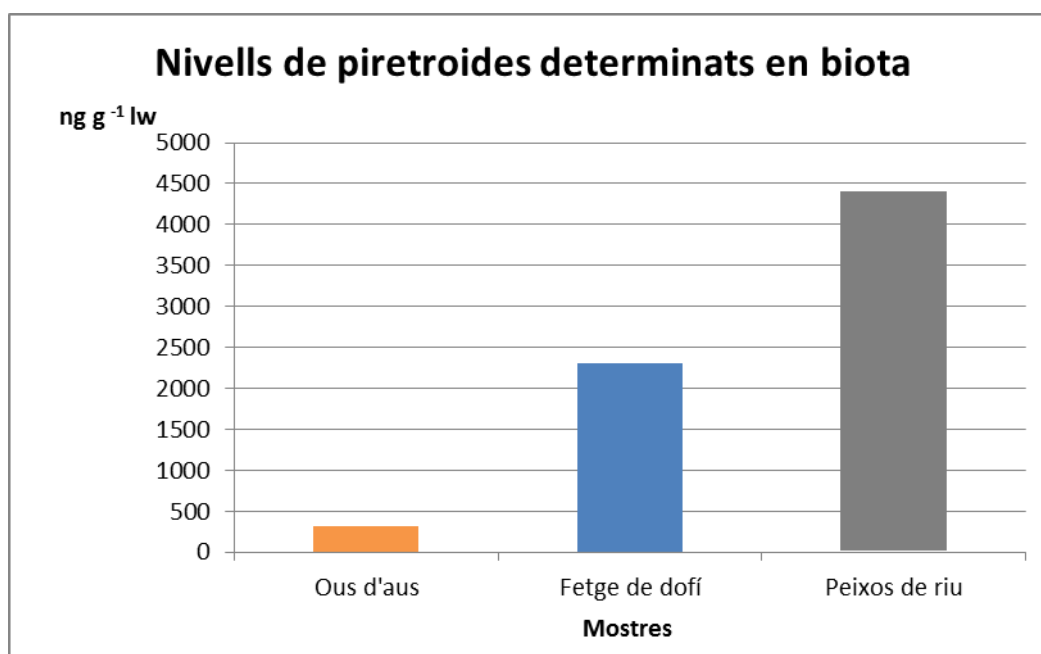


Figura 7: Comparativa simple dels rangs de concentració de piretroides trobats en els estudis de biota salvatge.

S'ha observat també que a diferents zones hi ha una exposició diferent de piretroides, com ara a les costes del Brasil hi ha major presència de permetrina i cipermetrina mentre que a les costes d'Andalusia hi havia més presència de permetrina i tetrametrina. Tot i així, també es

veuen diferències segons el medi estudiat. Per exemple, a l'àrea de Doñana, que, a priori semblaria que les exposicions en medi terrestre i aquàtic de la zona haurien de ser similars, mentre que en dofins es trobava la permetrina com a piretroide en major quantitat, en ous d'aus del Parc Nacional era la cipermetrina i la permetrina només es trobà en el 56% de les mostres. Pel que fa als rius ibèrics, la bifentrina, la cihalotrina i la cipermetrina es van trobar en totes les mostres mentre que la tetrametrina i la permetrina en el 83 i 81%, respectivament. Evidentment, hi ha molts factors que poden afectar a aquest fet, des de l'exposició deguda a diferents fonts de contaminació fins a diferències metabòliques. Per evidenciar més encara aquest fet, en peixos pescats en el mateix punt de mostreig la distribució de piretroides també era diferent.

Referent a la diferenciació isomèrica, es va comprovar que en totes les espècies estudiades la permetrina i la cipermetrina s'acumulaven els isòmers *cis* en major proporció que els *trans*. Per contra, en el cas de la tetrametrina era just al contrari, amb una bioacumulació preferent del isòmer *trans*. En aquest piretroide, però, no necessàriament implica una bioacumulació selectiva ja que és precisament el isòmer *trans* el més actiu i el que més s'empra a nivell de mesclures comercials.

Enantiomèricament, és més complex trobar patrons comuns a totes les espècies. Tot i així, es poden assenyalar tendències generals. Els piretroides tipus I solen acumular els enantiòmers *cis* de forma racèmica, es a dir, sense cap preferència clara per cap dels dos enantiòmers. En piretroides tipus II el primer parell enantiomèric *cis* semblava tenir un comportament similar al *cis* dels piretroides tipus I. Això, no obstant, en alguns peixos semblava comprovar-se una tendència a acumular-se el enantiòmer (1*S*-3*S*) depenent del punt de mostreig. L'acumulació selectiva d'aquest enantiòmer de la cipermetrina també s'ha descrit a la bibliografia en musclos (Khazri et al., 2016). Del segon parell enantiomèric *cis*, semblaria que el isòmer (1*S*-3*S*-aR) seria el que més es bioacumularia tant en aus com en peixos.

Tots els resultats semblen apuntar cap a que la principal via d'exposició a piretroides seria la dieta, tot i que en cap dels estudis s'ha observat biomagnificació, probablement degut a que la metabolització dels piretroides en els diferents organismes de tots els estrats impedeix un augment progressiu dels nivells dins les cadenes tròfiques.

També s'ha vist que malgrat animals propers a les fonts de contaminació presenten nivells relativament elevats de piretroides, aquests contaminants no són capaços de traslladar-se

grans distàncies, raó per la qual, els ecosistemes més allunyats, com els antàrtics, serien lliures d'aquesta contaminació.

Per aquestes raons, malgrat que els piretroides clarament no són POPs, es podrien tractar com a pseudo-POPs, sobretot pel que fa a potencials problemàtiques mediambientals, alimentàries i de toxicologia crònica, ja que semblaria que la tendència dins els organismes és d'anar-se metabolitzant lentament i aquests metabòlits podrien ser disruptors endocrins.

Finalment, s'ha estudiat la millor manera de determinar els piretroides en espècies de mamífers (mitjançant biòpsies hepàtiques en organismes morts i cutànies en vius) i s'ha demostrat que per aquests contaminants la millor manera d'expressar els resultats és en base de dw.

Capítol 5

Exposició en humans

5.1. Introducció.

Aquest últim capítol de la tesi està dedicat a l'avaluació de l'exposició i efecte dels piretroides sobre els humans. Com ja s'ha introduït prèviament, al inici d'aquesta tesi hi havia uns pocs treballs sobre determinació de piretroides en sang humana i en llet materna (Channa et al., 2012) (Maria Luisa Feo et al., 2012; Sereda et al., 2009). Aquests, però, es varen realitzar sobre població de risc altament exposada a piretroides. També existien molts altres estudis d'exposició humana realitzats sobre mostres d'orina humanes analitzant la presència de metabòlits de piretroides (Barr et al., 2010; Olsson et al., 2004). Prèviament ja s'ha discutit les deficiències i limitacions que presenten aquests mètodes (veure capítol d'[Introducció](#) apartat [Presència ambiental i comportament, Exposició humana](#)).

En el nostre cas, es pretenia comprovar, per una banda la presència de piretroides en llet materna humana en poblacions no necessàriament exposades a nivell global. D'altra banda, també es volia estudiar els nivells tòxics a nivell hepàtic dels piretroides. Per fer-ho calia posar-nos en context sobre els estudis de toxicitat en humans realitzats fins aleshores.

Diversos treballs al respecte aïllaven els enzims metabolitzadors dels piretroides i feien l'estudi sobre aquests per tal de descriure la metabolització i els metabòlits (Abass et al., 2012; Crow et al., 2007; Edward J. Scollon et al., 2009). D'altres, feien estudis sobre els microsomes hepàtics (Das et al., 2008; R. Lavado et al., 2014; Nakamura et al., 2007), els quals són orgànuls cel·lulars encarregats del tractament de xenobiòtics. Aquests estudis eren capaços, també, de descriure la preferència isomèrica del substrat, és a dir, si hi havia isomero-selectivitat en la metabolització.

Alguns estudis, també, exposaven cultius cel·lulars a piretroides per tal de veure no tan sols la degradació dels piretroides sinó també l'efecte sobre les pròpies cèl·lules. Aquestes podien ser cèl·lules fagocítiques (Gabbianelli et al., 2009), de carcinomes cervicals (línia cel·lular HeLa), carcinomes de pit (línia cel·lular MCF-7) (M. R. Zhao et al., 2010) o de cèl·lules d'hepatomes tumorals (An et al., 2010; Van den Hof et al., 2014; Želježić et al., 2016).

Els estudis amb cèl·lules hepàtiques, doncs, feien servir una línia cel·lular anomenada HepG2, molt coneguda i estudiada en estudis toxicològics, així com per aconseguir enzims o microsomes com els emprats en els estudis anteriorment esmentats. En els últims anys, però una nova línia cel·lular es presenta com una millor alternativa a la HepG2. Aquesta és una línia més completa anomenada HepaRG que conté més tipus de cèl·lules hepàtiques diferents (Andersson, Kanebratt, & Kenna, 2012), permetent fins i tot el creixement 3D de la línia

cel·lular sota condicions especials (Gunness et al., 2013). Aquest fet permet que errors que es poden produir en els estudis toxicològics en línies bidimensionals degut a la manca de transport o dificultat en el mateix es puguin corregir i obtenir uns resultats in vitro molt més representatius de la realitat dels efectes en humans (Gunness et al., 2013). Per tant, aquesta nova línia sembla ser molt més adient per a l'estudi de toxicologia de xenobiòtics (Antherieu, Chesne, Li, Guguen-Guillouzo, & Guillouzo, 2012; Le Hegarat et al., 2014).

Ara bé, en els estudis realitzats en aquesta tesi, es va comprovar que generalment els organismes presentaven més d'un piretroide alhora. Alguns autors descriuen l'exposició a contaminants com un "còctel" de contaminants (King, Grue, Grassley, & Fisk, 2013), referint-se, precisament, a la mescla de molts tòxics diferents. Durant les discussions dels resultats dels estudis d'aquesta tesi, a més, s'havia argumentat que la quantitat de contaminants era massa elevada com per que l'organisme fos capaç de metabolitzar-los completament, i, per tant, els acumulava fins ésser capaç de metabolitzar-los, si era possible. Això deixava clarament un dubte obert. Davant la presència de més d'un piretroide alhora, quins efectes toxicològics es podien descriure? Els efectes que es podien suposar eren, per exemple, la sinèrgia, la competència i l'antagonisme.

Amb la realització d'una estada a l'estranger, s'obria la porta a realitzar un estudi completament diferent als previs realitzats durant la tesi per tal de continuar la formació en àmbits complementaris de la investigació que s'havia dut a terme fins aleshores. Amb aquest objectiu, es va realitzar una estada a la Universitat de Saarbrücken (Alemanya) en un grup especialitzat en estudis toxicològics amb línies cel·lulars hepàtiques HepG2 i HepaRG.

El plantejament de l'estudi va ser comprovar la toxicologia de 4 piretroides comuns sobre aquestes dues línies tant i comprovar les possibles conseqüències de l'exposició conjunta a més d'un piretroide sobre ambdues. Aquest piretroides eren la cis-bifentrina, la cis-cihalotrina, la permetrina i la cipermetrina. La tria d'aquests quatre responia al fet que eren molt comuns, que s'havien trobat residus en quantitat en llet materna en estudis previs i que disposàvem de metodologia adequada per avaluar-ne l'enantio-selectivitat de la metabolització.

En aquest capítol es presentaran els resultats del treball realitzat amb llets maternes i amb cèl·lules hepàtiques durant l'estada. A continuació es discutiran els resultats de tot plegat incloent discussions sobre enantioselectivitat dels piretroides en llet materna gràcies als resultats de la [Publicació 1](#).

5.2. Piretroides en llet materna.

En aquest apartat es presentarà un últim treball publicat dins el marc d'aquesta tesi sobre l'estudi en llet materna dels piretroides, la [Publicació 6](#). Aquest estudi es va realitzar sobre població principalment no exposada de diferents països on, presumiblement l'exposició a piretroides podia ser diferent.

Per dur-lo a terme es va col·laborar amb la universitat de Rio de Janeiro (Brasil) i la Pontificia Universidad Javeriana de Cali (Colòmbia). Ambdues ens van cedir una sèrie de mostres de llet materna que arribava al laboratori liofilitzada i congelada a -20°C . Un cop al laboratori es desaven en condicions de temperatura i humitat controlades fins a l'anàlisi per a la determinació de piretroides. Per tal de tenir més informació a nivell global, es va mostrejar, a més, mares de Barcelona per tal de completar l'estudi. En aquest cas, la liofilització i congelació de les mostres es duia a terme en el mateix laboratori d'anàlisi.

Per tal de conèixer les repercussions d'aquesta exposició, es va fer una avaluació del risc per als lactants que prenen aquelles llets. Amb els valors estimats de llet materna ingerida diàriament per un lactant, es van calcular els EDI de determinats piretroides i es van avaluar per considerar si aquestes mostres de llet materna eren segures per a un lactant, prenent els valors d'ADI suggerits per la UE.

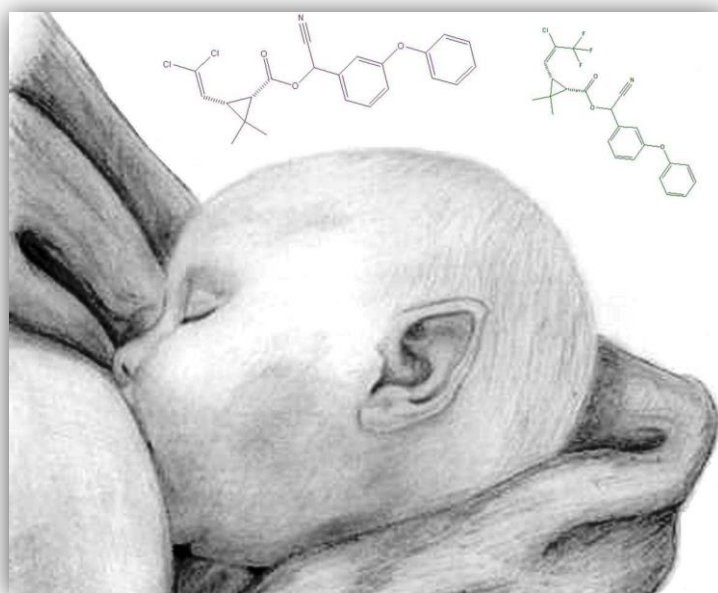
Publicació 6:

Pyrethroids in human breast milk: occurrence and nursing health risk evaluation

Cayo Corcellas ; Maria Luisa Feo ; Joao Paulo Torres;
Olaf Malm; William Ocampo-Duque; Ethel Eljarrat ;
Damià Barceló

Environment International (2012)

IF: 5,929





Pyrethroids in human breast milk: Occurrence and nursing daily intake estimation

Cayo Corcellas^a, Maria Luisa Feo^a, Joao Paulo Torres^b, Olaf Malm^b, William Ocampo-Duque^c, Ethel Eljarrat^{a,*}, Damià Barceló^{a,d}

^a Dep. of Environmental Chemistry, IDAEA, CSIC, Jordi Girona 18-26, 08034 Barcelona, Spain

^b Lab. of Radioisotopes, Biophysics Institute, Rio de Janeiro, Brazil

^c Faculty of Engineering, Pontificia Universidad Javeriana, Cali, Colombia

^d Catalan Institute for Water Research (ICRA), Parc Científic i Tecnològic de la Universitat de Girona, Girona, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 29 February 2012

Accepted 29 May 2012

Available online xxxx

Keywords:

Cypermethrin

Esfenvalerate

Fenvalerate

Lambda-cyhalothrin

Permethrin

ABSTRACT

There is an assumption that pyrethroid pesticides are converted to non-toxic metabolites by hydrolysis in mammals. However, some recent works have shown their bioaccumulation in human breast milk collected in areas where pyrethroids have been widely used for agriculture or malaria control. In this work, thirteen pyrethroids have been studied in human breast milk samples coming from areas without pyrethroid use for malaria control, such as Brazil, Colombia and Spain. The concentrations of pyrethroids ranged from 1.45 to 24.2 ng g⁻¹ lw. Cypermethrin, λ-cyhalothrin, permethrin and esfenvalerate/fenvalerate were present in all the studied samples. The composition of pyrethroid mixture depended on the country of origin of the samples, bifenthrin being the most abundant in Brazilian samples, λ-cyhalothrin in Colombian and permethrin in Spanish ones. When the pyrethroid concentrations were confronted against the number of gestations, an exponential decay was observed. Moreover, a time trend study was carried out in Brazil, where additional archived pool samples were analyzed, corresponding to years when pyrethroids were applied for dengue epidemic control. In these cases, total pyrethroid levels reached up to 128 ng g⁻¹ lw, and concentrations decreased when massive use was not allowed. Finally, daily intake estimation of nursing infants was calculated in each country and compared to acceptable WHO levels. The estimated daily intakes for nursing infants were always below the acceptable daily intake levels, nevertheless in certain samples the detected concentrations were very close to the maximum acceptable levels.

© 2012 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Pyrethrins are natural insecticides produced by certain species of chrysanthemum such as *Chrysanthemum cinerariaefolium*. Chemically, they are ethers from chrysanthemic acid. In order to increase their stability in the environment, some different derivatives have been synthesized. These semi-synthetic compounds are named pyrethroids. Their success as pesticides is due to its neurological toxicity slowing the kinetics of sodium channels in the neuronal membranes. Structurally, there are two types of pyrethroids: type II with a cyanic group in position α respect the carboxylic group, and type I without it (Gosselin, 1984).

These pesticides had been intensively used for malaria and dengue control against *Aedes spp.*, among other vector mosquito species. But these mosquitoes developed resistance to pyrethroids (Lima et al., 2011). For instance, in Brazil in 1999, pyrethroids were introduced to replace organophosphate insecticides such as temephos and malathion. However, three years later there was evidence of resistance against cypermethrin (da-Cunha et al., 2005).

Pyrethroids contain 2–3 chiral centers depending on their structure, so each pyrethroid could contain 2 or 4 enantiomer pairs and different diastereoisomers. They are hydrophobic compounds with log octanol–water partition coefficient (K_{ow}) values near to 6 (Feo et al., 2010a) and their environmental persistence uses to be short (between 12 and 197 days) (Feo et al., 2010b). Nevertheless, since in the last decades the usage of pyrethroids has increased widely in the indoor as household insecticides, insect-control products, pet shampoos and lice treatments, and in the outdoor as agricultural pesticides and for pest control, they are almost ubiquitous and, as long as they are dumped continuously, they will be always present in the environment.

One of the most important aspects in pollutant studies is the toxicity of the compound on non-target organism. For pyrethroids, they are known to have high toxicity in fish (San Francisco Estuary Project, 2003). However, in mammals it is unclear but it seems that they have carcinogenic and endocrine disrupting effects (Cox, 1996; George et al., 2011; Liua et al., 2011). Toxicity in humans was expected to be low because pyrethroids are converted to non-toxic metabolites, such as phenoxybenzoic acid, by hydrolysis in mammals (Chambers, 1980; Demoute, 1989; Godin et al., 2007). That explains why most of pyrethroid exposure studies are based on the analysis of this metabolite in urine samples. Contrary to this assumption, in

* Corresponding author.

E-mail address: eeeqam@cid.csic.es (E. Eljarrat).

Table 1
Information about milk donors.

| Country | Number of mothers | Year of recollection | Mother's age (range) | Parity (range) |
|------------------|-------------------|----------------------|----------------------|----------------|
| <i>Brazil</i> | | | | |
| Rondônia | 9 | 2009/10 | 15–35 | 1–4 |
| São Paulo | 8 | 2009/10 | – ^a | – ^a |
| <i>Colombia</i> | | | | |
| Santiago de Cali | 27 | 2010/11 | 16–40 | 1–8 |
| <i>Spain</i> | | | | |
| Barcelona | 6 | 2009 | – ^a | 1–2 |

^a In these cases, range have not been included because values are not available for all the collected samples.

2001, Zehringer and Herrmann found pyrethroids in human breast milk in urban Swiss population. Other recent works have also shown the bioaccumulation of pyrethroids in human breast milk, with levels up to 2000 ng g⁻¹ lw (Sereda et al., 2009; Feo et al., 2012). These studies were carried out with population from areas in which pyrethroids were mostly applied as insecticides in agriculture, domestic use and for malaria control. However, there are very few works reporting pyrethroid levels in human breast milk.

The objective of this work is to study the presence of 13 different pyrethroids in human breast milk samples collected from different countries in Europe (Spain) and South-America (Brazil and Colombia), including urban and rural areas where different pyrethroids are used. Fifty six human milk samples were collected and analyzed by GC–MS–MS, for the determination of concentration levels of pyrethroids as well as their isomeric composition.

2. Materials and methods

2.1. Study areas

Twenty human breast milk samples from Brazil, 27 from Colombia and 6 from Spain were collected. Samples coming from Brazil corresponded to two different zones: São Paulo (urban), a big city with an associated large metropolitan area, and Rondônia (rural), a state near to Amazon. All samples collected during 2009 and 2010 were individual samples. Moreover, three additional samples were included in the study, corresponding to archived pools of different individuals: pool 1, a pool of 10 individuals from Rondônia collected in 2003; pool 2, a pool of 2 individuals from Amazonia collected in 2004; and pool 3, a pool of 4 individuals from Rondônia collected in 2006. Samples from Colombia were collected during 2011 in Santiago

de Cali, a city with more than 2 million inhabitants. Rural, urban, and industrial areas were considered. In the industrial area, there is a factory producing insecticides based in cypermethrin pyrethroid for use in cattle. Finally, samples from Spain were collected from the metropolitan area of Barcelona during 2009.

2.2. Sample collection

All samples were collected under the signed donor consent. The mothers were asked to complete a questionnaire for information about residence, home use of pesticides, maternal age, parity, new born weight and sex. The most relevant information for this study was summarized in Table 1. The breast milk (between 10 and 50 mL) was collected either by use of a breast pump or by hand-expressing the milk into pre-washed glass containers. Previously, blanks of this material proved the absence of pyrethroids on it. That operation was carried out in enabled medical centers. After milk collection, samples were frozen at –20 °C, lyophilized, homogenized and stored at –20 °C in pre-washed glass containers until analysis in the laboratory. Samples from South America were shipped lyophilized in glass bottles, and on arrival to the analytical laboratory, they were preserved in the same way as mentioned above, until analysis.

2.3. Standards and reagents

The pyrethroid standards used were the commercial analytical standards of bifenthrin, λ-cyhalothrin, esfenvalerate, resmethrin and a mixture of cyfluthrin, cypermethrin, deltamethrin, fenvalerate, permethrin, phenothrin and teramethrin. As surrogate standards d₆-trans-permethrin and d₆-trans-cypermethrin were chosen. All of them were purchased from Dr. Ehrenstorfer (Augsburg, Germany). Organic solvents were obtained from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA).

Standard solutions were prepared in ethyl acetate. In order to check the linearity of the method, calibration curves were prepared at different concentrations ranging between 0.15 and 40 ng mL⁻¹.

2.4. Sample preparation

The sample preparation methodology was based on the previously published method by Feo et al. (2012). According to that, each homogeneous freeze-dried sample was exactly weighed (0.1 g) in a glass container and fortified with 4 ng of d₆-trans-permethrin and 2 ng of d₆-trans-cypermethrin. After an adequate time for surrogate diffusion, samples were extracted by sonication with 20 mL of hexane:dichlorometane (2:1) in a Raypa, UCI-200 bath for 15 min.

Table 2
MS–MS and analytical quality parameters.

| | t _R ^a (min) | 1st transition ^b | 2nd transition ^c | CE ^d (eV) | Recovery (%) | LOD (pg g ⁻¹ lw) | LOQ (pg g ⁻¹ lw) |
|------------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------|-----------------------------|----------------------|--------------|-----------------------------|-----------------------------|
| Bifenthrin | 7.99 | 205 → 121 | 205 → 141 | 10 | 70 | 32 | 97 |
| λ-cyhalothrin | 8.87 | 205 → 121 | 205 → 141 | 10 | 82 | 3.6 | 11 |
| Permethrin | 9.03;9.13 | 207 → 35 | 209 → 35 | 2 | 80 | 1100;1100 | 3200;3200 |
| Cyfluthrin | 9.43;9.51;9.59 | 207 → 35 | 209 → 35 | 2 | 60 | 160;160;3.1 | 480;480;9.2 |
| Cypermethrin | 9.65;9.74;9.81 | 207 → 35 | 209 → 35 | 2 | 72 | 140;140;140 | 430;430;430 |
| Es/fenvalerate | 10.28;10.45 | 211 → 167 | 213 → 169 | 2 | 70 | 63;63 | 190;190 |
| Deltamethrin/tralomethrin | 10.88 | 297 → 79 | 297 → 81 | 2 | 48 | 2.8 | 8.3 |
| Tetramethrin | 7.92;8.01 | 331 → 167 | Not detected | 2 | 86 | 45 | 140 |
| Phenothrin | 8.2 | 349 → 149 | 349 → 169 | 2 | 50 | 1100;1100 | 3200;3600 |
| Resmethrin | 7.68;7.75 | 337 → 149 | 337 → 187 | 10 | 91 | 800;780 | 2400;2300 |
| Fluvalinate | 10.43;10.50 | 294 → 250 | 294 → 194 | 15 | 68 | 19;24 | 62;81 |
| d ₆ -trans-permethrin | 9.10 | 213 → 35 | 215 → 35 | 2 | – | – | – |
| d ₆ -trans-cypermethrin | 9.72;9.78 | 213 → 35 | 215 → 35 | 2 | – | – | – |

^a Retention time in minutes. Values for each resolved isomer.

^b Quantification transition.

^c Confirmation transition.

^d Collision energy.

Table 3
Pyrethroid concentrations (expressed in ng g⁻¹ lw) in each group of studied samples.

| | Milk fat (%) | Tetramethrin | Bifenthrin | λ-Cyhalothrin | Deltamethrin/tralomethrin | Esfenvalerate/fenvalerate | Permethrin | Cypermethrin | Total |
|-------------------------|--------------|--------------|------------|---------------|---------------------------|---------------------------|------------|--------------|-------|
| <i>Brazil</i> | | | | | | | | | |
| Rondônia (n=9) | | | | | | | | | |
| Mean | 3.01 | 0.36 | 1.44 | 1.99 | 0.50 | 0.20 | 3.57 | 1.48 | 9.54 |
| Median | 2.76 | 0.39 | 0.65 | 0.98 | 0.49 | 0.18 | 4.08 | 1.22 | 8.34 |
| Min | 1.01 | nd | nd | nd | 0.20 | 0.06 | 0.92 | 0.22 | 2.73 |
| Max | 5.46 | 0.82 | 7.48 | 8.77 | 0.92 | 0.38 | 5.19 | 4.05 | 19.1 |
| SD | 1.49 | 0.30 | 2.52 | 2.86 | 0.22 | 0.12 | 1.64 | 1.25 | 5.68 |
| Num positives (%) | | 78 | 78 | 89 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| São Paulo (n=8) | | | | | | | | | |
| Mean | 3.18 | 0.45 | 2.80 | 0.29 | 0.14 | 0.05 | 0.36 | 1.44 | 5.23 |
| Median | 3.33 | nd | 1.63 | 0.19 | nd | 0.02 | 0.17 | 1.32 | 4.51 |
| Min | 0.46 | nd | 0.21 | 0.05 | nd | 0.01 | 0.03 | 0.61 | 1.84 |
| Max | 5.42 | 0.96 | 6.71 | 0.78 | 0.57 | 0.17 | 1.70 | 2.89 | 9.64 |
| SD | 1.51 | 0.41 | 2.58 | 0.24 | 0.28 | 0.06 | 0.56 | 0.73 | 3.01 |
| Num positives (%) | | 38 | 100 | 100 | 13 | 75 | 100 | 100 | 100 |
| <i>Colombia</i> | | | | | | | | | |
| Santiago de Cali (n=27) | | | | | | | | | |
| Mean | 2.88 | 2.20 | 0.02 | 1.06 | 0.23 | 0.46 | 0.91 | 4.25 | 9.29 |
| Median | 2.48 | 0.83 | nd | 0.6 | nd | 0.22 | 0.42 | 2.59 | 6.02 |
| Min | 1.22 | nd | nd | 0.05 | nd | nd | nd | 0.70 | 1.45 |
| Max | 6.43 | 14.8 | 0.48 | 4.49 | 1.86 | 3.11 | 5.12 | 16.4 | 24.2 |
| SD | 1.22 | 3.22 | 0.09 | 1.09 | 0.47 | 0.73 | 1.15 | 4.22 | 7.13 |
| Num positives (%) | | 85 | 8 | 100 | 22 | 70 | 93 | 100 | 100 |
| <i>Spain</i> | | | | | | | | | |
| Barcelona (n=6) | | | | | | | | | |
| Mean | 3.17 | 1.28 | 0.19 | 0.31 | 0.42 | 0.08 | 2.20 | 0.40 | 4.89 |
| Median | 3.50 | 0.56 | 0.12 | 0.14 | 0.40 | 0.04 | 2.29 | 0.31 | 4.84 |
| Min | 1.43 | nd | nd | 0.04 | 0.09 | nd | 1.30 | 0.09 | 2.63 |
| Max | 4.36 | 4.54 | 0.47 | 0.85 | 0.71 | 0.33 | 3.17 | 1.01 | 7.79 |
| SD | 1.16 | 1.74 | 0.22 | 0.35 | 0.23 | 0.13 | 0.73 | 0.35 | 2.00 |
| Num positives (%) | | 83 | 67 | 100 | 100 | 67 | 100 | 100 | 100 |

Subsequently, extracts were centrifuged at 3500 rpm for 5 min. The organic phase remained at the top, and was collected in a vial and evaporated under nitrogen stream. The entire extraction step was performed twice in order to assure the quantitative extraction, taking care to collect both solvent residues together.

The breast milk extract was cleaned up by solid phase extraction with a cartridge of basic alumina (5 g, 25 mL) and a C18 cartridge (2 g, 15 mL) in tandem, conditioned with 25 mL of acetonitrile and eluting the sample with 30 mL of acetonitrile. The extract was evaporated under a nitrogen stream and the residue reconstituted with 100 µL of ethyl acetate, ready for GC–NCl–MS–MS analysis.

2.5. GC–NCl–MS–MS analyses

An Agilent Technologies 7890A GC system coupled to 7000A GC/MS Triple Quad was the instrument used for the analysis in NCl mode. The capillary column used was a 15 m × 0.25 mm i.d., 0.1 µm film thickness DB-5 ms containing 5% phenyl methyl siloxane. The carrier gas was helium at 1 mL min⁻¹ constant flow. The GC was operating in the splitless mode during 0.8 min with an inlet temperature of 270 °C. The ion source temperature was 250 °C and ammonia was the reagent gas at 2.04 × 10⁻⁴ Torr. The temperature program was from 100 °C (held for 1 min) to 230 °C at 15 °C min⁻¹, next at 10 °C min⁻¹ to 310 °C (held for 2 min). The injection volume was 3 µL. MS–MS parameters were selected as those optimized by Feo et al. (2011). Operation conditions are shown in Table 2. The mass resolution was set in wide mode in order to increase sensitivity. Limits of detection and quantification ranged between 2.3–1100 pg g⁻¹ lw and 8.3–3600 pg g⁻¹ lw, respectively. Method recoveries were between 48% and 100% with relative standard deviations between 3 and 20%.

2.6. Lipid content

Given that pyrethroids are lipophilic compounds, they are mainly present in the fat fraction. Therefore, and because of the little uniformity in human milk composition, the concentrations of pyrethroids are given per gram of lipid weight (lw) instead of wet weight (ww). Thus, the lipid content had to be determined for each sample. This was done by an equivalent organic extraction of 1 g of each sample, followed by further gravimetric measurement.

2.7. Estimation of daily intake

World Health Organization (WHO) and Food and Agriculture Organization (FAO) defined the Acceptable Daily Intake (ADI) as a “measure of the amount of a specific substance on food or drinking

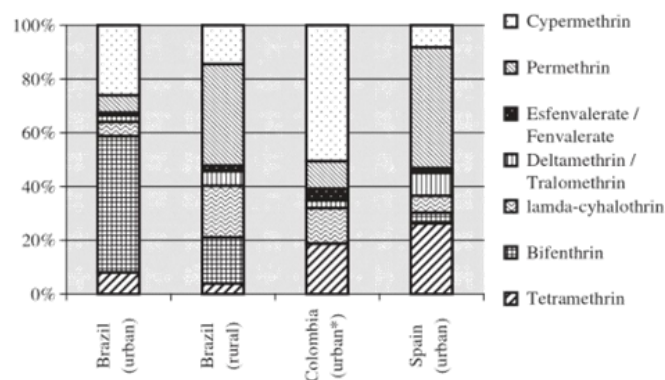


Fig. 1. Percentage of contribution of each pyrethroid to the total pyrethroid content in each country.

Table 4
Pyrethroid concentrations (expressed in ng g^{-1} lw) in human pool samples collected in the rural Brazilian area in 2003, 2004 and 2006.

| | Tetramethrin | Bifenthrin | λ -cyhalothrin | Deltamethrin/ tralomethrin | Esfenvalerate/ fenvalerate | Permethrin | Cypermethrin | Total |
|---------------|--------------|------------|------------------------|-------------------------------|-------------------------------|------------|--------------|-------|
| <i>Brazil</i> | | | | | | | | |
| Pool1 (2003) | 6.20 | 6.73 | 6.52 | nd | nd | nd | 93.0 | 112 |
| Pool2 (2004) | 5.57 | 6.37 | 6.31 | nd | 6.44 | 18.8 | 84.2 | 128 |
| Pool3 (2006) | 1.51 | nd | 5.66 | nd | 3.91 | nd | 4.14 | 15.2 |

water that can be ingested on a daily basis over a lifetime without an appreciable health risk" (WHO and FAO, 1962). In order to know if the dose ingested is upper or lower than the legislated parameter, it is necessary to estimate the daily dosage from concentrations of substance in feed. The estimated daily intake (EDI) was calculated for each pyrethroid following WHO recommendations as:

$$EDI_i = C_i F M_b \quad (1)$$

where i is a pyrethroid, C is the concentration in samples (μg per gram of lw), F is the lipid content fraction in breast milk and M_b is the daily consumption of milk (grams per kilogram of body weight). This last value was taken as $175 \text{ g kg}^{-1} \text{ day}^{-1}$ assuming the considerations from US EPA (US Environmental Protection Agency, 2002): the daily intake rate of breast milk and body weight for a 1-month-old infant were on average 702 mL of milk per day (723 g of milk per day) and 4.14 kg, respectively.

3. Results and discussion

3.1. Pyrethroid levels in human breast milk

Basic statistics of pyrethroid levels found in breast milk samples are reported in Table 3. Each batch of samples analyzed together included one procedure blank. None of those showed levels with upper LOQ for any analyte. Pyrethroids were detected in all the human milk samples analyzed, at concentration levels ranging between 1.45 and 24.2 ng g^{-1} lw. Similar total results were obtained for the three different countries. Results from the urban Spanish area (mean value of 4.89 ng g^{-1} lw) were very close to those obtained in the urban Brazilian area (mean value of 5.23 ng g^{-1} lw). Slightly higher values were obtained for a rural Brazilian area (mean value of 9.54 ng g^{-1} lw). Finally Colombian levels (mean value of 9.12 ng g^{-1} lw) were similar to those obtained in the rural Brazilian area. Nevertheless, it should be pointed out that these differences were not statistically significant following a two tail t -test $P < 0.05$.

When the mother's ages were confronted with pyrethroid concentrations, the correlation coefficients were around 0.010, indicating that there was no relationship between pyrethroid concentration and mother age. No connection was found between domestic use of insecticide and levels of pyrethroids in breast milk samples.

Cypermethrin was detected in all the samples, and permethrin, λ -cyhalothrin and fenvalerate/esfenvalerate were also nearly ever-present. Resmethrin, fluralinate, cyfluthrin and phenotrin were not found in any milk sample. The highest concentrations were found for cypermethrin with values up to 16.4 ng g^{-1} lw, followed by tetramethrin with values up to 14.8 ng g^{-1} lw, λ -cyhalothrin with values up to 8.77 ng g^{-1} lw, bifenthrin with values up to 7.48 ng g^{-1} lw, permethrin with values up to 5.19 ng g^{-1}

lw, esfenvalerate/fenvalerate with values up to 3.11 ng g^{-1} lw and finally deltamethrin/tralomethrin with values up to 1.86 ng g^{-1} lw.

Fig. 1 shows the mean percentage contribution of each pyrethroid to the total pyrethroid content. Regarding the distribution pattern of the different pyrethroids analyzed, we observed some differences depending on the studied area. For instance, the high contribution of bifenthrin in human samples collected in Brazil was remarkable, with values up to 45% and 74% for samples collected in Rondônia and São Paulo respectively. On the other hand, this compound was rarely found in the other regions, indicating a higher use of bifenthrin in Brazil with respect to Colombia or Spain. Cypermethrin was the pyrethroid most ubiquitous, with the most important contribution found in Colombian samples with values from 9.4% to 93% and with a mean value of 50%. This fact could be explained by the known Colombian use of cypermethrin on cattle and the fact that the most common commercial products used in Colombia for home pest control do contain this pyrethroid. Being a tropical country, the presence of undesirable insects in home is controlled by abused use of commercial insecticides whose active ingredients are pyrethroid mixtures. Finally, in Spanish samples, permethrin was the pyrethroid present in highest concentration with a mean contribution of 45% to the total mixture of the pyrethroids analyzed.

The number of published studies related to pyrethroid concentration levels in human breast milk is limited. Zehring and Herrmann (2001) reported levels of pyrethroids slightly higher than those obtained in the present study, ranging from not detected to 42 ng g^{-1} lw, depending on the pyrethroid. Bouwman et al. (2006) and Sereda et al. (2009) detected pyrethroids in human samples collected in South Africa in concentrations, between 5.00 and 19826 ng g^{-1} lw. More recently, Feo et al. (2012) analyzed samples of human breast milk collected in Mozambique during 2002. They detected various pyrethroids at concentrations ranging from 87 to 1200 ng g^{-1} lw. The concentrations reported in these three last studies appear to be higher. That could be because of the extensive use of pyrethroids both for malaria control and for agricultural activities.

Table 4 shows the results obtained for the three archived pool samples collected in the rural Brazilian area: pool 1 (Rondônia, 2003), pool 2 (Amazonia, 2004) and pool 3 (Rondônia, 2006). Total pyrethroid concentrations were 112 , 128 and 15.2 ng g^{-1} lw for the samples corresponding to 2003, 2004 and 2006, respectively. Results obtained for 2003 and 2004 are higher than those of 2006, and the latter are similar to those obtained in 2009–2010 (mean value of 9.54 ng g^{-1} lw). These results could be in accordance with the pyrethroid use in this region. One of the major dengue epidemics in Brazil happened in 2001. Until this year, the organophosphorous (OP) insecticides were used for the dengue control. However, since mosquito developed resistance to OP, the National Health Foundation decided to change them for pyrethroid insecticides. Cypermethrin was the most applied pyrethroid (da-Cunha et al., 2005), and also was the compound showing the highest concentrations in the pool samples corresponding to 2003 and 2004, with values of 93.0 and 84.2 ng g^{-1} lw, respectively. The high concentrations found in the post-epidemic periods (2003/04), and the lower ones afterwards, may indicate a good start up of *Programa Nacional de Controle da Dengue* (PNCD). In 2002, Brazil government approved the PNCD with specified guidelines to control dengue. This program, although allowed the extensive use of certain insecticides such as OP and pyrethroids under epidemic conditions in order to eradicate the vector of this kind of diseases, promoted the continuous good practices to minimize the mosquito populations with the aim of controlling the vector (Ministério da Saúde, 2002).

3.2. Isomeric ratios

It is known that hydrolytic enzymes work uniquely between different isomers of same pyrethroid in mice cells (Nakamura et al., 2007). That could cause distinct toxicity for each isomer (Jin et al., 2011; Zhang et al., 2008). This is why isomeric proportion was also evaluated in this study. The weight of each pyrethroid isomer on human breast milk samples was calculated as the relative abundance of one isomer against the sum of all isomers.

The isomeric ratio was determined for five pyrethroids: tetramethrin, permethrin and esfenvalerate/fenvalerate (with two different isomers), and cypermethrin and cyfluthrin (with four different isomers). As Fig. 2 shows, the mean percentage contributions of the first eluting isomer for permethrin and esfenvalerate/fenvalerate were 65% and 53%, respectively. In contrast, the percentage contributions for cyfluthrin, cypermethrin and tetramethrin were 37%, 29% and 10% respectively, indicating characteristic isomeric proportions. Regardless of the results observed, isomeric-specific accumulation in humans was not proved as there was no information available about isomeric pyrethroid composition in commercial mixtures. Such data would also allow us to understand the isomeric ratios of cypermethrin, which were statistically

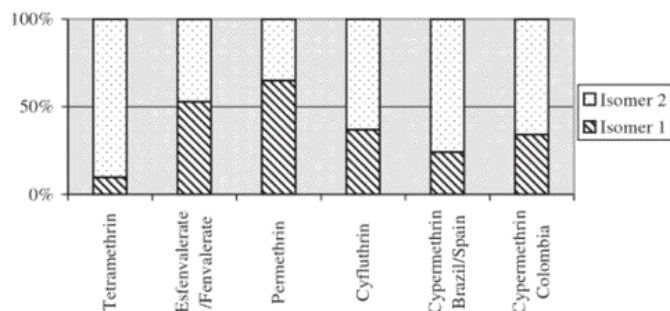


Fig. 2. Percentage of contribution of each isomer in human breast milk samples. (Isomer 1 corresponded to the first eluting isomer and Isomer 2 to the second one, with the exception of cypermethrin and cyfluthrin, where Isomer 2 corresponded to the sum of the second, third and fourth eluting isomers).

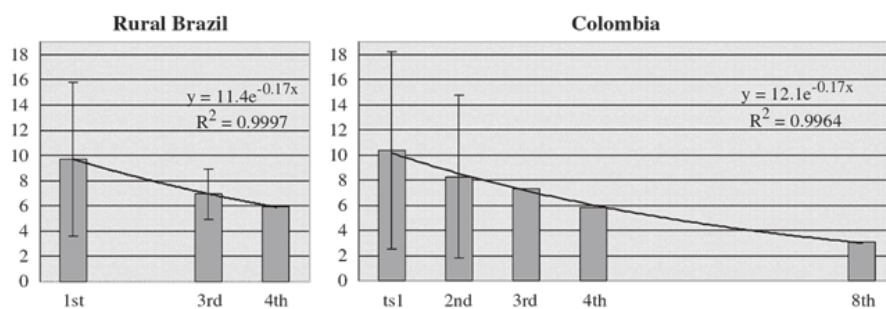


Fig. 3. Concentration levels ($\text{ng g}^{-1} \text{lw}$) of pyrethroids in human milk samples grouped by the number of gestations, in Brazil and Colombia.

different (two tail *t*-test, $P < 0.05$) depending on sample origin (mean value of 34 and 24%, for Colombian and Brazilian/Spanish, respectively).

3.3. Relationship between human milk levels and parity

In the cases of Brazil and Colombia, we have analyzed milk samples at different parities (Table 1). However, in the case of Spain we have only primipara and bipara mothers, so the relationship between pyrethroid levels and parity could not be studied. With this correlation, we evaluated whether the pyrethroids behave similarly to other families of pollutants, such as PCBs or PBDEs, where the increased pollutant load is transferred to the first child, and then milk levels decreased with the following child breast-fed (Haraguchi et al., 2009; Tanabe and Kunisue, 2007).

Fig. 3 showed the total concentration levels of pyrethroids in breast milk samples grouped by the number of breast-fed children, in Brazil and Colombia. As expected, the contamination in milk decreased with the parity, and an exponential decay was observed. The behavior was very similar in both studied areas: an exponential function with a pre-exponential factor near to 12 and a negative exponent near to -0.17 , with correlation coefficients (R^2) of 0.999 and 0.996 for Brazil and Colombia respectively, which were acceptable correlations.

However, some studies showed that there could be differences in pollutant levels in breast milk during lactation. Even so, it is not clear if that effect depends on lactation period itself or on other variables (LaKind et al., 2009). Since our samples were collected in a wide range of lactation periods (between 2 and 20 weeks), it was important to consider whether this variable was affecting the above results. In this sense, the correlation between pyrethroid levels in milk and lactation week was studied for each parity group. For both primipara and bipara mothers, correlation factors indicated that there was no significant influence of this parameter (0.244 and 0.162, respectively).

These results should be taken as an example of a potential trend. However, it is obvious that it would be necessary to conduct future studies in order to be able to confirm this observed behavior. Those studies would include a larger number of samples, and samples of different parities from the same mother so as to decrease personal factors such as diet and mother's habits. Nonetheless, following the same mother during different lactations would be difficult, especially when high parities will be studied. Moreover, since regulations change continuously, these comparisons between lactations could depend on sampling periods as results about archived Brazilian samples seem to show.

3.4. Nursing infant dietary intake estimation

Nursing infants are considered a risk group for several reasons. Firstly, their only food intake is breast milk. Secondly, their metabolism could not be mature enough to eliminate the pollutants they are exposed to. Thirdly, their ratio food ingested per body weight is the highest in humans. And fourthly, they are at a life stage of great growth and development, so they may be more affected by the presence of various pollutants such as pyrethroids. For all that, and to understand the magnitude of exposure to pyrethroids by infants, it is important to assess the nursing infant dietary intake.

Table 5 shows the established ADI values following European directions, as well as the EDI values (mean and range) calculated from the results obtained in our study for each country. Generally, samples collected in 2009/10 presented EDI values one or two orders of magnitude lower than ADI values, indicating no appreciable risk. Nevertheless, some specific samples presented certain EDI values close to the corresponding ADI. For instance, the higher EDI for λ -cyhalothrin observed in Brazil samples (2009–2010) was $3.90 \mu\text{g kg}^{-1} \text{bw day}^{-1}$ which was very close to the ADI value established at $5 \mu\text{g kg}^{-1} \text{bw day}^{-1}$. The situation observed for archived Brazilian samples is similar (2003 and 2004). Cypermethrin, the main applied pyrethroid for the dengue control, resulted on EDI values of 48.8 and $44.2 \mu\text{g kg}^{-1} \text{bw day}^{-1}$ for 2003 and 2004, respectively. These values were very close to ADI, established at $50 \mu\text{g kg}^{-1} \text{bw day}^{-1}$. Furthermore, λ -cyhalothrin also presented EDI values (3.42 and $3.31 \mu\text{g kg}^{-1} \text{bw day}^{-1}$) very close to the ADI value ($5 \mu\text{g kg}^{-1} \text{bw day}^{-1}$).

Nevertheless, since EDI is an estimated value, it depends on day-to-day variation in the composition milk, and even when results were relative to lipid content, levels of chemicals in breast milk could vary during lactation. At any rate, these results indicate the need to conduct controlled applications of pyrethroids, and highlight the need to carry out monitoring studies of these contaminants in human breast milk samples.

4. Conclusions

In view of the present study, pyrethroids seem to be ubiquitous contaminants in human breast milk samples. This could point out their potential for bioaccumulation, contradicting the assumption that all pyrethroids are metabolized by hydrolysis in mammals. Their presence is not just restricted to those cases in which pyrethroids were applied for malaria or dengue control, but also is reflected in samples collected in areas where pyrethroid use is reduced to agricultural and domestic applications in both rural and urban areas.

In this study we have shown that the highest pollutant load could be transferred from the mother to the first child, and then milk levels decreased with the following child breast-fed. Moreover, and considering human breast milk as the main food for nursing infants, pyrethroid levels should be studied carefully in this matrix in order to avoid an additional risk to infants. Limit levels were observed for certain pyrethroids, such as cypermethrin, when they were broadly used. However, also in areas without extensive use, currently, we found concentrations close to maximum safety levels, e.g. for λ -cyhalothrin.

Table 5

Estimated daily intake (EDI) of pyrethroids (expressed as $\mu\text{g (kg bw)}^{-1} \text{day}^{-1}$) calculated from the breast milk concentrations of these compounds in Brazil, Colombia and Spain.

| | Brazil | | | Colombia | | | Spain | | | ADI | | | |
|------------------------|-------------|-------------|-------------|-------------|------|------|-------------|------|------|------|--------|------|----|
| | Pool (2003) | Pool (2004) | Pool (2006) | (2009–2010) | | | (2010–2011) | | | | (2009) | | |
| | | | | Min. | Max. | Mean | Min. | Max. | Mean | Min. | Max. | Mean | |
| Bifenthrin | 3.53 | 3.34 | – | – | 1.33 | 1.18 | – | 0.30 | 0.01 | – | 0.33 | 0.12 | 15 |
| Cypermethrin | 48.8 | 44.2 | 2.17 | 0.21 | 1.80 | 0.62 | 0.78 | 4.60 | 1.85 | 0.07 | 0.25 | 0.19 | 50 |
| Deltamethrin | – | – | – | – | 0.16 | 0.15 | – | 1.30 | 0.12 | 0.07 | 0.27 | 0.20 | 10 |
| λ -cyhalothrin | 3.42 | 3.31 | 2.97 | – | 3.90 | 0.55 | 0.03 | 0.96 | 0.53 | 0.02 | 0.21 | 0.15 | 5 |
| Permethrin | – | 9.86 | – | 0.03 | 1.38 | 0.91 | – | 3.19 | 0.45 | 0.99 | 1.66 | 1.21 | 50 |

All these findings together, with the proved toxicology in little mammals by literature, make it important and necessary to include pyrethroids in human breast milk monitoring programs.

Acknowledgments

We thank all the women for their participation in the study. We also thank Alexandra Jelic for their assistance in revising the manuscript. This research work was funded by the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness through the project CEMAGUA (CGL2007-64551/HID).

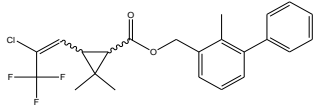
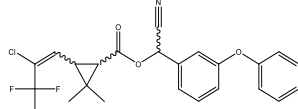
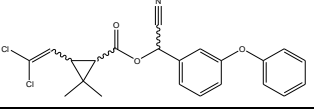
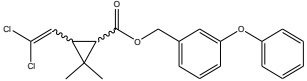
References

- Bouwman H, Sereda B, Meinhardt HM. Simultaneous presence of DDT and pyrethroid residues in human breast milk from a malaria endemic area in South Africa. *Environ Pollut* 2006;114:902–17.
- Chambers J. An introduction to the metabolism of pyrethroids. *Residue Rev* 1980;73:101–24.
- Cox C. Masculinity at risk, pesticides and male fertility. *J Pestic Reform* 1996;16:2.
- da-Cunha MP, Lima JBP, Brogdon WGB, Moya GE, Valle D. Monitoring of resistance to the pyrethroid cypermethrin in Brazilian *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) populations collected between 2001 and 2003. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2005;100(4):441–4.
- Demoute JP. A brief review of the environmental fate and metabolism of pyrethroids. *Pest Sci* 1989;27:375–85.
- Feo ML, Ginebreda A, Eljarrat E, Barceló D. Presence of pyrethroid pesticides in water and sediments of Ebro River Delta. *J Hydrol* 2010a;393:156–62.
- Feo ML, Eljarrat E, Barceló D. Determination of pyrethroid insecticides in environmental samples. *Trends Anal Chem* 2010b;29:7.
- Feo ML, Eljarrat E, Barceló D. Performance of gas chromatography/tandem mass spectrometry in the analysis of pyrethroid insecticides in environmental and food samples. *Rapid Commun Mass Spectrom* 2011;25:869–76.
- Feo ML, Eljarrat E, Manaca MN, Dobaño C, Barceló D, Sunyer J, et al. Pyrethroid use-malaria control and individual applications by households for other pests and home garden use. *Environ Int* 2012;38(1):67–72.
- George J, Srivastava AK, Singh R, Shukla Y. Cypermethrin exposure leads to regulation of proteins expression involved in neoplastic transformation in mouse skin. *Proteomics* 2011;11(22):4411–21.
- Godin SJ, Crow JA, Scollon EJ, Hughes MF, DeVito MJ, Ross MK. Identification of rat and human cytochrome P450 isoforms and a rat serum esterase that metabolize the pyrethroid insecticides deltamethrin and esfenvalerate. *Drug Metab Dispos* 2007;35:1664–71.
- Gosselin RE. *Clinical toxicology of commercial products*. Baltimore, MD, USA: Williams and Wilkins; 1984.
- Haraguchi K, Koizumi A, Inoue K, Harada KH, Hitomi T, Minata M, et al. Levels and regional trends of persistent organochlorines and polybrominated diphenyl ethers in Asian breast milk demonstrate POPs signatures unique to individual countries. *Environ Int* 2009;35:1072–9.
- Jin Y, Liu J, Wang L, Chen R, Zhou C, Yang Y, et al. Permethrin exposure during puberty has the potential to enantioselectively induce reproductive toxicity in mice. *Environ Int* 2011. <http://dx.doi.org/10.1016/j.envint.2011.05.020>.
- LaKind JS, Berlin CM, Sjodin A, Turner W, Wang RY, Needham LL, et al. Do human milk concentrations of persistent organic chemicals really decline during lactation? Chemical concentrations during lactation and milk/serum partitioning. *Environ Health Perspect* 2009;117(10):1625–31.
- Lima EP, Paiva MHS, de Araújo AP, da Silva EVG, da Silva UM, de Oliveira LN, et al. Insecticide resistance in *Aedes aegypti* populations from Ceará, Brazil. *Parasites Vectors* 2011;4:5.
- Liu J, Yang Y, Zhuanga S, Yanga Y, Lic F, Liu W. Enantioselective endocrine-disrupting effects of bifenthrin on hormone synthesis in rat ovarian cells. *Toxicology* 2011;290(1):42–9.
- Ministério da Saúde, Fundação Nacional de Saúde, Programa Nacional de Controle da Dengue (PNCD). Brasília, 2002.
- Nakamura Y, Sugihara K, Sone T, Isobe M, Ohta S, Kitamura S. The in vitro metabolism of a pyrethroid insecticide, permethrin, and its hydrolysis products in rats. *Toxicology* 2007;235:176–84.
- Sereda B, Bouwman H, Kylin H. Comparing water, bovine milk, and indoor residual spraying as possible sources of DDT and pyrethroid residues in breast milk. *J Toxicol Environ Health A* 2009;72:842–51.
- Tanabe S, Kunisue T. Persistent organic pollutants in human breast milk from Asian countries. *Environ Pollut* 2007;146:400–13.
- TCD Insecticide Market Trends and potential Water quality Implications. TCD Environmental Report, San Francisco Estuary Project; 2003. p. 105.
- US Environmental Protection Agency. Child-specific exposure factors handbook, 2 and 11. Washington, DC: National Center for Environmental Assessment; 2002. p. 20.
- WHO, FAO. Principles governing consumer safety in relation to pesticide residues; 1962 (Geneva).
- Zehring M, Herrmann A. Analysis of polychlorinated biphenyls, pyrethroid insecticides and fragrances in human milk using a laminar cup liner in the GC injector. *Eur Food Res Technol* 2001;212(2):247–51.
- Zhang SY, Ueyama J, Ito Y, Yanagiba Y, Okamura A, Kamijima M, et al. Permethrin may induce adult male mouse reproductive toxicity due to cis isomer not trans isomer. *Toxicology* 2008;248:136–41.

5.3. Estudi de la toxicitat en cèl·lules hepàtiques.

Com s'ha explicat l'estudi es realitzà en paral·lel en dues línies cel·lulars, la HepG2 i la HepaRG. En elles es va estudiar la toxicitat de 4 piretroides que s'havien trobat en llet materna: la bifentrina, la cihalotrina, la permetrina i la cipermetrina. A la [Taula 5.1](#) es presenten aquests piretroides i se'n destaca l'estructura i el tipus de piretroide que és. Com es pot comprovar a la taula, aquests piretroides permetien fer comparatives respecte toxicologia de piretroides tipus I vs. tipus II, comparant permetrina vs. cipermetrina, les estructures de les quals són idèntiques excepte pel grup ciano característic dels piretroides tipus II; comparatives respecte l'efecte de la part alcohòlica del piretroide, amb l'estudi de la bifentrina vs. la cihalotrina; i comparatives respecte de l'efecte de la part àcida, amb l'estudi de la cipermetrina vs. la cihalotrina.

Taula 5.1: Estructures dels piretroides estudiats en l'estudi toxicològic

| Piretroide | Estructura | Tipus |
|--------------|---|-------|
| Bifentrina |  | I |
| Cihalotrina |  | II |
| Cipermetrina |  | II |
| Permetrina |  | I |

L'estudi per a cadascuna de les dues línies cel·lulars era idèntic, llevat de les necessitats de cultiu pròpies de cada línia. Per aquest estudi es realitzaren diferents proves. Primer s'estudiaren els efectes a diferents concentracions (des de 0,01µM fins a 1mM) de piretroide. Això, en principi creava problemes. Els piretroides són força insolubles en medis aquosos com els medis cel·lulars. Per tal de solubilitzar-los s'afegia al medi un 1% de DMSO. Aquest era suficient per solubilitzar concentracions de fins a 0,15mM, aproximadament. En el cas de concentracions majors el piretroide era insoluble i començava a aparèixer com a precipitat o partícules en suspensió.

En el cas dels humans, tal com en el cas d'altres animals, aquests productes insolubles sovint s'uneixen a proteïnes plasmàtiques per tal de transportar-se per la sang. La proteïna per excel·lència encarregada d'això sol ser l'albumina. Per tant, a més dels estudis de viabilitat cel·lular a diferents concentracions, es va provar de fer-ne més a altes concentracions emprant albumina humana en el medi i, d'aquesta manera comprovar si els piretroides eren més biodisponibles, i potser més tòxics, gràcies a aquesta proteïna.

Tots els estudis es realitzaven a 24h, 48h i 72h d'exposició al piretroide després d'haver adaptat les cèl·lules al medi durant el temps necessari per a cada línia cel·lular.

5.3.1 Planificació de l'estudi

Durant l'estada es van planificar i dur a terme diversos experiments responent als objectius marcats. Aquests experiments havien de ser cuidadosament preparats amb antelació donat que les cèl·lules requerien uns temps concrets d'adaptació al medi previs a les exposicions i als anàlisis.

Ambdues línies cel·lulars requerien tractaments previs diferents ja que les HepG2 es podien fer proliferar en el laboratori i, per tant, necessitaven d'una reproducció prèvia per tal d'assolir la quantitat de cèl·lules viables requerides. Un cop el nombre de cèl·lules era suficient, es duia a terme la sembra en plats amb 96 pous on a cada pou s'hi duia a terme una experiència concreta.

Per contra, les HepaRG no es podien reproduir al laboratori i, per tant, era necessari descongelar-les dels vials a -80°C on es conservaven i sembrar-les als plats destinades a l'adaptació i posterior exposició a l'experiment. Aquests plats, però, requerien un recobriment previ amb col·lagen.

Tot seguit s'inclou un exemple de planificació d'un d'aquests experiments per tal de mostrar la previsió temporal, el cultiu cel·lular, tant per línies HepG2 com per HepaRG. Aquest cas concret era per comprovar l'efecte de l'albumina sobre la toxicitat dels piretroides.

HepG2 and HepaRG exposure to high concentrations of 4 common pyrethroids.

General Objectives

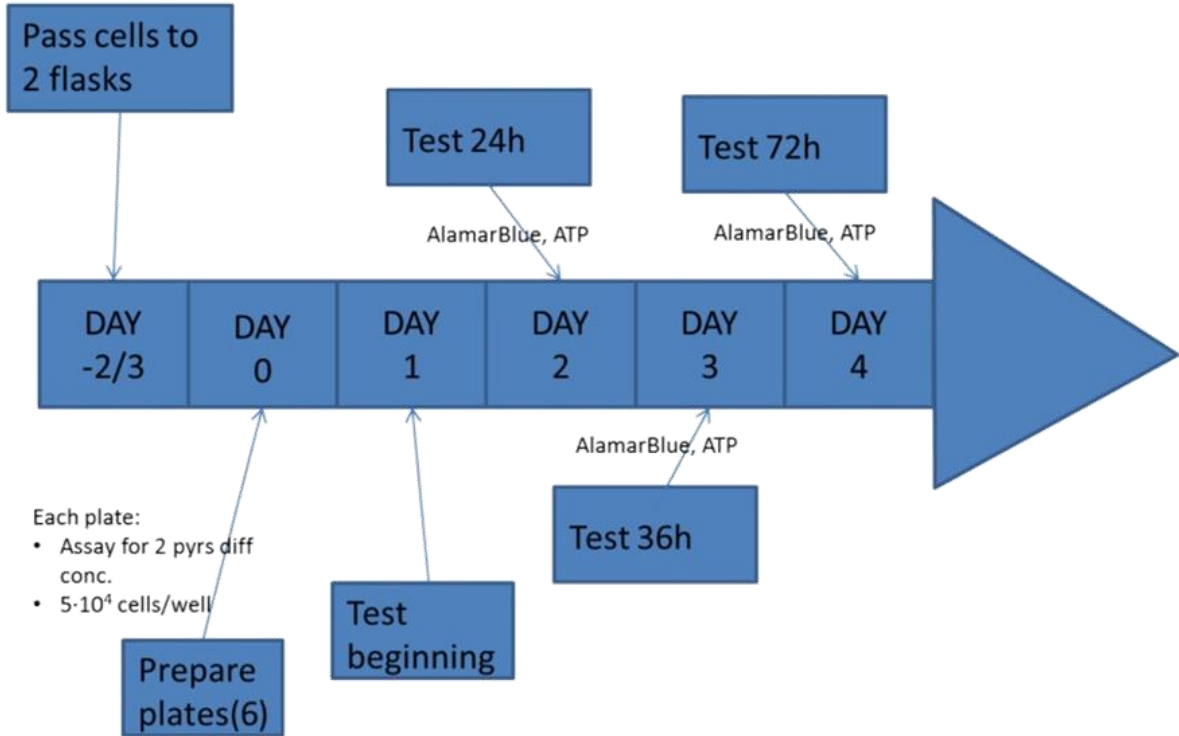
1. Determine EC₅₀ for HepG2 for the 4 selected pyrethroids (Pyr).
2. Determine EC₅₀ for HepaRG for the 4 selected Pyrs.
3. Test the viability of Human Albumin (HA) to solubilise highly hydrophobic compounds.

Specific Objectives

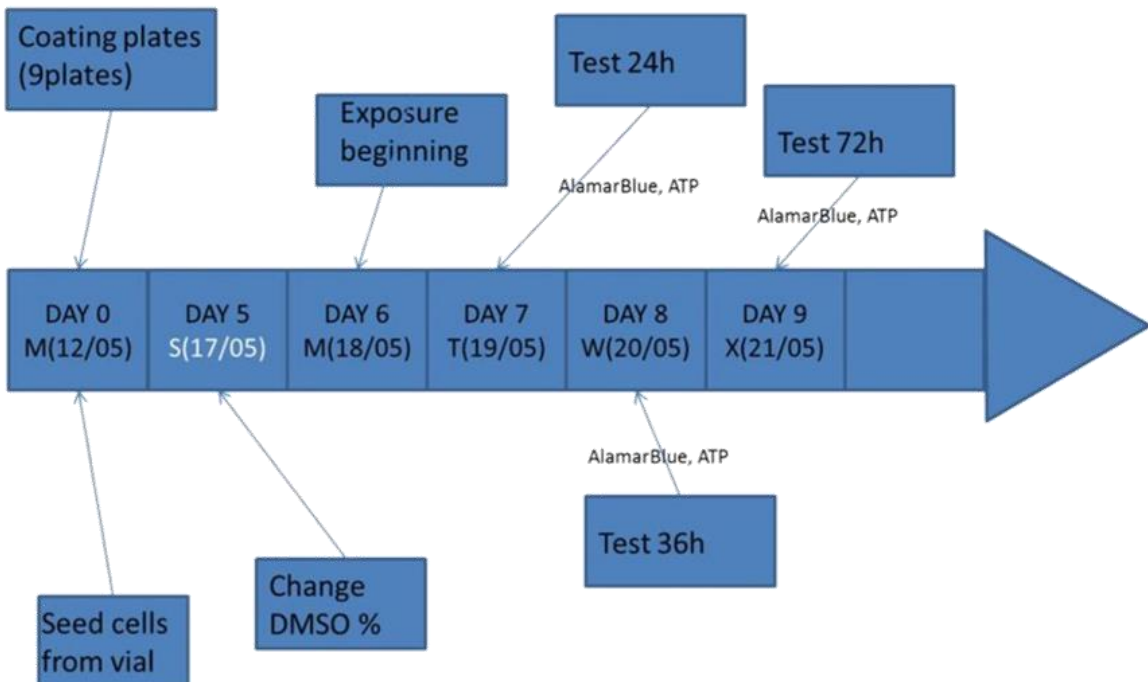
- Test cell viability at different concentrations of Pyrs solved in medium with HA (50 µM, 100 µM, 150 µM, 500 µM, 1000 µM).
- Test cell viability at different times of exposure to Pyrs (24h, 48h, 72h).
- ATP determination at different exposure concentrations.

WORKING PLAN SCHEME

HepG2 line:



HepaRG line:



Cell viability and ATP response.

6 plates for each cell line as follows (3 with PYR 1 and 2, and 3 with PYR 3 and 4):

| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
|---|---|---------------|-------------|------------|-------------|--------------|-------------------|--------------------|--------------------|--------------------|---------------------|----|
| A | W | W | W | W | W | W | W | W | W | W | W | W |
| B | W | Cntrl DMSO | Cntrl | PYRA 50 | PYRA 100 | PYRA 1000 | PYRA +HA 50 | PYRA +HA 100 | PYRA +HA 250 | PYRA +HA 500 | PYRA +HA 1000 | W |
| C | W | Cntrl DMSO | Cntrl | PYRA 50 | PYRA 100 | PYRA 1000 | PYRA +HA 50 | PYRA +HA 100 | PYRA +HA 250 | PYRA +HA 500 | PYRA +HA 1000 | W |
| D | W | Cntrl DMSO | Cntrl | PYRA 50 | PYRA 100 | PYRA 1000 | PYRA +HA 50 | PYRA +HA 100 | PYRA +HA 250 | PYRA +HA 500 | PYRA +HA 1000 | W |
| E | W | Cntrl kill | Cntrl HA | PYRB 50 | PYRB 100 | PYRB 1000 | PYRB +HA 50 | PYRB +HA 100 | PYRB +HA 250 | PYRB +HA 500 | PYRB +HA 1000 | W |
| F | W | Cntrl kill | Cntrl HA | PYRB 50 | PYRB 100 | PYRB 1000 | PYRB +HA 50 | PYRB +HA 100 | PYRB +HA 250 | PYRB +HA 500 | PYRB +HA 1000 | W |
| G | W | Cntrl kill | Cntrl HA | PYRB 50 | PYRB 100 | PYRB 1000 | PYRB +HA 50 | PYRB +HA 100 | PYRB +HA 250 | PYRB +HA 500 | PYRB +HA 1000 | W |
| H | W | W | W | W | W | W | W | W | W | W | W | W |

Cntrl: Cells without PYRs.

Cntrl DMSO: Cells + 1%DMSO but no PYRs.

Cntrl kill: cells with a detergent to kill them.

Cntrl HA: Cells + 1%DMSO and HAbut no PYRs.

PYRA: Cells exposed to X μ M conc of PYR 1 or 3.

PYRB: Cells exposed to X μ M conc of PYR 2 or 4.

PYRA+HA: Cells exposed to X μ M conc of PYR 1 or 3, with HA in the media.

PYRB+HA: Cells exposed to X μ M conc of PYR 2 or 4, with HA in the media.

W: Water

PYR 1: Bifenthrin; PYR2: Cyhalothrin; PYR3: Cypermethrin; PYR4: Permethrin.

1 Plates as follows

| | | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---------------------|-----------------------|-----------------------|-------------------------|---------------------|-----------------------|-----------------------|-------------------------|----|----|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
| A | W | W | W | W | W | W | W | W | W | W | W | W |
| B | W | W | Cntrl PYR1 50 | Cntrl PYR1 1000 | Cntrl PYR1 HA50 | Cntrl PYR1 HA1000 | Cntrl PYR3 50 | Cntrl PYR3 1000 | Cntrl PYR3 HA50 | Cntrl PYR3 HA1000 | W | W |
| C | W | W | Cntrl PYR1 50 | Cntrl PYR1 1000 | Cntrl PYR1 HA50 | Cntrl PYR1 HA1000 | Cntrl PYR3 50 | Cntrl PYR3 1000 | Cntrl PYR3 HA50 | Cntrl PYR3 HA1000 | W | W |
| D | W | W | Cntrl PYR1 50 | Cntrl PYR1 1000 | Cntrl PYR1 HA50 | Cntrl PYR1 HA1000 | Cntrl PYR3 50 | Cntrl PYR3 1000 | Cntrl PYR3 HA50 | Cntrl PYR3 HA1000 | W | W |
| E | W | W | Cntrl PYR2 50 | Cntrl PYR2 1000 | Cntrl PYR2 HA50 | Cntrl PYR2 HA1000 | Cntrl PYR4 50 | Cntrl PYR4 1000 | Cntrl PYR4 HA50 | Cntrl PYR4 HA1000 | W | W |
| F | W | W | Cntrl PYR2 50 | Cntrl PYR2 1000 | Cntrl PYR2 HA50 | Cntrl PYR2 HA1000 | Cntrl PYR4 50 | Cntrl PYR4 1000 | Cntrl PYR4 HA50 | Cntrl PYR4 HA1000 | W | W |
| G | W | W | Cntrl PYR2 50 | Cntrl PYR2 1000 | Cntrl PYR2 HA50 | Cntrl PYR2 HA1000 | Cntrl PYR4 50 | Cntrl PYR4 1000 | Cntrl PYR4 HA50 | Cntrl PYR4 HA1000 | W | W |
| H | W | W | W | W | W | W | W | W | W | W | W | W |

Cntrl PYRX: Media+PYRX but no cells.

Cntrl PYRX HA: Media+HA+PYRX but no cells.

W: Water

PYR 1: Bifenthrin; PYR2: Cyhalothrin; PYR3: Cypermethrin; PYR4: Permethrin.

Assays to do with them:

(The media have to be Serum-free).

AlamarBlue + ATP

Do tests after 24h of exposure in one plate, after 48h in other plate and after 72 in the last one.

5.3.2 Mètodes d'assaig i resultats

Els mètodes triats sobre la viabilitat cel·lular van ser dos de complementaris: per una part comprovar l'activitat de l'ATP i per l'altra la quantitat de cèl·lules intactes mitjançant una tinció cel·lular. Ambdós es podien realitzar sobre el mateix suport on es trobaven les cèl·lules de forma correlativa, primer el mètode de tinció i després el de l'ATP. A més, el fet d'emprar dos mètodes, reduïa els potencials errors dels mètodes i verificava els resultats.

La viabilitat mitjançant tinció, tenyeix les membranes cel·lulars trencades mentre que deixa les cèl·lules intactes sense tenyir. Això és així perquè el reactiu anomenat AlamarBlue, CellTiter-Blue® conté una molècula, resazurin, que tenyeix les membranes cel·lulars. En cèl·lules viables, però, aquesta és reduïda pel metabolisme cel·lular a resofurin, que és un compost fluorescent. En canvi, les cèl·lules no viables perden aquesta capacitat metabòlica ràpidament. El resultat és que amb la tinció i la posterior lectura fluorimètrica obteníem un valor proporcional a la quantitat de cèl·lules viables.

El mètode d'activitat d'ATP, emprava el reactiu anomenat comercialment CellTiter-Glo®. El reactiu conté un enzim que provoca la lisis cel·lular i un altre que, gràcies a l'acció del ATP és luminescent. Com més activitat d'ATP més luminiscència de forma proporcional. Donat que l'activitat de l'ATP també està relacionada amb la quantitat de cèl·lules viables, aquest mètode determina la viabilitat cel·lular a través d'una simple addició d'una mescla preparada de reactius i una lectura de luminiscència. Aquesta tècnica és destructiva, raó per la qual s'emprava en segon lloc.

Per últim, un cop obtinguts els assajos de viabilitat, el sobrenedant es congelava a -20°C i es va transportat al laboratori habitual de Barcelona per a l'anàlisi de piretroides quantitativa i enantiòmerica de tots els sobrenadants. Així es podia determinar la quantitat no metabolitzada i esbrinar si hi havia hagut enantioselectivitat.

Cap al final de l'estada, es va comprovar que hi havia una contaminació bacteriana en totes les línies cel·lulars del laboratori. Aquest fet invalidava tots els resultats obtinguts i els anàlisis realitzats.

5.4. Discussió de resultats.

Com es pot comprovar a la publicació, els piretroides es varen trobar a totes les llets maternes analitzades, independentment del país d'origen. En estudis anteriors ja s'havien trobat nivells de piretroides en llet humana tot i que en quantitats molt superiors en població

exposada (Bouwman et al., 2006; Maria Luisa Feo et al., 2012; Sereda et al., 2009). Per primer cop es va realitzar un estudi internacional i es va comprovar la presència de piretroides en aquesta matriu humana. Els nivells de poblacions no exposades a tots tres països resultaren baixos (el màxim assolit van ser $24,2 \text{ ng g}^{-1} \text{ lw}$). Aquest resultat, es contradiu amb un estudi posterior realitzat a Estats Units, en el qual es varen analitzar 10 mostres de llet materna i en cap es va trobar piretroides (X. Chen et al., 2014). Tot i així, els límits de detecció d'aquest estudi eren d'entre $0,03 \text{ ng ml}^{-1}$ i $1,67 \text{ ng ml}^{-1}$ en llet de vaca fresca, el què, suposant que la llet de vaca conté un 3% aproximadament de greix i la densitat és 1 g ml^{-1} , seria un LOD de $0,01 \text{ ng g}^{-1}$ i $0,55 \text{ ng g}^{-1} \text{ lw}$. Per a molts piretroides aquests LODs són molt elevats així doncs, és possible que en part aquest resultat negatiu sigui donat per manca de sensibilitat analítica.

Per comprovar que els nivells en població exposada eren superiors als de la població general, es van analitzar unes mostres de llet materna del Brasil d'anys anteriors, durant els quals el dengue havia brotat amb força i les autoritats havien posat en marxa plans de control del mosquit vector de la malaltia. Aquests plans de control incloïen l'ús dels piretroides i la població, doncs, es va exposar a nivells superiors dels habituals. Els resultats demostraren que progressivament els nivells de piretroides en llet humana decreixien al allunyar-se temporalment de l'època d'exposició.

L'estudi també va voler comprovar la relació del contingut de piretroides en la llet materna i el nombre de fills. Donat que es disposava de mostres de mares amb gran quantitat de fills, es va poder descriure una tendència decreixent en el contingut de piretroides segons si les mares eren primíparas o múltipares. Tot i que aquest resultat era només una primera aproximació, obre la possibilitat a un estudi més a fons sobre aquest fet amb mostres millor enfocats a aquest estudi.

Referent a l'enantioselectivitat, només les mostres de Barcelona es van analitzar amb aquest mètode. Comparant amb productes comercials, semblava que els piretroides tipus II acumulaven en major proporció l'enantiòmer (1S-3S- α R). Aquest comportament molt similar al ja descrit per a la biota salvatge, ja discutida prèviament. Respecte dels piretroides tipus I els comportaments enantioselectius eren diferents per a cadascun: la bifentrina no en presentava, la permetrina s'acumulava en major proporció l'enantiòmer (1R-3R) i la tetrametrina el conegut com a d-tetrametrina (el més actiu comercialment).

Tot i això, d'aquest estudi enantiomèric, no resultava clar que es bioacumulesin els piretroides de forma enantioselectiva ja que no es coneixia la font real d'exposició als

piretroides per poder comparar els EF de la font d'exposició amb els EF trobats a la llet materna.

Amb tot, es comprovà que, excepte pel cas de la tetrametrina, per la resta de piretroides semblaven bioacumular-se més els isòmers *cis*. Cal recordar que tant els estudis *in vitro* com *in vivo* en diferents espècies animals, assenyalen aquests isòmers com els menys metabolitzables i, potser per això, els més tòxics (Diao et al., 2011; Y. Jin et al., 2016; Khazri et al., 2016; R. Lavado et al., 2014; L. L. Li et al., 2017; Tange et al., 2014; S.-Y. Zhang et al., 2008). Com s'ha comprovat en el capítol anterior, en aus, peixos i fins i tot uns mamífers com els dofins es trobava el mateix patró de isomero-selectivitat en la bioacumulació.

De l'estudi de toxicitat, tot i que no es van poder extreure resultats viables, romangué com un possible treball futur que seria molt interessant poder dur a terme.

Capítol 6

Conclusions

6.1. General conclusions.

After all the studies presented and discussed in this Thesis, here I expose the general conclusions.

About analytical environmental chemistry:

- A novel methodology for pyrethroid determination was successfully optimized. It was quick, easy, robust and reproducible for the analysis of 19 different pyrethroids.

This new method was tested for different matrices such as eggs, milk and fish. It was increased the number of analytes from 12 to 19 and included another environmental pollutant, the chlorpyrifos, an organophosphate pesticide. LODs ranged from 0.006 to 21.4 ng g⁻¹ ww, which were low enough to analyse environmental levels of pyrethroids.

- A new enantio-selective instrumental method was developed. This GC-MS-MS methodology was able to discriminate all *cis*-enantiomers of bifenthrin, cyhalothrin, cyfluthrin, cypermethrin, permethrin. It allowed distinguishing all *cis* from *trans* isomers. Finally, for the first time, an enantio-selective method was able to differentiate all enantiomers of one pyrethroid, it was the case of tetramethrin.

The methodology was tested commercial insecticides, bird eggs, river fish and human breast milk samples. Both methodologies were adapted to each new matrix. These methodologies demonstrated to be very robust for all biota samples. Adjusting the sample amount was usually enough to use them. Recoveries were always higher than 55% in all cases, which is accepted for isotopic dilution quantification methodologies.

About environmental presence of pyrethroids:

- Pyrethroids were positively determined in most of samples. They were found in both aquatic (100% of positives) and terrestrial samples (93% of positives). Only Antarctic biota was exempt of pyrethroid levels in their analysed samples.

It was clear that all ecosystems could potentially accumulate pyrethroids insecticides if they were exposed to. Biocenoses of aquatic biotopes could be good indicators of levels of pyrethroids in these ecosystems. Other matrices, such as sediment or water, presented levels of pyrethroids depending on the time passed from last exposure. However biota seemed accumulate these contaminants for longer periods.

It seemed that age of individual could be related with total pyrethroid body load, at least in dolphins. However more studies are needed to corroborate these first results. These other studies, should also consider different organisms in order to explain a general behaviour.

- Given that Antarctic biota did not present any pyrethroid residue at detectable levels, it was assumed that these animals were not exposed to pyrethroids, so these pollutants were not transported long distances.

Pyrethroids are biodegradable and metabolizable compounds. This fact would explain that they were not found in samples from Antarctic and their inability to be transported long distances.

- Wild fauna was exposed to pyrethroids, potentially by diet habits.

Even biota from Natural Reserves was exposed to these pollutants. Proximity to human sources of pollution such as agrarian fields and dump sites could explain levels of pyrethroids in wild bird eggs up to 198 ng g⁻¹ lw. Though, since aquatic birds egg such as seagulls eggs, presented even higher levels (up to 324 ng g⁻¹ lw), other factors will also be considered. Besides, biota from aquatic medium was exposed to pyrethroids as well. Coastal dolphins presented high levels of pyrethroids, up to 2306 ng g⁻¹ lw. In rivers, fishes presented pyrethroids levels ranged from 12 to 4938 ng g⁻¹ lw.

Maternal transfer would be the main factor to explain levels of pyrethroids in calves of mammals and wild bird eggs.

- Pyrethroid accumulation was different for each species from the same sample area. In samples of fishes from the same sample point of the river, different pyrethroids were found in different proportions. These could be because of different diet habits or different metabolism.

In all studies of these thesis pyrethroid accumulations seemed to be related to exposure through diet.

- When pyrethroid vs. trophic levels was checked, no correlation seemed to be described. This fact could imply that pyrethroids are not biomagnifiable pollutants.

Even though main pyrethroid exposure would be diet, their metabolization make easier to eliminate them from organism, so no biomagnification could be described.

However, in our studies on this topic were too many uncertain factors that make impossible to describe biomagnification or assure the contrary.

- The most present pyrethroids depended on the area sampled. However, permethrin and cypermethrin usually were the more common pollutants followed, depending on the sample, by tetramethrin, cyhalothrin or even bifenthrin.

Some differences in pyrethroid distribution were described comparing samples from different geographical areas. For example, in Brazilian dolphins permethrin and cypermethrin were the more present pyrethroid but for Spanish dolphins they were permethrin and tetramethrin.

- Bioaccumulation of pyrethroids was mainly isomer-selective. Most of pyrethroids were accumulated with a preference for *cis* isomer. Only tetramethrin was preferentially by *trans* isomer, even when it may be due to the commercial mixtures.

trans-Tetramethrin is the most active isomer of this pyrethroid. Usually, commercial tetramethrin mixtures enhance this isomer in order to produce a more powerful insecticide. Despite that, other pyrethroids such as bifenthrin, cyfluthrin, cypermethrin, cyhalothrin and permethrin presented more toxic effect with the *cis* isomer.

- Enantio-selective accumulation was described for second *cis* enantiomeric pair in Type II pyrethroids. (1*S*-3*S*- α R) seemed to be the isomer more accumulated in most species.

Type I pyrethroids were mainly accumulated in a racemic mixture. Type II pyrethroids accumulated in a racemic mixture the first *cis* enantiomeric pair, as well. These results were just general trend but not always followed in all samples. They could depend on the sampled area and the species.

- Studies of pyrethroid in mammalian tissues were carried on tacking dolphins as example. Lower levels in brain showed the efficiency of blood-brain barrier. Blubber was the preferred tissue to pyrethroid accumulation.

It was estimated that near 80% of pyrethroids were accumulated in blubber and in muscle around the 18%. However, in lean tissues such as muscle, levels of pyrethroids were lower than in fatty ones.

- For analysing purposes, liver was the better organ to sample, even though, in live specimens superficial blubber from biopsy could be used.

About human exposure:

- General population is exposed to pyrethroids. In our non-exposed human studies, human breast milk presented levels of pyrethroids at levels up to $24.2 \text{ ng g}^{-1} \text{ lw}$.

All breast milk samples were positive to pyrethroids. Cypermethrin, cyhalothrin, fenvalerate and permethrin were always present in all samples from Brazil, Colombia and Barcelona (Spain). Levels were lower than those of exposed people reported by other authors. Breast milk from exposed mothers reached levels of pyrethroids of $128 \text{ ng g}^{-1} \text{ lw}$.

- Similar isomer and enantiomer-selective accumulation was described for wild biota and humans.
- Levels of pyrethroids seemed to be related to number of children. Another important factor to take into account would be how long was from exposure.

Breast milk samples taken in periods close to big exposures to pyrethroids presented higher levels of these insecticides (up to $128 \text{ ng g}^{-1} \text{ lw}$) while some years after samples collected showed lower levels ($15.2 \text{ ng g}^{-1} \text{ lw}$). These could mean that pyrethroid metabolism is slow but constant.

- The risk evaluation of breastfed babies who consumed the breast milk samples analysed demonstrated that levels consumed would be lower than ADI, even though, some EDI from exposed population could be very close ($\text{EDI}_{\text{cypermethrin}} = 48.8 \mu\text{g (kg bw)}^{-1} \text{ day}^{-1}$, $\text{ADI}_{\text{cypermethrin}} = 50 \mu\text{g (kg bw)}^{-1} \text{ day}^{-1}$).

Taking into account that ADI is a safe value calculated for adults, studies about them in babies would be considered. Besides, these samples presented more than one pyrethroid but there are no studies about toxicology of exposure to more than one pyrethroid at a time. These results showed that children of exposed population could be in risk of intoxications of pyrethroids.

6.2. Future studies.

The present thesis work points out that there still is a gap in pyrethroid toxicology knowledge. Besides, more information about exposure and bioaccumulation is needed. Finally, implications of all this in environment and chronic toxicology in humans requires to be further studied.

Biomagnification of pyrethroids need to be confirmed or refuted by studies in a closed controlled trophic chain. Further, this study let understand all these factors determine this biomagnification, in case it was, and how exposure through diet explain pyrethroid accumulation.

Regarding human exposure to pyrethroids, recalculations of ADI values are essential. These new ADI values should take into account all wild edible fauna, such as fishes, and toddler adjustments given that their major risk. Our study with Brazilian dolphins demonstrated that levels of pyrethroids in calves could be higher than adult ones. It is easy to assume that in humans could be similar. In fact, in Brazilian breastfed babies, values of EDI were too close to ADI for adults. These exposure topics need to be further studied and solved.

Inter-compound studies should be remake in order to describe the toxicological effect of this “cocktail” of pyrethroid that we found in organisms. Repeat all these test in hepatic cells could give a first general idea of these unknown effects.

Capítol 7

Bibliografia

- Abass, K., Lämsä, V., Reponen, P., Küblbeck, J., Honkakoski, P., Mattila, S., Pelkonen, O., & Hakkola, J. (2012). Characterization of human cytochrome P450 induction by pesticides. *Toxicology*, *294*(1), 17-26. doi: <https://doi.org/10.1016/j.tox.2012.01.010>
- Aguilar, A. (1985). Compartmentation and reliability of sampling procedures in organochlorine pollution surveys of cetaceans. [Review]. *Residue Reviews*, *95*, 91-114.
- Alonso, M. B., Feo, M. L., Corcellas, C., Gago-Ferrero, P., Bertozzi, C. P., Marigo, J., Flach, L., Meirelles, A. C. O., Carvalho, V. L., Azevedo, A. F., Torres, J. P. M., Lailson-Brito, J., Malm, O., Diaz-Cruz, M. S., Eljarrat, E., & Barceló, D. (2015). Toxic heritage: Maternal transfer of pyrethroid insecticides and sunscreen agents in dolphins from Brazil. [Article]. *Environmental Pollution*, *207*, 391-402. doi: [10.1016/j.envpol.2015.09.039](https://doi.org/10.1016/j.envpol.2015.09.039)
- Alonso, M. B., Feo, M. L., Corcellas, C., Gago-Ferrero, P., Bertozzi, C. P., Marigo, J., Flach, L., Meirelles, A. C. O., Carvalho, V. L., Azevedo, A. F., Torres, J. P. M., Lailson-Brito, J., Malm, O., Eljarrat, E., Diaz-Cruz, M. S., & Barceló, D. (2015). A poisonous cocktail for my baby: Maternal transfer of pyrethroid insecticides and UV filters in dolphins from Brazil – Part 1. *Environmental Pollution*, *207*, 391-402.
- 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., Torres, J. P. M., Lailson-Brito, J., Malm, O., Eljarrat, E., & Barcelo, D. (2012). Pyrethroids: A new threat to marine mammals? *Environment International*, *47*, 99-106. doi: [10.1016/j.envint.2012.06.010](https://doi.org/10.1016/j.envint.2012.06.010)
- Amaraneni, M., Sharma, A., Pang, J., Muralidhara, S., Cummings, B. S., White, C. A., Bruckner, J. V., & Zastre, J. (2016). Plasma protein binding limits the blood brain barrier permeation of the pyrethroid insecticide, deltamethrin. *Toxicology Letters*, *250–251*, 21-28. doi: <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2016.03.006>
- Amin, K. A., & Hashem, K. S. (2012). Deltamethrin-induced oxidative stress and biochemical changes in tissues and blood of catfish (*Clarias gariepinus*): antioxidant defense and role of alpha-tocopherol. *Bmc Veterinary Research*, *8*. doi: [10.1186/1746-6148-8-45](https://doi.org/10.1186/1746-6148-8-45)
- An, Y. R., Kim, S. J., Park, H. W., Oh, M. J., Kim, Y. J., Ryu, J. C., & Hwang, S. Y. (2010). Genomic comparison of insecticides and herbicide in human hepatoma (HepG2) cell line. [Article]. *Molecular & Cellular Toxicology*, *6*(4), 381-386. doi: [10.1007/s13273-010-0050-1](https://doi.org/10.1007/s13273-010-0050-1)
- Andersson, T. B., Kanebratt, K. P., & Kenna, J. G. (2012). The HepaRG cell line: a unique in vitro tool for understanding drug metabolism and toxicology in human. *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology*, *8*(7), 909-920. doi: [10.1517/17425255.2012.685159](https://doi.org/10.1517/17425255.2012.685159)
- Antherieu, S., Chesne, C., Li, R., Guguen-Guillouzo, C., & Guillouzo, A. (2012). Optimization of the HepaRG cell model for drug metabolism and toxicity studies. *Toxicology in Vitro*, *26*(8), 1278-1285. doi: [10.1016/j.tiv.2012.05.008](https://doi.org/10.1016/j.tiv.2012.05.008)
- Aouey, B., Derbali, M., Chtourou, Y., Bouchard, M., Khabir, A., & Fetoui, H. (2017). Pyrethroid insecticide lambda-cyhalothrin and its metabolites induce liver injury through the activation of oxidative stress and proinflammatory gene expression in rats following acute and subchronic exposure. [Article]. *Environmental Science and Pollution Research*, *24*(6), 5841-5856. doi: [10.1007/s11356-016-8323-4](https://doi.org/10.1007/s11356-016-8323-4)
- Aznar-Aleman, Ò., Giménez, J., de Stephanis, R., Eljarrat, E., & Barceló, D. (2017). Insecticide pyrethroids in liver of striped dolphin from the Mediterranean Sea. [Article]. *Environmental Pollution*, *225*, 346-353. doi: [10.1016/j.envpol.2017.02.060](https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.02.060)
- Balaji, A. P. B., Sastry, T. P., Manigandan, S., Mukherjee, A., & Chandrasekaran, N. (2017). Environmental benignity of a pesticide in soft colloidal hydrodispersive nanometric form with improved toxic precision towards the target organisms than non-target organisms. [Article]. *Science of the Total Environment*, *579*, 190-201. doi: [10.1016/j.scitotenv.2016.10.240](https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.10.240)
- Banerjee, K., Patil, S. H., Dasgupta, S., Oulkar, D. P., Patil, S. B., Savant, R., & Adsule, P. G. (2008). Optimization of separation and detection conditions for the multiresidue analysis of pesticides in grapes by comprehensive two-dimensional gas

- chromatography-time-of-flight mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1190(1-2), 350-357. doi: 10.1016/j.chroma.2008.03.017
- Barón, E., Giménez, J., Verborgh, P., Gauffier, P., De Stephanis, R., Eljarrat, E., & Barceló, D. (2015). Bioaccumulation and biomagnification of classical flame retardants, related halogenated natural compounds and alternative flame retardants in three delphinids from Southern European waters. [Article]. *Environmental Pollution*, 203, 107-115. doi: 10.1016/j.envpol.2015.03.041
- Barr, D. B., Olsson, A. O., Wong, L.-Y., Udunka, S., Baker, S. E., Whitehead, R. D., Jr., Magsumbol, M. S., Williams, B. L., & Needham, L. L. (2010). Urinary Concentrations of Metabolites of Pyrethroid Insecticides in the General US Population: National Health and Nutrition Examination Survey 1999-2002. *Environmental Health Perspectives*, 118(6), 742-748. doi: 10.1289/ehp.0901275
- Bassil, K. L., Vakil, C., Sanborn, M., Cole, D. C., Kaur, J. S., & Kerr, K. J. (2007). Cancer health effects of pesticides: systematic review. *Canadian family physician Medecin de famille canadien*, 53(10), 1704-1711.
- Bearzi, G., Reeves, R. R., Notarbartolo-Di-Sciara, G., Politi, E., Canadas, A., Frantzis, A., & Mussi, B. (2003). Ecology, status and conservation of short-beaked common dolphins *Delphinus delphis* in the Mediterranean Sea. [Article]. *Mammal Review*, 33(3-4), 224-252. doi: 10.1046/j.1365-2907.2003.00032.x
- Blankson, G. K., Osei-Fosu, P., Adeendze, E. A., & Ashie, D. (2016). Contamination levels of organophosphorus and synthetic pyrethroid pesticides in vegetables marketed in Accra, Ghana. [Article]. *Food Control*, 68, 174-180. doi: 10.1016/j.foodcont.2016.03.045
- Bondarenko, S., Spurlock, F., & Gan, J. (2007). Analysis of pyrethroids in sediment pore water by solid-phase microextraction. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 26(12), 2587-2593. doi: 10.1897/07-286.1
- Borrell, A., & Aguilar, A. (2005). Differences in DDT and PCB residues between common and striped dolphins from the southwestern Mediterranean. [Article]. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 48(4), 501-508. doi: 10.1007/s00244-004-0039-7
- Bouwman, H., Sereda, B., & Meinhardt, H. M. (2006). Simultaneous presence of DDT and pyrethroid residues in human breast milk from a malaria endemic area in South Africa. *Environmental Pollution*, 144(3), 902-917. doi: 10.1016/j.envpol.2006.02.002
- Bro, E., Devillers, J., Millot, F., & Decors, A. (2016). Residues of plant protection products in grey partridge eggs in French cereal ecosystems. [Article]. *Environmental Science and Pollution Research*, 23(10), 9559-9573. doi: 10.1007/s11356-016-6093-7
- Bruckner, J. (2014). Role of the blood-brain barrier in limiting CNS uptake of pyrethroid insecticides: findings with hCMEC cells as a proxy (1064.14). *The FASEB Journal*, 28(1 Supplement).
- Bu, Q., Shi, X., Yu, G., Huang, J., & Wang, B. (2016). Assessing the persistence of pharmaceuticals in the aquatic environment: Challenges and needs. *Emerging Contaminants*, 2(3), 145-147. doi: https://doi.org/10.1016/j.emcon.2016.05.003
- Cantalamesa, F. (1993). Acute toxicity of two pyrethroids, permethrin and cypermethrin, in neonatal and adult rats. *Archives of Toxicology*, 67, 510-513.
- Caron-Beaudoin, E., Gentes, M. L., Patenaude-Monette, M., Helie, J. F., Giroux, J. F., & Verreault, J. (2013). Combined usage of stable isotopes and GPS-based telemetry to understand the feeding ecology of an omnivorous bird, the Ring-billed Gull (*Larus delawarensis*). *Canadian Journal of Zoology-Revue Canadienne De Zoologie*, 91(10), 689-697. doi: 10.1139/cjz-2013-0008
- Casas, V., Llompart, M., Garcia-Jares, C., Cela, R., & Dagnac, T. (2006). Multivariate optimization of the factors influencing the solid-phase microextraction of pyrethroid

- pesticides in water. *Journal of Chromatography A*, 1124(1-2), 148-156. doi: 10.1016/j.chroma.2006.06.034
- CDPR. (2012). *Summary of Pesticide Use Report Data*. Sacramento, CA, USA: California Department of Pesticide Regulation.
- Cinzia, N., Manuel, C., Donatella, F., Rosita, G., Antonio, D. S., Cerasa, L. S., Isabel, S., Valentina, D., & Roberto, C. (2013). Effects of early life permethrin exposure on spatial working memory and on monoamine levels in different brain areas of pre-senescent rats. *Toxicology*, 303(1), 162-168. doi: 10.1016/j.tox.2012.09.016
- Class, T. J. (1991). Determination of pyrethroids and their degradation products in indoor air and on surfaces by HRGC-ECD and HRGC-MS(NCI). *Journal of High Resolution Chromatography*, 14(7), 446-450. doi: 10.1002/jhrc.1240140705
- Colabuono, F. I., Barquete, V., Taniguchi, S., Ryan, P. G., & Montone, R. C. (2014). Stable isotopes of carbon and nitrogen in the study of organochlorine contaminants in albatrosses and petrels. *Marine Pollution Bulletin*, 83(1), 241-247. doi: 10.1016/j.marpolbul.2014.03.046
- Cole, S., Codling, I. D., Parr, W., & Zabel, T. (1999). *Guidelines for managing water quality impacts within UK European marine sites*. Swindon: English Nature Retrieved from http://www.ukmarinesac.org.uk/publications-launch-pdf.php?file=water_quality&filesize=2292.
- Coleman, H. M., Trinh, T., Le-Minh, N., Klein, M., Roser, D. J., Tucker, R. W., Stuetz, R. M., Peters, G., & Khan, S. J. (2013). Occurrence of ectoparasitocides in Australian beef cattle feedlot wastes. *Environmental Pollution*, 174, 265-272.
- Corcellas, C., Andreu, A., Sergio, F., Hiraldo, F., Eljarrat, E., & Barceló, D. (2016). Pyrethroids insecticides in wild bird eggs from a World Heritage Listed Park: A case study in Doñana National Park (Spain). *Environment International*, Submitted.
- Corcellas, C., Eljarrat, E., & Barceló, D. (2015a). Enantiomeric-selective determination of pyrethroids: application to human samples. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*(407), 779-786. doi: 10.1007/s00216-014-7905-6
- Corcellas, C., Eljarrat, E., & Barceló, D. (2015b). First report of pyrethroid bioaccumulation in wild river fish: A case study in Iberian river basins (Spain). *Environment International*, 75, 110-116.
- Corcellas, C., Feo, M. L., Paulo Torres, J., Malm, O., Ocampo-Duque, W., Eljarrat, E., & Barcelo, D. (2012). Pyrethroids in human breast milk: Occurrence and nursing daily intake estimation. *Environment International*, 47, 17-22. doi: 10.1016/j.envint.2012.05.007
- Corrion, M. L., Ostrea, E. M., Bielawski, D. M., Posecion, N. C., & Seagraves, J. J. (2005). Detection of prenatal exposure to several classes of environmental toxicants and their metabolites by gas chromatography-mass spectrometry in maternal and umbilical cord blood. *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 822(1-2), 221-229. doi: 10.1016/j.jchromb.2005.06.007
- Cox, C. (1996). Masculinity at risk. *JOURNAL OF PESTICIDE REFORM*, 16(2).
- Crow, J. A., Borazjani, A., Potter, P. M., & Ross, M. K. (2007). Hydrolysis of pyrethroids by human and rat tissues: Examination of intestinal, liver and serum carboxylesterases. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 221(1), 1-12. doi: 10.1016/j.taap.2007.03.002
- Cycoń, M., & Piotrowska-Seget, Z. (2016). Pyrethroid-Degrading Microorganisms and Their Potential for the Bioremediation of Contaminated Soils: A Review. [Review]. *Frontiers in Microbiology*, 7(1463). doi: 10.3389/fmicb.2016.01463
- Channa, K. R., Roellin, H. B., Wilson, K. S., Nost, T. H., Odland, J. O., Naik, I., & Sandanger, T. M. (2012). Regional variation in pesticide concentrations in plasma of delivering women residing in rural Indian Ocean coastal regions of South Africa. *Journal of Environmental Monitoring*, 14(11), 2952-2960. doi: 10.1039/c2em30264k
- Chatterjee, N. S., Utture, S., Banerjee, K., Ahammed Shabeer, T. P., Kamble, N., Mathew, S., & Ashok Kumar, K. (2016). Multiresidue analysis of multiclass pesticides and

- polyaromatic hydrocarbons in fatty fish by gas chromatography tandem mass spectrometry and evaluation of matrix effect. *Food Chemistry*(196), 1-8.
- Chedik, L., Bruyere, A., Le Vee, M., Stieger, B., Denizot, C., Parmentier, Y., Potin, S., & Fardel, O. (2017). Inhibition of Human Drug Transporter Activities by the Pyrethroid Pesticides Allethrin and Tetramethrin. [Article]. *Plos One*, 12(1). doi: 10.1371/journal.pone.0169480
- Chen, L. X., Xu, S. F., & Li, J. H. (2011). Recent advances in molecular imprinting technology: Current status, challenges and highlighted applications. *Chemical Society Reviews*, 40, 2922-2942.
- Chen, X., Panuwet, P., Hunter, R. E., Riederer, A. M., Bernoudy, G. C., Barr, D. B., & Ryan, P. B. (2014). Method for the quantification of current use and persistent pesticides in cow milk, human milk and baby formula using gas chromatography tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*, 970, 121-130. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2014.08.018>
- Choudhury, B. H., Das, B. K., & Baruah, A. A. L. H. (2013). Monitoring of Pesticide Residues in Market Basket Vegetables of Jorhat District of Assam, India. *International Journal of Advancements in Research & Technology*, 2(11).
- Chung, S. C., & Lam, C. H. (2012). Development and validation of a method for determination of residues of 15 pyrethroids and two metabolites of dithiocarbamates in foods by ultra-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 403(3), 885-896.
- Dallegrave, A., Pizzolato, T. M., Barreto, F., Eljarrat, E., & Barcelo, D. (2016). Methodology for trace analysis of 17 pyrethroids and chlorpyrifos in foodstuff by gas chromatography-tandem mass spectrometry. [Article]. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 408(27), 7689-7697. doi: 10.1007/s00216-016-9865-5
- Das, P. C., Streit, T. M., Cao, Y., Rose, R. L., Cherrington, N., Ross, M. K., Wallace, A. D., & Hodgson, E. (2008). Pyrethroids: Cytotoxicity and Induction of CYP Isoforms in Human Hepatocytes. *Drug Metabolism and Drug Interactions*, 23(3-4), 211-236.
- Daughton, C. G. (2003). Cradle-to-cradle stewardship of drugs for minimizing their environmental disposition while promoting human health. II. Drug disposal, waste reduction, and future directions. *Environmental Health Perspectives*, 111(5), 775-785. doi: 10.1289/ehp.5948
- Daughton, C. G. (2004). Non-regulated water contaminants: emerging research. *Environmental Impact Assessment Review*, 24(7-8), 711-732. doi: 10.1016/j.eiar.2004.06.003
- de Moura, J. F., Hauser-Davis, R. A., Lemos, L., Emin-Lima, R., & Siciliano, S. (2014). Guiana Dolphins (*Sotalia guianensis*) as Marine Ecosystem Sentinels: Ecotoxicology and Emerging Diseases. In D. M. Whitacre (Ed.), *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, Vol 228 (Vol. 228, pp. 1-29). New York: Springer.
- dell'Oro, D., Casamassima, F., Gesualdo, G., Iammarino, M., Mambelli, P., & Nardelli, V. (2014). Determination of pyrethroids in chicken egg samples: development and validation of a confirmatory analytical method by gas chromatography/mass spectrometry. [Article]. *International Journal of Food Science and Technology*, 49(5), 1391-1400. doi: 10.1111/ijfs.12441
- Demoute, J. P. (1989). A brief review of the environmental fate and metabolism of pyrethroids. [Article; Proceedings Paper]. *Pesticide Science*, 27(4), 375-385. doi: 10.1002/ps.2780270406
- Diao, J. L., Xu, P., Liu, D. H., Lu, Y. L., & Zhou, Z. Q. (2011). Enantiomer-specific toxicity and bioaccumulation of alpha-cypermethrin to earthworm *Eisenia fetida*. [Article]. *Journal of hazardous materials*, 192(3), 1072-1078. doi: 10.1016/j.jhazmat.2011.06.010
- dos Reis Souza, M. R., Moreira, C. O., de Lima, T. G., Aquino, A., & Dorea, H. S. (2013). Validation of a matrix solid phase dispersion (MSPD) technique for determination of

- pesticides in lyophilized eggs of the chicken *Gallus gallus domesticus*. *Microchemical Journal*, 110, 395-401. doi: 10.1016/j.microc.2013.05.001
- Council Directive 91/414/EEC of 15 July 1991 concerning the placing of plant protection products on the market, LC Eur 1991/1021 C.F.R. (1991).
- Regulation (EC) No 396/2005 of the European Parliament and of the Council of 23 February 2005 on maximum residue levels of pesticides in or on food and feed of plant and animal origin and amending Council Directive 91/414/EEC (2005).
- EC. (2014). EU Pesticides database. from European Council
- Edwards, R., Millburn, P., & Hutson, D. H. (1987). The toxicity and metabolism of the pyrethroids cis-and trans-cypermethrin in rainbow trout, *Salmo gairdneri*. [Article]. *Xenobiotica*, 17(1), 1175-1193. doi: 10.3109/00498258709047172
- Egea Gonzalez, F. J., Mena Granero, A., Glass, C. R., Garrido Frenich, A., & Martinez Vidal, J. L. (2004). Screening method for pesticides in air by gas chromatography/tandem mass spectrometry. *Rapid communications in mass spectrometry : RCM*, 18(5), 537-543. doi: 10.1002/rcm.1359
- Eljarrat, E., Guerra, P., Martinez, E., Farre, M., Alvarez, J. G., Lopez-Teijon, M., & Barcelo, D. (2009). Hexabromocyclododecane in Human Breast Milk: Levels and Enantiomeric Patterns. *Environmental Science & Technology*, 43(6), 1940-1946. doi: 10.1021/es802919e
- EPA, U. S. (2011). Pesticides Industry Sales and Usage: 2006 and 2007 Market Estimates. Washington: U.S. EPA.
- EPA, U. S. (2014). ECOTOX: Terrestrial Report Retrieved July of 2014, from <http://cfpub.epa.gov/ecotox/report.cfm?type=short>
- Esteve-Turrillas, F. A., Pastor, A., & de la Guardia, M. (2005). Determination of pyrethroid insecticide residues in vegetable oils by using combined solid-phases extraction and tandem mass spectrometry detection. *Analytica Chimica Acta*, 553(1-2), 50-57. doi: 10.1016/j.aca.2005.08.004
- FAO. (2014). The State of World Fisheries and Aquaculture: Opportunities and challenges. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations.
- Farina, Y., Abdullah, M. P., Bibi, N., & Khalik, W. (2017). Determination of pesticide residues in leafy vegetables at parts per billion levels by a chemometric study using GC-ECD in Cameron Highlands, Malaysia. [Article]. *Food Chemistry*, 224, 55-61. doi: 10.1016/j.foodchem.2016.11.113
- Feo, M. L., Eljarrat, E., & Barcelo, D. (2010a). Determination of pyrethroid insecticides in environmental samples. *Trac-Trends in Analytical Chemistry*, 29(7), 692-705. doi: 10.1016/j.trac.2010.03.011
- Feo, M. L., Eljarrat, E., & Barcelo, D. (2010b). A rapid and sensitive analytical method for the determination of 14 pyrethroids in water samples. *Journal of Chromatography A*, 1217(15), 2248-2253. doi: 10.1016/j.chroma.2010.02.018
- Feo, M. L., Eljarrat, E., & Barcelo, D. (2011). Performance of gas chromatography/tandem mass spectrometry in the analysis of pyrethroid insecticides in environmental and food samples. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 25(7), 869-876. doi: 10.1002/rcm.4936
- Feo, M. L., Eljarrat, E., Manaca, M. N., Dobano, C., Barcelo, D., Sunyer, J., Alonso, P. L., Menendez, C., & Grimalt, J. O. (2012). Pyrethroid use-malaria control and individual applications by households for other pests and home garden use. *Environment International*, 38(1), 67-72. doi: 10.1016/j.envint.2011.08.008
- Feo, M. L., Ginebreda, A., Eljarrat, E., & Barcelo, D. (2010). Presence of pyrethroid pesticides in water and sediments of Ebro River Delta. *Journal of Hydrology*, 393(3-4), 156-162. doi: 10.1016/j.jhydrol.2010.08.012
- Fernandez-Alvarez, M., Lores, M., Llompart, M., Garcia-Jares, C., & Cela, R. (2007). The photochemical behaviour of five household pyrethroid insecticides and a synergist as

- studied by photosolid-phase microextraction. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 388(5-6), 1235-1247.
- Fernandez-Alvarez, M., Llompарт, M., Lamas, J. P., Lores, M., Garcia-Jares, C., Cela, R., & Dagnac, T. (2008). Simultaneous determination of traces of pyrethroids, organochlorines and other main plant protection agents in agricultural soils by headspace solid-phase microextraction-gas chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1188(2), 154-163. doi: 10.1016/j.chroma.2008.02.080
- Florin, S. T., Felicetti, L. A., & Robbins, C. T. (2011). The biological basis for understanding and predicting dietary-induced variation in nitrogen and sulphur isotope ratio discrimination. [Article]. *Functional Ecology*, 25(3), 519-526. doi: 10.1111/j.1365-2435.2010.01799.x
- Fossi, M. C., Casini, S., & Marsili, L. (2007). Potential toxicological hazard due to endocrine-disrupting chemicals on Mediterranean top predators: State of art, gender differences and methodological tools. *Environmental Research*, 104(1), 174-182. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.envres.2006.06.014>
- Gabbianelli, R., Falcioni, M. L., Nasuti, C., Cantalamessa, F., Imada, I., & Inoue, M. (2009). Effect of permethrin insecticide on rat polymorphonuclear neutrophils. *Chemico-Biological Interactions*, 182(2-3), 245-252. doi: 10.1016/j.cbi.2009.09.006
- Garcia-Rodriguez, D., Cela-Torrijos, R., Lorenzo-Ferreira, R. A., & Carro-Diaz, A. M. (2012). Analysis of pesticide residues in seaweeds using matrix solid-phase dispersion and gas chromatography-mass spectrometry detection. *Food Chemistry*, 135(1), 259-267. doi: 10.1016/j.foodchem.2012.04.088
- Giménez, J., Cañadas, A., Ramírez, F., Afán, I., Garcia-Tiscar, S., Fernandez-Maldonado, C., Castillo, J. J., & de Stephanis, R. (2017). Intra- and interspecific niche partitioning in striped and common dolphins inhabiting the southwestern Mediterranean Sea. *Marine Ecology Progress Series*, 567, 199-210.
- Giménez, J., De Stephanis, R., Gauffier, P., Esteban, R., & Verborgh, P. (2011). Short communications: Biopsy wound healing in long-finned pilot whales (*Globicephala melas*). [Article]. *Veterinary Record*, 168(4). doi: 10.1136/vr.c5284
- Godard-Codding, C. A. J., Clark, R., Fossi, M. C., Marsili, L., Maltese, S., West, A. G., Valenzuela, L., Rowntree, V., Polyak, I., Cannon, J. C., Pinkerton, K., Rubio-Cisneros, N., Mesnick, S. L., Cox, S. B., Kerr, I., Payne, R., & Stegeman, J. J. (2011). Pacific Ocean-Wide Profile of CYP1A1 Expression, Stable Carbon and Nitrogen Isotope Ratios, and Organic Contaminant Burden in Sperm Whale Skin Biopsies. [Article]. *Environmental Health Perspectives*, 119(3), 337-343. doi: 10.1289/ehp.0901809
- Göen, T., Schmidt, L., Lichtensteiger, W., & Schlumpf, M. (2017). Efficiency control of dietary pesticide intake reduction by human biomonitoring. *International journal of hygiene and environmental health*, 220(2, Part A), 254-260. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2016.11.008>
- Goulding, A. T., Shelley, L. K., Ross, P. S., & Kennedy, C. J. (2013). Reduction in swimming performance in juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) following sublethal exposure to pyrethroid insecticides. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 157(3), 280-286. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cbpc.2013.01.001>
- Gowland, B., Webster, L., Fryer, R., Davies, I., Moffat, C., & Stagg, R. (2002). Uptake and effects of the cypermethrin-containing sea lice treatment Excis® in the marine mussel, *Mytilus edulis*. *Environmental Pollution*, 120(3), 805-811. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S0269-7491\(02\)00176-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0269-7491(02)00176-8)
- Gui, D., Yu, R., He, X., Tu, Q., & Wu, Y. (2014). Tissue distribution and fate of persistent organic pollutants in Indo-Pacific humpback dolphins from the Pearl River Estuary, China. *Marine Pollution Bulletin*, 86(1-2), 266-273. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.marpolbul.2014.07.007>

- Gullick, D. R., Bruckner, J. V., White, C. A., Chen, C., Cummings, B. S., & Bartlett, M. G. (2016). Quantitation of Deltamethrin in Rat Liver and Muscle Homogenates Using Dispersive Solid-Phase Extraction with GC-NCI-MS. [Article]. *Journal of Aoac International*, 99(3), 813-820. doi: 10.5740/jaoacint.15-0314
- Gullick, D. R., Popovici, A., Young, H. C., Bruckner, J. V., Cummings, B. S., Li, P., & Bartlett, M. G. (2014). Determination of deltamethrin in rat plasma and brain using gas chromatography-negative chemical ionization mass spectrometry. *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 960, 158-165.
- Gunness, P., Mueller, D., Shevchenko, V., Heinzle, E., Ingelman-Sundberg, M., & Noor, F. (2013). 3D Organotypic Cultures of Human HepaRG Cells: A Tool for In Vitro Toxicity Studies. *Toxicological Sciences*, 133(1), 67-78. doi: 10.1093/toxsci/kft021
- Hall, A. J., Hugunin, K., Deaville, R., Law, R. J., Allchin, C. R., & Jepson, P. D. (2006). The risk of infection from polychlorinated biphenyl exposure in the harbor porpoise (*Phocoena phocoena*): A case-control approach. *Environmental Health Perspectives*, 114(5), 704-711. doi: 10.1289/ehp.8222
- Hall, A. J., McConnell, B. J., Rowles, T. K., Aguilar, A., Borrell, A., Schwacke, L., Reijnders, P. J. H., & Wells, R. S. (2006). Individual-based model framework to assess population consequences of polychlorinated biphenyl exposure in bottlenose dolphins. [Article; Proceedings Paper]. *Environmental Health Perspectives*, 114, 60-64. doi: 10.1289/ehp.8053
- Han, J. J., Zhou, L. Q., Luo, M., Liang, Y. R., Zhao, W. T., Wang, P., Zhou, Z. Q., & Liu, D. H. (2017). Nonoccupational Exposure to Pyrethroids and Risk of Coronary Heart Disease in the Chinese Population. [Article]. *Environmental Science & Technology*, 51(1), 664-670. doi: 10.1021/acs.est.6b05639
- Hansen, M. R. H., Jors, E., Lander, F., Condarco, G., Debes, F., Bustillos, N. T., & Schlunssen, V. (2017). Neurological Deficits After Long-term Pyrethroid Exposure. [Article]. *Environmental Health Insights*, 11, 1-11. doi: 10.1177/1178630217700628
- Herman, D. P., Matkin, C. O., Ylitalo, G. M., Durban, J. W., Hanson, M. B., Dahlheim, M. E., Straley, J. M., Wade, P. R., Tilbury, K. L., Boyer, R. H., Pearce, R. W., & Krahn, M. M. (2008). Assessing age distributions of killer whale *Orcinus orca* populations from the composition of endogenous fatty acids in their outer blubber layers. *Marine Ecology Progress Series*, 372, 289-302. doi: 10.3354/meps07709
- Hines, R. N., Simpson, P. M., & McCarver, D. G. (2016). Age-Dependent Human Hepatic Carboxylesterase 1 (CES1) and Carboxylesterase 2 (CES2) Postnatal Ontogeny. [10.1124/dmd.115.068957]. *Drug Metabolism and Disposition*, 44(7), 959.
- Hollmann, S., & Touster, O. (1962). Alterations in tissue levels of uridine diphosphate glucose dehydrogenase, uridine diphosphate glucuronic acid pyrophosphatase and glucuronyl transferase induced by substances influencing the production of ascorbic acid. *Biochimica et Biophysica Acta*, 62(2), 338-352. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/0006-3002\(62\)90048-3](http://dx.doi.org/10.1016/0006-3002(62)90048-3)
- Hosokawa, M., Maki, T., & Satoh, T. (1990). Characterization of molecular species of liver microsomal carboxylesterases of several animal species and humans. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 277, 245-253.
- Hu, J., Guo, Y. R., Liang, X., Liu, X. J., Zhu, G. N., Liu, F. Q., Wang, M. H., Wang, L. M., Hua, X. D., & Zhang, C. Z. (2016). Lateral Flow Immunoassay for Simultaneous Determination of Four Kinds of Pyrethroid Pesticides in Vegetables and Fruits. [Article]. *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, 44(12), 1900-1906. doi: 10.11895/j.issn.0253-3820.160428
- Huang, H., Fleming, C. D., Nishi, K., Redinbo, M. R., & Hammock, B. D. (2005). Stereoselective Hydrolysis of Pyrethroid-like Fluorescent Substrates by Human and Other Mammalian Liver Carboxylesterases. *Chemical Research in Toxicology*, 18, 1371-1377.
- INE. (2015), 2015, from http://www.ine.es/daco/daco42/eip93/eip_2007.html

- Islam, J., Zaman, K., Duarah, S., Raju, P. S., & Chattopadhyay, P. (2017). Mosquito repellents: An insight into the chronological perspectives and novel discoveries. [Article]. *Acta Tropica*, *167*, 216-230. doi: 10.1016/j.actatropica.2016.12.031
- Jiang, W. Y., Conkle, J. L., Luo, Y. Z., Li, J. Y., Xu, K., & Gan, J. (2016). Occurrence, Distribution, and Accumulation of Pesticides in Exterior Residential Areas. [Article]. *Environmental Science & Technology*, *50*(23), 12592-12601. doi: 10.1021/acs.est.6b01396
- Jin, Y., Liu, J., Wang, L., Chen, R., Zhou, C., Yang, Y., Liu, W., & Fu, Z. (2012). Permethrin exposure during puberty has the potential to enantioselectively induce reproductive toxicity in mice. *Environment International*, *42*, 144-151. doi: 10.1016/j.envint.2011.05.020
- Jin, Y., Wang, J., Pan, X., Miao, W., Lin, X., Wang, L., & Fu, Z. (2016). Enantioselective disruption of the endocrine system by Cis-Bifenthrin in the male mice. [Article]. *Environmental Toxicology*, *30*(7), 746-754. doi: 10.1002/tox.21954
- Jin, Y., Wang, L., Ruan, M., Liu, J., Yang, Y., Zhou, C., Xu, B., & Fu, Z. (2011). Cypermethrin exposure during puberty induces oxidative stress and endocrine disruption in male mice. *Chemosphere*, *84*(1), 124-130. doi: 10.1016/j.chemosphere.2011.02.034
- Karnovsky, N. J., Hobson, K. A., & Iverson, S. J. (2012). From lavage to lipids: estimating diets of seabirds. *Marine Ecology Progress Series*, *451*, 263-284. doi: 10.3354/meps09713
- Khan, A., Ahmad, L., & Khan, M. Z. (2012). Hemato-Biochemical Changes Induced by Pyrethroid Insecticides in Avian, Fish and Mammalian Species. *International Journal of Agriculture and Biology*, *14*(5), 834-842.
- Khazri, A., Sellami, B., Dellali, M., Corcellas, C., Eljarrat, E., Barcelo, D., Beyrem, H., & Mahmoudi, E. (2016). Diastereomeric and enantiomeric selective accumulation of cypermethrin in the freshwater mussel *Unio gibbus* and its effects on biochemical parameters. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, *129*, 83-88. doi: 10.1016/j.pestbp.2015.11.001
- Khazri, A., Sellami, B., Dellali, M., Corcellas, C., Eljarrat, E., Barceló, D., & Mahmoudi, E. (2015). Acute toxicity of cypermethrin on the freshwater mussel *Unio gibbus*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, *115*, 62-66. doi: 10.1016/j.ecoenv.2015.01.028
- Ki Chang, A., Gee, S. J., Kim, H.-J., Aronov, P. A., Vega, H., Krieger, R. I., & Hammock, B. D. (2011). Immunochemical analysis of 3-phenoxybenzoic acid, a biomarker of forestry worker exposure to pyrethroid insecticides. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, *401*(4), 1285-1293. doi: 10.1007/s00216-011-5184-z
- Kim, K. B., Bartlett, M. G., Anand, S. S., Bruckner, J. V., & Kim, H. J. (2006). Rapid determination of the synthetic pyrethroid insecticide, deltamethrin, in rat plasma and tissues by HPLC. *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, *834*(1-2), 141-148. doi: 10.1016/j.jchromb.2006.02.039
- King, K. A., Grue, C. E., Grassley, J. M., & Fisk, R. J. (2013). Pesticides in urban streams and early life stages of pacific coho salmon. [Article]. *Environmental Toxicology and Chemistry*, *32*(4), 920-931. doi: 10.1002/etc.2117
- Kuang, H., Hong, M., Hou, X. L., Zhao, Y. F., Shen, J. Z., & Wu, Y. N. (2010). Determination of enantiomeric fractions of cypermethrin and cis-bifenthrin in Chinese teas by GC/ECD. [Article; Proceedings Paper]. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *90*(8), 1374-1379. doi: 10.1002/jsfa.3934
- Kucklick, J., Schwacke, L., Wells, R., Hohn, A., Guichard, A., Yordy, J., Hansen, L., Zolman, E., Wilson, R., Litz, J., Nowacek, D., Rowles, T., Pugh, R., Balmer, B., Sinclair, C., & Rosel, P. (2011). Bottlenose Dolphins as Indicators of Persistent Organic Pollutants in the Western North Atlantic Ocean and Northern Gulf of Mexico. [Article]. *Environmental Science & Technology*, *45*(10), 4270-4277. doi: 10.1021/es1042244
- Kutter, J. P., & Class, T. J. (1992). Diastereoselective and enantioselective chromatography of the pyrethroid insecticides allethrin and cypermethrin. *Chromatographia*, *33*(3-4), 103-112. doi: 10.1007/bf02275888

- Langford, K., Oxnevad, S., Schoyen, M., & Thomas, K. V. (2014). Do antiparasitic medicines used in aquaculture pose a risk to the Norwegian aquatic environment? *Environmental Science & Technology*, *48*, 7774-7780.
- Lavado, R., Li, J., Rimoldi, J. M., & Schlenk, D. (2014). Evaluation of the stereoselective biotransformation of permethrin in human liver microsomes: Contributions of cytochrome P450 monooxygenases to the formation of estrogenic metabolites. *Toxicology Letters*, *226*(2), 192-197. doi: <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2014.02.005>
- Lavado, R., Li, J. W., Rimoldi, J. M., & Schlenk, D. (2014). Evaluation of the stereoselective biotransformation of permethrin in human liver microsomes: Contributions of cytochrome P450 monooxygenases to the formation of estrogenic metabolites. [Article]. *Toxicology Letters*, *226*(2), 192-197. doi: 10.1016/j.toxlet.2014.02.005
- Le Hegarat, L., Mourot, A., Huet, S., Vasseur, L., Camus, S., Chesne, C., & Fessard, V. (2014). Performance of Comet and Micronucleus Assays in Metabolic Competent HepaRG Cells to Predict In Vivo Genotoxicity. *Toxicological Sciences*, *138*(2), 300-309. doi: 10.1093/toxsci/kfu004
- Li, H. J., Wei, X., Xu, Y. Q., Lu, K., Zhang, Y. F., Yan, Y. S., & Li, C. X. (2017). A thin shell and "sunny shape" molecular imprinted fluorescence sensor in selective detection of trace level pesticides in river. [Article]. *Journal of Alloys and Compounds*, *705*, 524-532. doi: 10.1016/j.jallcom.2016.12.239
- Li, H. Z., Lydy, M. J., & You, J. (2016). Pyrethroids in indoor air during application of various mosquito repellents: Occurrence, dissipation and potential exposure risk. [Article]. *Chemosphere*, *144*, 2427-2435. doi: 10.1016/j.chemosphere.2015.11.025
- Li, H. Z., Ma, H. Z., Lydy, M. J., & You, J. (2014). Occurrence, seasonal variation and inhalation exposure of atmospheric organophosphate and pyrethroid pesticides in an urban community in South China. [Article]. *Chemosphere*, *95*, 363-369. doi: 10.1016/j.chemosphere.2013.09.046
- Li, J. S., Luo, F., Liu, L. Y., Ruan, J. F., & Wang, N. N. (2017). Exposure to bifenthrin disrupts the development of testis in male *Sebastiscus marmoratus*. [Article]. *Acta Oceanologica Sinica*, *36*(2), 57-61. doi: 10.1007/s13131-017-1001-7
- Li, L. L., Yang, D., Song, Y. F., Shi, Y., Huang, B., Yan, J., & Dong, X. X. (2017). Effects of bifenthrin exposure in soil on whole-organism endpoints and biomarkers of earthworm *Eisenia fetida*. [Article]. *Chemosphere*, *168*, 41-48. doi: 10.1016/j.chemosphere.2016.10.060
- Li, W., Morgan, M. K., Graham, S. E., & Starr, J. M. (2016). Measurement of pyrethroids and their environmental degradation products in fresh fruits and vegetables using a modification of the quick easy cheap effective rugged safe (QuEChERS) method. *Talanta*, *151*, 42-50. doi: <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2016.01.009>
- Li, Y. G., Chen, Z. L., Zhang, R., Luo, P., Zhou, Y., Wen, S., & Ma, M. H. (2016). Simultaneous Determination of 42 Pesticides and Herbicides in Chicken Eggs by UHPLC-MS/MS and GC-MS Using a QuEChERS-Based Procedure. [Article; Proceedings Paper]. *Chromatographia*, *79*(17-18), 1165-1175. doi: 10.1007/s10337-016-3132-y
- Li, Z. X., Nie, J. Y., Lu, Z. Q., Xie, H. Z., Kang, L., Chen, Q. S., Li, A., Zhao, X. B., Xu, G. F., & Yan, Z. (2016). Cumulative risk assessment of the exposure to pyrethroids through fruits consumption in China - Based on a 3-year investigation. [Article]. *Food and Chemical Toxicology*, *96*, 234-243. doi: 10.1016/j.fct.2016.08.012
- Liu, P., Liu, Y., Liu, Q., & Liu, J. (2010). Photodegradation mechanism of deltamethrin and fenvalerate. *Journal of Environmental Sciences*, *22*(7), 1123-1128.
- Liu, W. P., & Gan, J. J. (2004a). Determination of enantiomers of synthetic pyrethroids in water by solid phase microextraction - Enantioselective gas chromatography. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *52*(4), 736-741. doi: 10.1021/jf035276f
- Liu, W. P., & Gan, J. J. (2004b). Separation and analysis of diastereomers and enantiomers of cypermethrin and cyfluthrin by gas chromatography. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *52*(4), 755-761. doi: 10.1021/jf035179m

- Lu, D., Wang, D., Feng, C., Jin, Y. e., Zhou, Z., Wu, C., Lin, Y., & Wang, G. (2013). Urinary concentrations of metabolites of pyrethroid insecticides in textile workers, Eastern China. *Environment International*, *60*, 137-144. doi: 10.1016/j.envint.2013.08.004
- Lu, X. (2013). Enantioselective effect of bifenthrin on antioxidant enzyme gene expression and stress protein response in PC12 cells. *Journal of Applied Toxicology*, *33*(7), 586-592. doi: 10.1002/jat.1774
- Ma, F., & Chen, L. G. (2014). Development of magnetic molecularly imprinted polymers based on carbon nanotubes – Application for trace analysis of pyrethroids in fruit matrices. *Journal of Chromatography A*, *1329*, 1-9.
- Mahugija, J. A. M., Khamis, F. A., & Lugwisha, E. H. J. (2017). Determination of Levels of Organochlorine, Organophosphorus, and Pyrethroid Pesticide Residues in Vegetables from Markets in Dar es Salaam by GC-MS. [Article]. *International Journal of Analytical Chemistry*. doi: 10.1155/2017/4676724
- Mandin, C., Mercier, F., Rarnalho, O., Lucas, J. P., Gilles, E., Blanchard, O., Bonvallot, N., Glorennec, P., & Le Bot, B. (2016). Semi-volatile organic compounds in the particulate phase in dwellings: A nationwide survey in France. [Article]. *Atmospheric Environment*, *136*, 82-94. doi: 10.1016/j.atmosenv.2016.04.016
- Manikandan, N., Seenivasan, S., Ganapathy, M. N. K., Muraleedharan, N. N., & Selvasundaram, R. (2009). Leaching of residues of certain pesticides from black tea to brew. [Article]. *Food Chemistry*, *113*(2), 522-525. doi: 10.1016/j.foodchem.2008.07.094
- McConnaughey, T., & McRoy, C. P. (1979). Food-web structure and the fractionation of carbon isotopes in the Bering Sea. [Article]. *Marine Biology*, *53*(3), 257-262. doi: 10.1007/bf00952434
- McCoy, M. R., Yang, Z., Fu, X., Ahn, K. C., Gee, S. J., Bom, D. C., Zhong, P., Chang, D., & Hammock, B. D. (2012). Monitoring of Total Type II Pyrethroid Pesticides in Citrus Oils and Water by Converting to a Common Product 3-Phenoxybenzoic Acid. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *60*(20), 5065-5070. doi: 10.1021/jf2051653
- Mekebri, A., Crane, D. B., Blondina, G. J., Oros, D. R., & Rocca, J. L. (2008). Extraction and analysis methods for the determination of pyrethroid insecticides in surface water, sediments and biological tissues at environmentally relevant concentrations. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, *80*(5), 455-460. doi: 10.1007/s00128-008-9382-0
- Millot, F., Berny, P., Decors, A., & Bro, E. (2015). Little field evidence of direct acute and short-term effects of current pesticides on the grey partridge. [Article]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, *117*, 41-61. doi: 10.1016/j.ecoenv.2015.03.017
- Mir-Tutusaus, J. A., Masís-Mora, M., Corcellas, C., Eljarrat, E., Barceló, D., Sarrà, M., Caminal, G., Vicent, T., & Rodríguez-Rodríguez, C. E. (2014). Degradation of selected agrochemicals by the white rot fungus *Trametes versicolor*. *Science of the Total Environment*, *500–501*(0), 235-242. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.08.116>
- Morgan, M. K., Sobus, J. R., Barr, D. B., Croghan, C. W., Chen, F.-L., Walker, R., Alston, L., Andersen, E., & Clifton, M. S. (2016). Temporal variability of pyrethroid metabolite levels in bedtime, morning, and 24-h urine samples for 50 adults in North Carolina. *Environmental Research*, *144*, Part A, 81-91. doi: <https://doi.org/10.1016/j.envres.2015.11.003>
- Moschet, C., Lew, B. M., Hasenbein, S., Anumol, T., & Young, T. M. (2017). LC- and GC-QTOF-MS as Complementary Tools for a Comprehensive Micropollutant Analysis in Aquatic Systems. [Article]. *Environmental Science & Technology*, *51*(3), 1553-1561. doi: 10.1021/acs.est.6b05352
- Murphy, S., Pinn, E. H., & Jepson, P. D. (2013). The short -beaked common dolphin (*Delphinus delphis*) in the north -east Atlantic: distribution, ecology, management and conser vation status. *Oceanography and Marine Biology: An Annual Review*, *51*, 193-280.

- Nakamura, Y., Sugihara, K., Sone, T., Isobe, M., Ohta, S., & Kitamura, S. (2007). The in vitro metabolism of a pyrethroid insecticide, permethrin, and its hydrolysis products in rats. *Toxicology*, 235(3), 176-184. doi: 10.1016/j.tox.2007.03.016
- Ochiai, N., Sasamoto, K., Kanda, H., & Pfannkoch, E. (2008). Sequential stir bar sorptive extraction for uniform enrichment of trace amounts of organic pollutants in water samples. [Article; Proceedings Paper]. *Journal of Chromatography A*, 1200(1), 72-79. doi: 10.1016/j.chroma.2008.05.069
- Olsson, A. O., Baker, S. E., Nguyen, J. V., Romanoff, L. C., Udunka, S. O., Walker, R. D., Flemmen, K. L., & Barr, D. B. (2004). A liquid chromatography-tandem mass spectrometry multiresidue method for quantification of specific metabolites of organophosphorus pesticides, synthetic pyrethroids, selected herbicides, and DEET in human urine. *Analytical Chemistry*, 76(9), 2453-2461. doi: 10.1021/ac0355404
- Ostrea, E. M., Jr., Bielawski, D. M., Posecion, N. C., Jr., Corrion, M., Villanueva-Uy, E., Bernardo, R. C., Jin, Y., Janisse, J. J., & Ager, J. W. (2009). Combined analysis of prenatal (maternal hair and blood) and neonatal (infant hair, cord blood and meconium) matrices to detect fetal exposure to environmental pesticides. *Environmental Research*, 109(1), 116-122. doi: 10.1016/j.envres.2008.09.004
- Oudou, H. C., & Hansen, H. C. B. (2002). Sorption of lambda-cyhalothrin, cypermethrin, deltamethrin and fenvalerate to quartz, corundum, kaolinite and montmorillonite. *Chemosphere*, 49(10), 1285-1294. doi: Pii s0045-6535(02)00507-6
- Pawar, N. N., Badgujar, P. C., Sharma, L. P., Telang, A. G., & Singh, K. P. (2017). Oxidative impairment and histopathological alterations in kidney and brain of mice following subacute lambda-cyhalothrin exposure. [Article]. *Toxicology and Industrial Health*, 33(3), 277-286. doi: 10.1177/0748233715627736
- Perez, J. J., Williams, M. K., Weeraseskera, G., Smith, K., Whyatt, R. M., Needham, L. L., & Barr, D. B. (2010). Measurement of pyrethroid, organophosphorus, and carbamate insecticides in human plasma using isotope dilution gas chromatography-high resolution mass spectrometry. *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 878(27), 2554-2562. doi: 10.1016/j.jchromb.2010.03.015
- Pfeil, R. (2014). Pyrethroids. In Y. Motarjemi, G. Moy & T. Ewen (Eds.), *Encyclopedia of Food Safety* (Vol. 3, pp. 31-34): Elsevier.
- Picinin, L. C. A., Toaldo, I. M., Hoff, R. B., Souza, F. N., Leite, M. O., Fonseca, L. M., Diniz, S. A., Silva, M. X., Haddad, J. P. A., Cerqueira, M., & Bordignon-Luiz, M. T. (2017). Milk quality parameters associated with the occurrence of veterinary drug residues in bulk tank milk. [Article]. *Scientia Agricola*, 74(3), 195-202. doi: 10.1590/1678-992x-2016-0120
- Pogoda, J. M., & Preston-Martin, S. (1997). Household pesticides and risk of pediatric brain tumors. *Environmental Health Perspectives*, 105(11), 1214-1220. doi: 10.1289/ehp.971051214
- Prochazka, P., Reif, J., Horak, D., Klvana, P., Lee, R. W., & Yohannes, E. (2010). Using stable isotopes to trace resource acquisition and trophic position in four Afrotropical birds with different diets. *Ostrich*, 81(3), 273-275. doi: 10.2989/00306525.2010.519889
- Qiu, H., Gao, L., Wang, J. X., Pan, J. M., Yan, Y. S., & Zhang, X. F. (2017). A precise and efficient detection of Seta-Cyfluthrin via fluorescent molecularly imprinted polymers with ally fluorescein as functional monomer in agricultural products. [Article]. *Food Chemistry*, 217, 620-627. doi: 10.1016/j.foodchem.2016.09.028
- Ramesh, A., & Ravi, P. E. (2004a). Electron ionization gas chromatography-mass spectrometric determination of residues of thirteen pyrethroid insecticides in whole blood. *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 802(2), 371-376. doi: 10.1016/j.jchromb.2003.12.016

- Ramesh, A., & Ravi, P. E. (2004b). Negative ion chemical ionization-gas chromatographic-mass spectrometric determination of residues of different pyrethroid insecticides in whole blood and serum. *Journal of Analytical Toxicology*, 28(8), 660-666.
- Ratelle, M., Côté, J., & Bouchard, M. (2016). Time courses and variability of pyrethroid biomarkers of exposure in a group of agricultural workers in Quebec, Canada. [Journal article]. *International Archives of Occupational and Environmental Health*, 89(5), 767-783. doi: 10.1007/s00420-016-1114-x
- Regueiro, J., Llompart, M., Garcia-Jares, C., & Cela, R. (2007). Development of a high-throughput method for the determination of organochlorinated compounds, nitromusks and pyrethroid insecticides in indoor dust. *Journal of Chromatography A*, 1174(1-2), 112-124. doi: 10.1016/j.chroma.2007.08.052
- Reijnders, P. J. H. (1986). Reproductive failure in common seals feeding on fish from polluted coastal waters. [Article]. *Nature*, 324(6096), 456-&. doi: 10.1038/324456a0
- Richards, J., Reif, R. B., Luo, Y. Z., & Gan, J. (2016). Distribution of pesticides in dust particles in urban environments. [Article]. *Environmental Pollution*, 214, 290-298. doi: 10.1016/j.envpol.2016.04.025
- Richterova, Z., Machova, J., Stara, A., Tumova, J., Velisek, J., Sevcikova, M., & Svobodova, Z. (2014). Effects of Cyhalothrin-Based Pesticide on Early Life Stages of Common Carp (*Cyprinus carpio* L.). [Article]. *Biomed Research International*. doi: 10.1155/2014/107373
- Ridgway, S., & Brownson, R. (1984). Relative brain sizes and cortical surface areas in odontocetes. *Acta Zool Fenn*, 172, 149-152.
- Rissato, S. R., Galhiane, M. S., Apon, B. M., & Arruda, M. S. P. (2005). Multiresidue analysis of pesticides in soil by supercritical fluid extraction/gas chromatography with electron-capture detection and confirmation by gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(1), 62-69. doi: 10.1021/jf048772s
- Robbins, C. T., Felicetti, L. A., & Sponheimer, M. (2005). The effect of dietary protein quality on nitrogen isotope discrimination in mammals and birds. *Oecologia*, 144(4), 534-540. doi: 10.1007/s00442-005-0021-8
- Roberts, T. R., & Standen, M. E. (1981). Further studies of the degradation of the pyrethroid insecticide cypermethrin in soils. *Pesticide Science*, 12, 285-296.
- Rocha, M. J., Ribeiro, M. F. T., Cruzeiro, C., Figueiredo, F., & Rocha, E. (2012). Development and validation of a GC-MS method for determination of 39 common pesticides in estuarine water - targeting hazardous amounts in the Douro River estuary. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*, 92(14), 1587-1608. doi: 10.1080/03067319.2011.581366
- Rodrigues, E. T., Pardal, M. A., Salgueiro-Gonzalez, N., Muniategui-Lorenzo, S., & Alpendurada, M. F. (2016). A single-step pesticide extraction and clean-up multi-residue analytical method by selective pressurized liquid extraction followed by on-line solid phase extraction and ultra-high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry for complex matrices. [Article]. *Journal of Chromatography A*, 1452, 10-17. doi: 10.1016/j.chroma.2016.05.036
- Rousis, N. I., Zuccato, E., & Castiglioni, S. (2017). Wastewater-based epidemiology to assess human exposure to pyrethroid pesticides. [Article]. *Environment International*, 99, 213-220. doi: 10.1016/j.envint.2016.11.020
- San Román, M. (2003). Intoxicación por piretrinas: una causa singular de convulsiones en el lactante. *Boletín de pediatría*, 43, 284.
- Sanborn, M., Kerr, K. J., Sanin, L. H., Cole, D. C., Bassil, K. L., & Vakil, C. (2007). Non-cancer health effects of pesticides: systematic review and implications for family doctors. *Canadian family physician Medecin de famille canadien*, 53(10), 1712-1720.
- Santos, M. B., & Pierce, G. J. (2015). Marine mammals and good environmental status: science, policy and society; challenges and opportunities. *Hydrobiologia*, 750(1), 13-41.

- Satoh, T., & Hosokawa, M. (1998). The mammalian carboxylesterases: from molecules to functions. *Annual reviews of pharmacology and toxicology*, *38*, 257-288.
- Scollon, E. J., Starr, J., Crofton, K. M., Wolansky, M. J., DeVito, M. J., & Hughes, M. F. (2011). Correlation of tissue concentrations of the pyrethroid bifenthrin with neurotoxicity in the rat. *Toxicology*, *290*, 1-6.
- Scollon, E. J., Starr, J. M., Godin, S. J., DeVito, M. J., & Hughes, M. F. (2009). In Vitro Metabolism of Pyrethroid Pesticides by Rat and Human Hepatic Microsomes and Cytochrome P450 Isoforms. *Drug Metabolism and Disposition*, *37*(1), 221-228. doi: 10.1124/dmd.108.022343
- SEPA. (2007). The Occurrence of Chemicals Used in Sea Louse Treatments in Sediments Adjacent to Marine Fish Farms: Results of Screening Surveys During 2006. : Scottish Environment Protection Agency
- Sereda, B., Bouwman, H., & Kylin, H. (2009). Comparing Water, Bovine Milk, and Indoor Residual Spraying as Possible Sources of DDT and Pyrethroid Residues in Breast Milk. *Journal of Toxicology and Environmental Health-Part a-Current Issues*, *72*(13), 842-851. doi: Pii 912658722 10.1080/15287390902800447
- Shen, H., Henkelmann, B., Rambeck, W. A., Mayer, R., Wehr, U., & Schramm, K.-W. (2012). Physiologically based persistent organic pollutant accumulation in pig tissues and their edible safety differences: An in vivo study. *Food Chemistry*, *132*(4), 1830-1835. doi: 10.1016/j.foodchem.2011.12.015
- Shen, P. Y., Hsieh, T. H., Yue, Y. R., Sun, Q. C., Clark, J. M., & Park, Y. (2017). Deltamethrin increases the fat accumulation in 3T3-L1 adipocytes and *Caenorhabditis elegans*. [Article]. *Food and Chemical Toxicology*, *101*, 149-156. doi: 10.1016/j.fct.2017.01.015
- Sichilongo, K. (2004). Enhanced signal generation for use in the analysis of synthetic pyrethroids using chemical ionization tandem quadrupole ion trap mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, *380*(7-8), 942-949. doi: 10.1007/s00216-2864-y
- Song, G., Sun, X., Hines, R. N., McCarver, D. G., Lake, B. G., Osimitz, T. G., Creek, M. R., Clewell, H. J., & Yoon, M. (2017). Determination of Human Hepatic CYP2C8 and CYP1A2 Age-Dependent Expression to Support Human Health Risk Assessment for Early Ages. [10.1124/dmd.116.074583]. *Drug Metabolism and Disposition*, *45*(5), 468.
- Starr, J., Graham, S., Li, D. S., Andrews, K., & Nishioka, M. (2008). Pyrethroid pesticides and their metabolites in vacuum cleaner dust collected from homes and day-care centers. *Environmental Research*, *108*(3), 271-279. doi: 10.1016/j.envres.2008.07.022
- Sukiene, V., von Goetz, N., Gerecke, A. C., Bakker, M. I., Delmaar, C. J. E., & Hungerbuehler, K. (2017). Direct and Air-Mediated Transfer of Labeled SVOCs from Indoor Sources to Dust. *Environmental Science & Technology*, *51*(6), 3269-3277. doi: 10.1021/acs.est.6b06051
- Symes, C. T., & Woodborne, S. M. (2010). Trophic level delineation and resource partitioning in a South African afro-montane forest bird community using carbon and nitrogen stable isotopes. *African Journal of Ecology*, *48*(4), 984-993. doi: 10.1111/j.1365-2028.2009.01201.x
- Symes, C. T., & Woodborne, S. M. (2011). Variation in carbon and nitrogen stable isotope ratios in flight feathers of a moulting White-bellied Sunbird *Cinnyris talatala*. *Ostrich*, *82*(3), 163-166. doi: 10.2989/00306525.2011.618248
- Taheri, N., Lan, M. J., Wei, P., Liu, R., Gui, W. J., Guo, Y. R., & Zhu, G. N. (2016). Chemiluminescent Enzyme Immunoassay for Rapid Detection of Three alpha-Cyano Pyrethroid Residues in Agricultural Products. [Article]. *Food Analytical Methods*, *9*(10), 2896-2905. doi: 10.1007/s12161-016-0482-x
- Tange, S., Fujimoto, N., Uramaru, N., Sugihara, K., Ohta, S., & Kitamura, S. (2014). In vitro metabolism of cis- and trans-permethrin by rat liver microsomes, and its effect on estrogenic and anti-androgenic activities. *Environmental toxicology and pharmacology*, *37*(3), 996-1005. doi: 10.1016/j.etap.2014.03.009

- Tao, L., Chen, M., Collins, E., & Lu, C. (2013). Simultaneous quantitation of seven pyrethroid metabolites in human urine by capillary gas chromatography–mass spectrometry. *Journal of Separation Science*, *36*(4), 773-780. doi: 10.1002/jssc.201200655
- Thiphom, S., Prapamontol, T., Chantara, S., Mangklabruks, A., Suphavitai, C., Ahn, K. C., Gee, S. J., & Hammock, B. D. (2014). Determination of the pyrethroid insecticide metabolite 3-PBA in plasma and urine samples from farmer and consumer groups in northern Thailand. *Journal of Environmental Science and Health Part B-Pesticides Food Contaminants and Agricultural Wastes*, *49*(1), 15-22. doi: 10.1080/03601234.2013.836862
- Tornero, V., Borrell, A., Forcada, J., & Aguilar, A. (2004). Tissue distribution of retinoids in common dolphins *Delphinus delphis*. *Marine Ecology Progress Series*, *280*, 275-283. doi: 10.3354/meps280275
- Tucca, F., Moya, H., Pozo, K., Borghini, F., Focardi, S., & Barra, R. (2017). Occurrence of antiparasitic pesticides in sediments near salmon farms in the northern Chilean Patagonia. [Article]. *Marine Pollution Bulletin*, *115*(1-2), 465-468. doi: 10.1016/j.marpolbul.2016.11.041
- UH. (2011). Pesticide Properties DataBase. Retrieved 11/02/2014, from University of Hertfordshire <http://sitem.herts.ac.uk/aeru/footprint/index2.htm>
- UNEP, & FAO. (2014). SYNERGIES DECISIONS. Compilation of decisions related to enhancing cooperation and coordination among the Basel, Rotterdam and Stockholm conventions.
- Valverde, A., Aguilera, A., Rodriguez, M., & Boulaid, M. (2002). What are we determining using gas chromatographic multiresidue methods: tralomethrin or deltamethrin? *Journal of Chromatography A*, *943*(1), 101-111. doi: 10.1016/s0021-9673(01)01414-5
- Van den Hof, W. F. P. M., Coonen, M. L. J., van Herwijnen, M., Brauers, K., Wodzig, W. K. W. H., van Delft, J. H. M., & Keinjans, J. C. S. (2014). Classification of Hepatotoxicants Using HepG2 Cells: A Proof of Principle Study. *Chemical Research in Toxicology*, *27*(3), 433-442. doi: 10.1021/tx4004165
- Van Emon, J. M., & Chuang, J. C. (2012). Development of a simultaneous extraction and cleanup method for pyrethroid pesticides from indoor house dust samples. *Analytica Chimica Acta*, *745*, 38-44. doi: 10.1016/j.aca.2012.07.031
- Van Hoeck, E., David, F., & Sandra, P. (2007). Stir bar sorptive extraction for the determination of pyrethroids in water samples - A comparison between thermal desorption in a dedicated thermal desorber, in a split/splitless inlet and by liquid desorption. *Journal of Chromatography A*, *1157*(1-2), 1-9. doi: 10.1016/j.chroma.2007.04.036
- Vardavas, A. I., Stivaktakis, P. D., Tzatzarakis, M. N., Fragkiadaki, P., Vasilaki, F., Tzardi, M., Datseri, G., Tsiaoussis, J., Alegakis, A. K., Tsitsimpikou, C., Rakitskii, V. N., Carvalho, F., & Tsatsakis, A. M. (2016). Long-term exposure to cypermethrin and piperonyl butoxide cause liver and kidney inflammation and induce genotoxicity in New Zealand white male rabbits. [Article]. *Food and Chemical Toxicology*, *94*, 250-259. doi: 10.1016/j.fct.2016.06.016
- Varro, P., Kovacs, M., & Vilagi, I. (2017). The insecticide esfenvalerate modulates neuronal excitability in mammalian central nervous system in vitro. [Article]. *Toxicology Letters*, *267*, 39-44. doi: 10.1016/j.toxlet.2016.12.012
- Viel, J. F., Rouget, F., Warembourg, C., Monfort, C., Limon, G., Cordier, S., & Chevrier, C. (2017). Behavioural disorders in 6-year-old children and pyrethroid insecticide exposure: the PELAGIE mother-child cohort. [Article]. *Occupational and Environmental Medicine*, *74*(4), 275-281. doi: 10.1136/oemed-2016-104035
- Wang, L., Liu, W., Yang, C., Pan, Z., Gan, J., Xu, C., Zhao, M., & Schlenk, D. (2007). Enantioselectivity in Estrogenic Potential and Uptake of Bifenthrin. *Environmental Science & Technology*, *41*, 6124-6128.

- Wang, X., Li, P., Zhang, W., Zhang, Q., Ma, F., Yu, L., & Wang, L. (2012). Screening for pesticide residues in oil seeds using solid-phase dispersion extraction and comprehensive two-dimensional gas chromatography time-of-flight mass spectrometry. *Journal of Separation Science*, 35(13), 1634-1643. doi: 10.1002/jssc.201100863
- Weston, D. P., & Lydy, M. J. (2010). Urban and Agricultural Sources of Pyrethroid Insecticides to the Sacramento-San Joaquin Delta of California. *Environmental Science & Technology*, 44(5), 1833-1840. doi: 10.1021/es9035573
- Woudneh, M. B., & Oros, D. R. (2006). Pyrethroids, pyrethrins, and piperonyl butoxide in sediments by high-resolution gas chromatography/high-resolution mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1135(1), 71-77. doi: 10.1016/j.chroma.2006.09.017
- Wu, H. S., Qian, M. R., Wang, J. M., Zhang, H., & Li, Z. G. (2017). Determination of Pyrethroids in *Dendrobium officinale* by Ultrasound/Microwave-Assisted Solid-Liquid-Solid Dispersive Extraction, Gas Chromatography, and Triple-Quadrupole Mass Spectrometry. [Article]. *Analytical Letters*, 50(3), 500-509. doi: 10.1080/00032719.2016.1183672
- Wu, X., Zhang, H., Meng, L., Liu, X., & Ma, Y. (2012). Graphene for Cleanup in Trace Analysis of Pyrethroid Insecticides in Cucumber and Spinach. *Chromatographia*, 75(19-20), 1177-1183. doi: 10.1007/s10337-012-2299-0
- Xu, C., Tu, W. Q., Lou, C., Hong, Y. Y., & Zhao, M. R. (2010). Enantioselective separation and zebrafish embryo toxicity of insecticide beta-cypermethrin. [Article]. *Journal of Environmental Sciences-China*, 22(5), 738-743. doi: 10.1016/s1001-0742(09)60171-6
- Xue, N. D., Xu, X. B., & Jin, Z. L. (2005). Screening 31 endocrine-disrupting pesticides in water and surface sediment samples from Beijing Guanting reservoir. *Chemosphere*, 61(11), 1594-1606. doi: 10.1016/j.chemosphere.2005.04.091
- Ye, J., Yao, Z., Wang, Z., Nie, J., & Li, Z. (2016). Determination of sixteen pyrethroids in water using dispersive liquid-liquid microextraction based on dissolved carbon dioxide flotation after emulsification microextraction using gas chromatography with triple quadrupole mass spectrometry. [10.1039/C6AY01503D]. *Analytical Methods*, 8(32), 6194-6201. doi: 10.1039/c6ay01503d
- Yordy, J. E., Pabst, D. A., McLellan, W. A., Wells, R. S., Rowles, T. K., & Kucklick, J. R. (2010). Tissue-specific distribution and whole-body burden estimates of persistent organic pollutants in the bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*). [Article]. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 29(6), 1263-1273. doi: 10.1002/etc.152
- Yordy, J. E., Wells, R. S., Balmer, B. C., Schwacke, L. H., Rowles, T. K., & Kucklick, J. R. (2010). Partitioning of Persistent Organic Pollutants between Blubber and Blood of Wild Bottlenose Dolphins: Implications for Biomonitoring and Health. [Article]. *Environmental Science & Technology*, 44(12), 4789-4795. doi: 10.1021/es1004158
- Yoshida, T. (2009). Simultaneous determination of 18 pyrethroids in indoor air by gas chromatography/mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1216(26), 5069-5076. doi: 10.1016/j.chroma.2009.04.087
- You, J., Weston, D. P., & Lydy, M. J. (2004). A sonication extraction method for the analysis of pyrethroid, organophosphate, and organochlorine pesticides from sediment by gas chromatography with electron-capture detection. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 47(2), 141-147. doi: 10.1007/s00244-003-3165-8
- Yu, X., & Yang, H. S. (2017). Pyrethroid residue determination in organic and conventional vegetables using liquid-solid extraction coupled with magnetic solid phase extraction based on polystyrene-coated magnetic nanoparticles. [Article]. *Food Chemistry*, 217, 303-310. doi: 10.1016/j.foodchem.2016.08.115
- Zehringer, M., & Herrmann, A. (2001). Analysis of polychlorinated biphenyls, pyrethroid insecticides and fragrances in human milk using a laminar cup liner in the GC injector. *European Food Research and Technology*, 212(2), 247-251. doi: 10.1007/s002170000223

- Želježić, D., Mladinić, M., Žunec, S., Lucić Vrdoljak, A., Kašuba, V., Tariba, B., Živković, T., Marjanović, A. M., Pavičić, I., Milić, M., Rozgaj, R., & Kopjar, N. (2016). Cytotoxic, genotoxic and biochemical markers of insecticide toxicity evaluated in human peripheral blood lymphocytes and an HepG2 cell line. *Food and Chemical Toxicology*, 96, 90-106. doi: <https://doi.org/10.1016/j.fct.2016.07.036>
- Zhang, J., Hisada, A., Yoshinaga, J., Shiraishi, H., Shimodaira, K., Okai, T., Noda, Y., Shirakawa, M., & Kato, N. (2013). Exposure to pyrethroids insecticides and serum levels of thyroid-related measures in pregnant women. [Article]. *Environmental Research*, 127, 16-21. doi: 10.1016/j.envres.2013.10.001
- Zhang, Q., Wang, C., Zhang, X., Jin, D., Huang, C., & Zhao, M. (2012). Enantioselective aquatic toxicity of current chiral pesticides. *Journal of Environmental Monitoring*, 14(2), 465-472. doi: 10.1039/c1em10687b
- Zhang, S.-Y., Ueyama, J., Ito, Y., Yanagiba, Y., Okamura, A., Kamijima, M., & Nakajima, T. (2008). Permethrin may induce adult male mouse reproductive toxicity due to cis isomer not trans isomer. *Toxicology*, 248(2-3), 136-141. doi: 10.1016/j.tox.2008.03.018
- Zhang, Y., Wang, X., Lin, C., Fang, G., & Wang, S. (2012). A Novel SPME Fiber Chemically Linked with 1-Vinyl-3-hexadecylimidazolium hexafluorophosphate Ionic Liquid Coupled with GC for the Simultaneous Determination of Pyrethroids in Vegetables. *Chromatographia*, 75(13-14), 789-797. doi: 10.1007/s10337-012-2244-2
- Zhao, M., Zhang, Y., Zhuang, S., Zhang, Q., Lu, C., & Liu, W. (2014). Disruption of the Hormonal Network and the Enantioselectivity of Bifenthrin in Trophoblast: Maternal-Fetal Health Risk of Chiral Pesticides. *Environmental Science & Technology*, 48(14), 8109-8116. doi: 10.1021/es501903b
- Zhao, M. R., Chen, F., Wang, C., Zhang, Q., Gan, J. Y., & Liu, W. P. (2010). Integrative assessment of enantioselectivity in endocrine disruption and immunotoxicity of synthetic pyrethroids. [Article]. *Environmental Pollution*, 158(5), 1968-1973. doi: 10.1016/j.envpol.2009.10.027