



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS DEL  
INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

**UNIDAD ZACATENCO  
DEPARTAMENTO DE TOXICOLOGÍA**

**“CINÉTICA DE EXCRECIÓN URINARIA DEL TEMEFOS EN LA RATA MACHO  
ADULTA”**

Tesis que presenta:

**L.F. MIAO LING SHIH**

Para obtener el grado de Maestra en Ciencias  
En la especialidad de Toxicología

**Director de tesis:**

Dr. Adolfo Sierra Santoyo

Ciudad de México

Noviembre, 2022

Este trabajo fue realizado en el Departamento de Toxicología del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados, del Instituto Politécnico Nacional, en el Laboratorio 17 bajo la dirección del Dr. Adolfo Sierra Santoyo, con el apoyo económico del CONACYT (No. 752813).

## **Agradecimientos**

Al Dr. Adolfo Sierra Santoyo, por otorgarme la oportunidad de formar parte de este proyecto de investigación; brindarme su confianza, paciencia y orientación durante todo el proceso de desarrollo del trabajo. También por ser un maestro académico y de vida.

A las integrantes de mi comité académico, la Dra. Betzabet Quintanilla Vega y Dra. Aurora Elizabeth Rojas García por orientarme en los seminarios, sus aportes ayudaron a mejorar este trabajo.

Al Dr. Francisco A. Verdín Betancourt por el apoyo y orientación en el desarrollo del proyecto y en cuanto a las dudas que tenía sobre el tema.

Al Dr. Gilberto Castañeda Hernández por compartir sus conocimientos valiosos de toxicocinética y cinética urinaria.

A la Q.F.B. Ma. de Lourdes López González por todo el apoyo técnico en la realización de los experimentos y tratamiento de los animales, por su paciencia en compartir sus conocimientos conmigo.

Al personal de UPEAL, M.V.Z. Benjamín Emmanuel Chávez Alvarez, M.V.Z. Rafael Leyva Muñoz, y el técnico René Pánfilo Morales, por su apoyo en el cuidado y manejo de los animales empleados en este estudio.

A la M. en C. Luz del Carmen Sánchez Peña por su enseñanza sobre el manejo del equipo para la determinación de creatinina.

Al Dr. David Abraham Alam Escamilla por su recomendación al programa de posgrado de Toxicología, sus palabras de ánimo y orientación.

A los compañeros egresados, Dr. Andrés Reyes Chaparro y M. en C. Adrián Hernández Esteris por compartirme sus conocimientos sobre el tema en su momento.

Al técnico Omar Rivera Arce por su apoyo en las actividades del laboratorio, por su amistad y compañerismo.

A todo el colegio de profesores del Departamento de Toxicología que han aportado su tiempo y conocimientos para mi formación.

A mis excompañeros y amigos de la generación 2019, Yuli, Juanpa, Marvin, Eliu, Diana, Majo y Jorge por su compañerismo y hermandad, que me ayudaron a seguir adelante durante mis momentos difíciles.

A mis compañeros de la generación 2020, Aylín, Yumara, Andrea, Erick, Eduardo, Pablo y Adrián, por acogerme como un miembro más del grupo.

A mi compañera y amiga de laboratorio Diana, que a causas del destino nos reincorporamos al mismo tiempo a la maestría, por la paciencia en compartirme sus conocimientos de química, resolverme dudas sobre temas de mi proyecto, por su amistad, palabras de ánimo durante los momentos difíciles y motivación cuando he querido rendirme.

A Yuli y a Rommel, por su apoyo en el aspecto académico y personal.

A la Lic. Lucina González de la Torre, una excelente secretaria académica, siempre tan eficiente y dedicada en su trabajo, por ser mi té de tila, ayudarme en todos los trámites administrativos y en algunas decisiones de la vida.

A los miembros del Departamento de Toxicología que han hecho mi estancia un periodo agradable, desde estudiantes, hasta auxiliares, técnicos, personal de limpieza y profesores.

A mi familia, que ha estado siempre presente como un soporte de mi vida, brindarme apoyo, amor y orientación en todos los ámbitos.

A mi hermano, por motivarme siempre a estudiar un posgrado, alentarme durante los momentos en los que he querido abandonar el reto.

A mi Totoro, por su apoyo, cariño y comprensión, estar siempre presente en el bien y en el mal, alentarme siempre a seguir adelante en todos los ámbitos de la vida.

## **Dedicatoria**

A LA ESENCIA ORIGINAL  
A LOS SERES VIVOS  
A LA VIDA

## Índice

	<b>Página</b>
<b>Agradecimientos</b> .....	I
<b>Dedicatoria</b> .....	III
<b>Lista de Figuras</b> .....	VII
<b>Lista de Tablas</b> .....	VIII
<b>Lista de abreviaturas</b> .....	IX
<b>Resumen</b> .....	XI
<b>Abstract</b> .....	XIII
<b>1. Introducción</b> .....	1
1.1. Temefos .....	2
1.1.1 Generalidades .....	2
1.1.2 Propiedades fisicoquímicas .....	2
1.1.3 Fuentes de exposición.....	2
1.1.4 Estabilidad del temefos en agua potable .....	3
1.1.5 Toxicocinética.....	4
1.1.5.1 Absorción .....	4
1.1.5.2 Distribución.....	4
1.1.5.3 Biotransformación .....	5
1.1.5.4 Eliminación .....	6
1.1.6 Toxicidad del temefos.....	8
1.1.6.1 Clasificación toxicológica.....	8
1.1.6.2 Toxicidad aguda .....	8
1.1.6.3 Toxicidad crónica .....	9
1.1.6.4 Otros efectos tóxicos .....	10
1.1.6.5 Mecanismo de toxicidad .....	12
1.2 Cinética plasmática y urinaria .....	13
1.2.1 Modelos cinéticos plasmáticos .....	13
1.2.2 Análisis de datos urinarios .....	14
1.3 Biomarcadores .....	15
1.3.1 Biomarcadores de exposición.....	15
1.3.1.1 Marcadores de exposición a plaguicidas organofosforados.....	16

1.4	Justificación .....	18
1.5	Hipótesis .....	19
1.6	Objetivos .....	19
1.6.1	Objetivo general.....	19
1.6.2	Objetivos particulares .....	19
<b>2.</b>	<b>Materiales y métodos .....</b>	<b>20</b>
2.1.	Origen de los reactivos .....	20
2.2.	Estrategia experimental .....	21
2.3.	Animales .....	22
2.3.1.	Tratamiento de los animales.....	22
2.4.	Ensayo enzimático con $\beta$ -glucuronidasa/sulfatasa .....	22
2.4.1.	Principio .....	22
2.4.2.	Soluciones para la reacción enzimática.....	22
2.4.3.	Procedimiento para el procesamiento de las muestras de orina .....	23
2.5.	Determinación de creatinina .....	23
2.5.1.	Principio .....	23
2.5.2.	Procedimiento .....	24
2.6.	Análisis del temefos y sus metabolitos por cromatografía de líquidos .....	24
2.6.1.	Principio .....	24
2.6.2.	Soluciones para las curvas de calibración .....	25
2.6.3.	Procedimiento .....	25
2.6.4	Curvas de calibración .....	26
2.6.5	Control de calidad .....	27
2.7	Parámetros toxicocinéticos y análisis estadísticos.....	28
<b>3.</b>	<b>Resultados .....</b>	<b>29</b>
3.1.	Optimización de las condiciones cromatográficas para la determinación del temefos y sus metabolitos en la orina .....	29
3.2.	Estandarización de las condiciones experimentales para la extracción de los metabolitos conjugados del temefos en la orina .....	32
3.3.	Patrón de excreción de los metabolitos del temefos en orina de ratas y parámetros toxicocinéticos.....	38
<b>4.</b>	<b>Discusión.....</b>	<b>43</b>

Optimización de las condiciones cromatográficas .....	44
Condiciones experimentales para la optimización del procesamiento de las muestras .....	46
Patrón de excreción urinaria de los metabolitos del temefos .....	49
Propuesta de un posible marcador de exposición al temefos .....	51
Mecanismos de acción asociados al temefos y sus metabolitos .....	53
<b>5. Conclusiones .....</b>	<b>56</b>
<b>6. Perspectivas.....</b>	<b>57</b>
<b>7. Referencias .....</b>	<b>58</b>



## Lista de Figuras

	<b>Página</b>
<b>Figura 1.</b> Propuesta de ruta de biotransformación del temefos en ratas .....	7
<b>Figura 2.</b> Estrategia experimental.....	21
<b>Figura 3.</b> Gráficas de calibración para temefos y sus metabolitos.....	26
<b>Figura 4.</b> Cromatogramas típicos de HPLC-DAD del temefos y sus metabolitos con el programa de disolventes descrito por Verdín-Betancourt y cols. (2019) .....	30
<b>Figura 5.</b> Cromatogramas típicos de HPLC-DAD de los metabolitos del temefos analizados mediante condiciones cromatográficas modificadas .....	31
<b>Figura 6.</b> Espectro UV del compuesto con $t_{ret}$ a los 8.4 min. ....	32
<b>Figura 7.</b> Efecto del pretratamiento con la SPE sobre los metabolitos extraíbles del temefos en orina.....	33
<b>Figura 8.</b> Efecto de la hidrólisis enzimática con $\beta$ -glucuronidasa/sulfatasa sobre la concentración de los metabolitos desconjugados del temefos.....	34
<b>Figura 9.</b> Efecto de la concentración de la enzima $\beta$ -glucuronidasa/sulfatasa sobre la hidrólisis de los metabolitos conjugados del temefos. ....	35
<b>Figura 10.</b> Efecto del pH del medio sobre la extracción líquido-líquido de los metabolitos desconjugados del temefos .....	36
<b>Figura 11.</b> Efecto de la polaridad de los disolventes sobre la eficiencia de extracción de los metabolitos desconjugados del temefos. ....	37
<b>Figura 12.</b> Cinética de excreción urinaria de los metabolitos del temefos después de una dosis oral única del temefos (300 mg/kg) .....	39
<b>Figura 13.</b> Gráficas semilogarítmicas de la velocidad de excreción ( $\Delta U/\Delta t$ ) Vs el tiempo de punto medio de los metabolitos del temefos excretados en orina. ....	40
<b>Figura 14.</b> Gráfica de excreción urinaria acumulada de los metabolitos del temefos. ....	41

## Lista de Tablas

	<b>Página</b>
<b>Tabla 1.</b> Clasificación de los plaguicidas basada en el valor de la Dosis Letal 50 (DL <sub>50</sub> ) de acuerdo con la OMS (WHO, 2020). .....	1
<b>Tabla 2.</b> Programa de fase móvil para la elución del temefos y sus metabolitos. ....	25
<b>Tabla 3.</b> LDD y LDC del temefos y sus metabolitos.....	27
<b>Tabla 4.</b> Porcentajes de exactitud (recuperación) y precisión de los metabolitos del temefos realizados con muestras de orina enriquecidas con estándares.....	28
<b>Tabla 5.</b> Parámetros toxicocinéticos en orina de los metabolitos del temefos. ....	42

## Lista de abreviaturas

AChE	Acetilcolinesterasa
ADI	Ingesta diaria admisible (acceptable daily intake)
AUC	Área bajo la curva
AUC <sub>0-∞</sub>	Área bajo la curva total
BPA	Bisfenol A
BuChE	Butirilcolinesterasa
CI <sub>50</sub>	Concentración inhibitoria 50
CI	Aclaramiento
CL <sub>50</sub>	Concentración letal 50
C <sub>máx</sub>	Concentración máxima
C <sub>máx-U</sub>	Concentración máxima excretada en orina
CYP	Citocromo P450
DAD	Detector de arreglo de diodos
DL <sub>50</sub>	Dosis letal 50
GLP	Buenas prácticas de laboratorio (Good Laboratory Practice)
HPLC	Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia (High Performance Liquid Chromatography)
K <sub>abs</sub>	Constante de absorción
K <sub>elim</sub>	Constante de eliminación
K <sub>elim-U</sub>	Constante de eliminación urinaria
LDC	Límite de cuantificación
LDD	Límite de detección
LOAEL	Nivel más bajo con efecto adverso observado (Lowest Observed Adverse Effect Level)
NOAEL	Nivel de efecto adverso no observable (No-Observed-Adverse-Effect Level)
OMS (WHO)	Organización Mundial de la Salud (World Health Organization)
OFT	Organofosforotioato
OF	Plaguicidas organofosforados
ppm	Partes por millón
SPE	Extracción en fase sólida (Solid-Phase Extraction)
t <sub>1/2 abs</sub>	Tiempo de vida media de absorción
t <sub>1/2 elim</sub>	Tiempo de vida media de eliminación
t <sub>1/2 elim-U</sub>	Tiempo de vida media de eliminación urinaria
t <sub>máx</sub>	Tiempo en alcanzar el pico máximo
t <sub>máx-U</sub>	Tiempo de excreción máxima en orina
t <sub>ret</sub>	Tiempo de retención
TDF	Tiodifenol
TDF-SO	Tiodifenol sulfóxido
TDF-SO <sub>2</sub> o BPS	Tiodifenol sulfona o bisfenol S
TDF-SO-MNI	Tiodifenol sulfóxido-metabolito endógeno no identificado
Tem	Temefos
Tem-SO	Temefos sulfóxido
Tem-oxón	Temefos oxón

Tem-oxón-SO	Temefos oxón sulfóxido
Tem-oxón-SO <sub>2</sub>	Temefos oxón sulfona
Tem-dox	Temefos dioxón
Tem-dox-SO	Temefos dioxón sulfóxido
Tem-dox-SO <sub>2</sub>	Temefos dioxón sulfona
Tem-OH	Temefos monohidrolizado
Tem-SO-OH	Temefos sulfóxido monohidrolizado
Tem-SO <sub>2</sub> -OH	Temefos sulfona monohidrolizado
Tem-oxón-OH	Temefos oxón monohidrolizado
Tem-oxón-SO-OH	Temefos oxón sulfóxido monohidrolizado
Tem-oxón-SO <sub>2</sub> -OH	Temefos oxón sulfona monohidrolizado
EPA	United States Environmental Protection Agency
V <sub>d</sub>	Volumen de distribución

## Resumen

El temefos es un plaguicida organofosforotioato ampliamente usado para el control de los vectores transmisores del dengue, Zika y chikungunya. La información sobre su toxicidad es todavía limitada y tampoco se ha determinado su exposición en humanos debido a la falta de un marcador de exposición. En los dos únicos estudios sobre la excreción de temefos en rata se detectaron al tiodifenol (TDF), tiodifenol sulfóxido (TDF-SO) y tiodifenol sulfona (TDF-SO<sub>2</sub>) como conjugados glucuronidados y sulfatados en orina y heces. Hasta la fecha no se ha determinado la cinética de excreción de los metabolitos del temefos en la orina. El objetivo de este estudio fue determinar la cinética de excreción urinaria de los metabolitos del temefos en ratas macho adultas con la finalidad de proponer un marcador de exposición. Para ello, se administraron ratas Wistar macho adultas con una sola dosis de temefos (300 mg/kg) emulsificado con solución salina por vía oral y la orina se recolectó a diferentes periodos de tiempo después de la administración. Después de haber optimizado las condiciones cromatográficas y las condiciones experimentales para el procesamiento de las muestras de orina, éstas fueron procesadas para su análisis por HPLC-DAD. Las muestras de orina se sometieron a hidrólisis enzimática con  $\beta$ -glucuronidasa/sulfatasa (2000 UI/mL) en solución amortiguadora de acetatos a pH 5 a 50 °C durante una hora. Los metabolitos desconjugados se extrajeron en dos etapas, primero con cloruro de metileno y después con éter. En los extractos de orina de las ratas tratadas se detectaron a los metabolitos TDF, TDF-SO, TDF-SO<sub>2</sub> y uno desconocido, el cual de acuerdo con su espectro UV puede corresponder al temefos sulfóxido monohidrolizado (Tem-SO-OH), y trazas de temefos. El TDF se detectó de forma conjugada prácticamente en su totalidad y los otros metabolitos de forma libre y conjugada. Con las nuevas condiciones cromatográficas establecidas se realizaron las gráficas de calibración y se calcularon los límites de detección y de cuantificación de cada analito. Los valores de recuperación de los metabolitos en muestras enriquecidas (2, 10 y 50  $\mu$ g/mL) fueron entre 74 y 120% y la precisión fue menor a 9%. La velocidad de excreción urinaria del TDF se ajustó a un modelo bifásico, mientras que el TDF-SO<sub>2</sub> y el Tem-SO-OH presentaron una sola fase de eliminación. Los  $t_{1/2 \text{ elim-U}}$  del TDF para la 1ra y 2da fase fueron de 27.8 y 272.1 h, respectivamente. Los  $t_{1/2 \text{ elim-U}}$  del TDF-SO<sub>2</sub> y del Tem-SO-OH fueron de 17.7 y 31.7 h, respectivamente. El TDF fue detectado fácilmente hasta 336 h después de la administración del temefos, y el TDF-SO<sub>2</sub> y el Tem-SO-OH sólo se detectaron hasta las 48 y 72 h, respectivamente. La  $C_{\text{máx}}$  del TDF fue  $366 \pm 115$  nmol/mg de creatinina a un  $t_{\text{máx}}$  de  $10 \pm 4$  h y un área bajo la curva (AUC) de  $297,540 \pm 76,013$  nmol-h/mg de creatinina. El AUC del Tem-SO-OH representó el 3.2% de lo observado para el TDF, un  $t_{\text{máx}}$  de  $7 \pm 4$  h y una  $C_{\text{máx}}$  de  $88 \pm 40$  nmol/mg de creatinina y para el TDF-SO<sub>2</sub>, el AUC representó sólo 0.82% del valor del TDF, un  $t_{\text{máx}}$  de  $9 \pm 6$  h y una  $C_{\text{máx}}$  de  $41 \pm 16$  nmol/mg de creatinina. Bajo las condiciones cromatográficas usadas en este estudio, la determinación del TDF-SO no fue confiable debido a que co-eluye con un compuesto endógeno presente en la orina de las ratas, el cual aumentó también con la hidrólisis enzimática para su desconjugación. En resumen, nuestros resultados sugieren que el temefos sufre un metabolismo exhaustivo hasta convertirse en los metabolitos desfosforilados finales, de los cuales, el TDF puede ser el mayoritario y usado como un biomarcador de exposición a este plaguicida, debido a su prolongada  $t_{1/2 \text{ elim-U}}$  y alta especificidad, además, se detecta varios días después de la exposición en una muestra de fácil acceso como la orina. Se

requieren de estudios futuros para confirmar la identidad del Tem-SO-OH y modificar las condiciones cromatográficas para determinar con exactitud al TDF-SO.

## Abstract

Temephos is an organophosphorus pesticide (OP) which has been widely used to control some vector-bourne diseases, such as dengue, Zika and chikungunya. The information about its toxicity is still limited, and there is no marker of exposure for its evaluation in humans yet. In the only two studies about temephos excretion in the rat authors detected thiodiphenol (TDP), thiodiphenol sulfoxide (TDP-SO) and thiodiphenol sulfone (TDP-SO<sub>2</sub>), which were excreted in urine and feces as glucuronide and sulfate conjugates. To date, the urinary excretion kinetics of temephos and its metabolites have not been determined yet. The aim of this study was to determine the urinary excretion kinetics of temephos metabolites in adult male rats and to propose a marker of exposure. Therefore, Wistar adult male rats were administered orally by a single dose of temephos (300 mg/kg) emulsified with saline solution. Urine samples were collected in different periods of time after administration. The samples were treated after the standardization of the experimental conditions for their treatment and the chromatographic conditions for their analysis by HPLC-DAD. The urine samples were subjected to enzymatic hydrolysis with  $\beta$ -glucuronidase/sulfatase (2,000 UI/mL) in acetate buffer solution pH 5.0 at 50 °C for one hour. The deconjugated metabolites were extracted in two stages, first with methylene chloride and then with ether. The metabolites detected in the urinary extracts of treated rats were TDP, TDP-SO, TDP-SO<sub>2</sub>, an unknown one which according to its UV spectrum, it could be monohydrolyzed temephos sulfoxide (Tem-SO-OH), and traces of parent compound. TDP was mainly detected in conjugated form, whereas the other metabolites were in un- and conjugated forms. Calibration graphs were made, and limits of detection and quantification were calculated for each analyte using the new chromatographical conditions. The recovery of each metabolite in spiked rat urine samples (2, 10 and 50  $\mu$ g/mL) were between 74 and 120%, and the precision was less than 9%. The urinary excretion rate of TDP was adjusted to a biphasic model, whereas the TDP-SO<sub>2</sub> and Tem-SO-OH to a monophasic model. The  $t_{1/2 \text{ elim}}$  of TDP were 27.8 and 272.1 h, respectively. And the  $t_{1/2 \text{ elim}}$  of TDP-SO<sub>2</sub> and Tem-SO-OH were 17.7 y 31.7 h, respectively. TDP could be easily detected until 336 h after temephos' administration, whereas TDP-SO<sub>2</sub> and Tem-SO-OH could only be detected until 48 and 72 h, respectively. The  $C_{\text{max}}$  of TDP was  $366 \pm 115$  nmol/mg of creatinine at a  $t_{\text{max}}$  of  $10 \pm 4$  h and the AUC was  $297,540 \pm 76,013$  nmol-h/mg of creatinine. The AUC of Tem-SO-OH represented 3.2% of that of TDP, having a  $t_{\text{max}}$  of  $7 \pm 4$  h and a  $C_{\text{max}}$  of  $88 \pm 40$  nmol/mg of creatinine. The AUC of TDP-SO<sub>2</sub> represented only 0.82% of that of TDP, a  $t_{\text{max}}$  of  $9 \pm 6$  h and a  $C_{\text{max}}$  of  $41 \pm 16$  nmol/mg of creatinine. The chromatographic conditions used in this study couldn't determinate TDP-SO with certainty, due to its coelution with an endogenous compound of the rats, which is also hydrolyzed enzymatically for its deconjugation. These results suggest that temephos can undergo an exhaustive metabolism until it reaches to the dephosphorylated final metabolites, from which, TDP could be used as a marker of exposure of temephos, due to its prolonged  $t_{1/2 \text{ elim}}$  and its specificity. Also, TDP could be detected easily few days after the exposure in an easy sample such as urine. Further studies are needed to confirm the identity of Tem-SO-OH and modify the chromatographic conditions to determine TDP-SO accurately.

## 1. Introducción

Un plaguicida es cualquier sustancia o mezcla de sustancias que se emplea para prevenir, destruir, repeler o mitigar alguna plaga, que incluyen a los vectores que transmiten enfermedades humanas y de animales; también es usado para regular el crecimiento de plantas, como defoliante o desecante, (EPA, 2021; COFEPRIS, 2022). Pueden ser clasificados por su origen (natural o sintético), por el blanco al que fue diseñado (insecticida, rodenticida, herbicida, fungicida, larvicida, entre otros), por su toxicidad aguda basado en la Organización Mundial de la Salud (OMS) (Tabla 1) o en la Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos (EPA, por sus siglas en inglés), por el mecanismo de acción (por ejemplo, la inhibición de la acetilcolinesterasa (AChE), bloqueo de canales de cloro, modulador de canales de sodio, entre otros) o por la estructura química (carbamatos, organofosforados (OF), organoclorados, piretroides y otros) (Costa, 2019), entre otros.

**Tabla 1.** Clasificación de los plaguicidas basada en el valor de la Dosis Letal 50 (DL<sub>50</sub>) de acuerdo con la OMS (WHO, 2020).

Clase	DL <sub>50</sub> en rata (mg/kg de peso corporal)	
	Oral	Dermal
Ia Extremadamente tóxico	<5	<50
Ib Altamente tóxico	5 – 50	50 – 200
II Moderadamente tóxico	50 – 2000	200 – 2000
III Ligeramente tóxico	> 2000	> 2000
U Poca probabilidad de un peligro agudo	≥ 5000	

Los OF son productos derivados del ácido fosfórico ampliamente usados para el control de diversas plagas en el mundo. Dentro de este grupo de compuestos incluyen algunos insecticidas como el metil paratión, malatión, diclorvos, diazinón, clorpirifos y temefos (IRAC, 2022). En este trabajo se enfocará en el insecticida temefos, siendo un larvicida ampliamente usado por varias décadas en México y otros países tropicales



para el control de algunos vectores transmisores de virus como el dengue. El temefos ha sido considerado como un plaguicida “seguro”, sin embargo, esta “seguridad” debe reevaluarse para los organismos no blanco.

## **1.1. Temefos**

### **1.1.1 Generalidades**

El temefos (fosforotioato de *O,O,O',O'*-tetrametil-*O,O'*-tio-bis-*p*-fenileno) es un insecticida del grupo de los organofosforotioatos (OFT) que se ha empleado durante más de 50 años como larvicida en campañas de salud pública en varios países del mundo, para controlar algunos vectores como la mosca negra y mosquitos (principalmente el *Aedes aegypti*), transmisores de enfermedades como el dengue, paludismo, Zika y chikungunya. Desde los años 1970, la OMS recomendó su uso en diferentes cuerpos de agua, incluyendo a la destinada para el consumo humano a una concentración que no exceda de 1 mg/L, concentración que no genera un cambio de sabor al agua ni produce efectos tóxicos a los seres humanos y otros mamíferos (Rozendaal, 1997; WHO, 2017). Desde entonces, en México se inició su uso en distintas presentaciones, incluyendo granulados al 1%, que es la más empleada en el área urbana en diferentes contenedores de agua, en concentrados emulsionables a distintas concentraciones y líquido grado técnico al 90%, entre otras (INECC, 2021).

### **1.1.2 Propiedades fisicoquímicas**

El temefos es un líquido espeso color marrón cuya fórmula molecular es  $C_{16}H_{20}O_6P_2S_3$ , con un peso molecular de 466.5 g/mol. Tiene una densidad relativa de 1.32 g/cm<sup>3</sup> a 25 °C, su punto de fusión es de 30.0 a 30.5 °C y su presión de vapor es de  $8 \times 10^{-6}$  Pa a 25 °C. Es soluble en disolventes orgánicos como dietiléter, acetonitrilo y en hidrocarburos aromáticos y clorados, es insoluble en metilciclohexano y hexano, posee una baja solubilidad en agua (0.03 mg/L) y un coeficiente de partición octanol-agua elevado de 4.91 a 25 °C, lo que le confiere un carácter lipofílico y bioacumulable (EPA, 2001; WHO, 2009; NCBI, 2021).

### **1.1.3 Fuentes de exposición**

La exposición al temefos puede darse de manera ocupacional, durante la mezcla, carga y aplicación del plaguicida, para-ocupacional o ambiental. En la población la

exposición puede ser directa a través del agua de bebida, por contacto con agua tratada que se usa para diversos usos domésticos o con las neblinas de fumigación (EPA, 2016; WHO, 2009; Satriawan y cols., 2019).

#### **1.1.4 Estabilidad del temefos en agua potable**

Estudios previos han indicado que los OF que tienen un doble enlace con azufre en el átomo central de fósforo generalmente forman oxones durante la desinfección química por compuestos clorados (Kamel y cols., 2009). Este proceso químico consiste en la sustitución de un átomo de azufre en el enlace P=S por un átomo de oxígeno transformándose a su compuesto oxonado (Magara y cols., 1994; Wu y Laird, 2003). Esta transformación es un tema de preocupación ya que una de las técnicas de desinfección en plantas de tratamiento de agua es la cloración, y se conoce que el producto oxonado es más tóxico que el compuesto padre, hasta 10, 100 ó 1,000 veces más. Dentro de los productos de oxidación de temefos se incluyen: temefos sulfóxido (Tem-SO), temefos oxón sulfóxido (Tem-oxón-SO), temefos dioxón sulfóxido (Tem-dox-SO) y temefos dioxón sulfona (Tem-dox-SO<sub>2</sub>). Se ha demostrado que la estabilidad de estos metabolitos en agua clorada es de por lo menos 72 h. El Tem-SO y el Tem-oxón-SO fueron detectados después de unos pocos minutos del tratamiento de cloración, a 24 h ya no fueron detectados. Sin embargo, estos productos oxidados fueron oxidados nuevamente a Tem-dox-SO y Tem-dox-SO<sub>2</sub>, los cuales fueron persistentes después de 72 h (Kamel y cols., 2009). La oxidación de temefos puede ocurrir no solamente en condiciones de cloración, en un estudio realizado en campos de cultivo de arroz, se encontró que la vida media ( $t_{1/2}$ ) del temefos en agua ambiental expuesta a la luz del sol, es de 6-8 h, y las rutas de degradación del temefos en cuerpos de agua naturales incluyen procesos de oxidación e isomerización (Lacorte y cols., 1996).

Lo anterior implica que después de la aplicación de temefos a cuerpos de agua, factores como el calor, la luz solar incluyendo rayos UV, este plaguicida se transforma en sus productos oxidados (por fotólisis), como temefos oxón (Tem-oxón) y Tem-SO.

### **1.1.5 Toxicocinética**

El primer estudio relacionado con la toxicocinética del temefos fue realizado por Blinn (1969) y posteriormente, Ferguson y cols. (1985), quienes obtuvieron resultados similares después de administrar en un vehículo oleoso una sola dosis del plaguicida por vía oral a ratas. Muy recientemente, en otro estudio empleando la misma dosis y vía, pero usando como vehículo solución salina, se obtuvieron los parámetros toxicocinéticos que se mencionarán en los siguientes apartados (Verdín-Betancourt y cols., 2021).

#### **1.1.5.1 Absorción**

El temefos es un compuesto con un coeficiente de partición elevado, lo que le permite atravesar membranas y ser absorbido más fácilmente. Por la vía dérmica en ratas, la absorción es de aproximadamente 38%, aunque se considera que este valor no es comparable con la absorción en los seres humanos (EPA, 2016).

En el estudio más reciente se observó que el temefos se absorbe rápidamente alcanzando la concentración máxima ( $C_{m\acute{a}x}$ ) en sangre de 10.4  $\mu\text{g/ml}$  a las 2 h (tiempo máximo,  $t_{m\acute{a}x}$ ). La constante de absorción ( $K_{abs}$ ) fue de 1.812/h y la vida media de absorción ( $t_{1/2\ abs}$ ) fue de 0.38 h (Verdín-Betancourt y cols., 2021). De acuerdo con el potencial de absorción del temefos (4.9), se sugiere que posiblemente se absorbe casi por completo en el tracto gastrointestinal de rata, ya que valores mayores a 1 indica una absorción casi completa. Esto difiere de lo reportado por Blinn (1969), quien calculó que la absorción del temefos es de aproximadamente 40% y una gran cantidad no absorbida es eliminada en las heces, lo que pudo ser debido a una recirculación enterohepática debido a su lipofilicidad y elevado peso molecular.

#### **1.1.5.2 Distribución**

El total de la concentración de temefos que alcanza la circulación sanguínea representada por el área bajo la curva (AUC) fue de 98  $\mu\text{g}\cdot\text{h/mL}$ , el volumen de distribución ( $V_d$ ) fue alto, de 38,215.0 mL, lo que sugiere que el compuesto tiene mayor afinidad hacia los tejidos extravasculares, y esto también se apoya por el aclaramiento (Cl) elevado de 3,072.7 mL/h (Verdín-Betancourt y cols., 2021). El temefos se distribuye eficientemente al hígado, riñones, cerebro, y en mayor proporción al tejido

adiposo, donde existe la afinidad más alta para su acumulación en comparación con los órganos anteriores, con un coeficiente de partición de 20, lo que indica que es el principal órgano involucrado en el CI del temefos. La acumulación en el tejido adiposo representa un riesgo debido a que después puede ser liberado gradualmente a la circulación y provocar efectos adversos (Blinn, 1969; Verdín-Betancourt y cols., 2021). Otro órgano en el que se ha cuantificado a temefos es la placenta (Vani y cols., 2018), lo que sugiere que durante la gestación existe una exposición de los embriones. Los resultados de Gaines y cols. (1967) apoyan este hallazgo, ya que las crías de madres expuestas al temefos, manifestaron inhibición de la AChE. Este comportamiento puede ser parecido al de otros OF, tal como lo describieron Whyatt y Barr (2001), quienes detectaron la presencia de OF y sus metabolitos en el meconio del postparto y en el contenido del intestino fetal, debido posiblemente a la absorción a través del cordón umbilical, difusión por la barrera placentaria y/o ingesta del líquido amniótico por el feto.

### 1.1.5.3 Biotransformación

Hasta el momento, sólo existen dos estudios en los que se han propuesto rutas de biotransformación del temefos, uno realizado *in vivo* en ratas y otro *in silico* en el que se predicen las rutas que podría ocurrir en seres humanos (Verdín-Betancourt y cols., 2021; Reyes-Chaparro y cols., 2020). Ambos estudios proponen rutas que se complementan, en el primero se reportó la formación de oxones, dioxones, productos mono- y dihidrolizados, así como otros metabolitos oxidados del temefos. Las reacciones del metabolismo de fase I propuestas son S-oxidación, desulfuración oxidativa y reacciones de hidrólisis, dando lugar a una gran variedad de metabolitos como se muestra en la Figura 1 (Verdín-Betancourt y cols., 2021). Como reacciones de fase II se han descrito los conjugados glucuronidados y sulfatados que se eliminan a través de la orina (Blinn, 1969; Shafik, 1970). Dentro de los metabolitos detectados en la sangre y los tejidos de rata se incluyen a los derivados oxidados (Tem-SO, Tem-oxón, Tem-dox-SO<sub>2</sub> y Tem-oxón-SO), los oxidados monodesfosforilados (temefos oxón sulfóxido monohidrolizado (Tem-oxón-SO-OH), temefos sulfona monohidrolizado (Tem-SO<sub>2</sub>-OH)) y los derivados fenólicos oxidados didesfosforilados (dihidrolizados) (tiodifenol (TDF), tiodifenol sulfóxido (TDF-SO) y tiodifenol sulfona (TDF-SO<sub>2</sub>), también

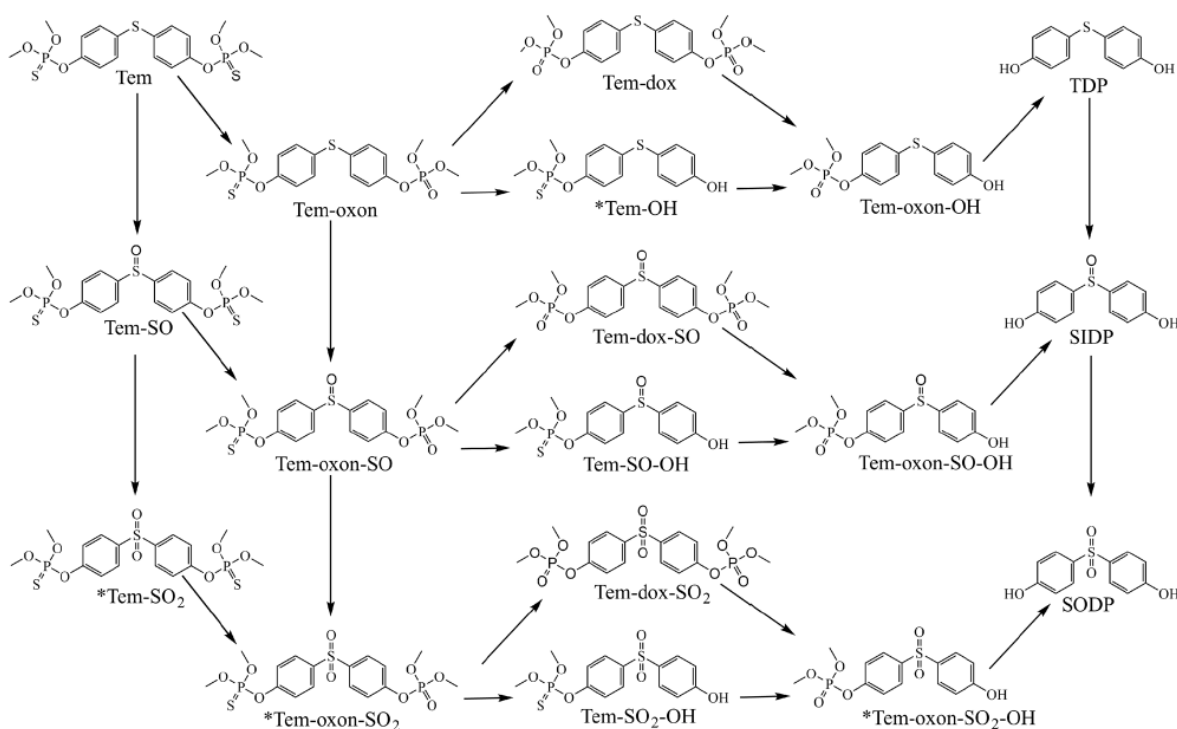
conocido como bisfenol S (BPS)). Cabe mencionar que éste es el primer estudio en el que se demostró la formación de oxones en organismos vivos, en estudios anteriores sólo se había detectado en muestras ambientales. Los metabolitos oxonados aún no han sido identificados en los seres humanos, esto podría estar relacionado también a que en seres humanos la reacción más probable de ocurrir, de acuerdo con el estudio *in silico* reportado por Reyes-Chaparro y cols. (2020), es la desfosforilación generando el TDF, y éste se oxida formando TDF-SO y TDF-SO<sub>2</sub>, en contraste la reacción menos probable es la desulfuración oxidativa que genera compuestos oxonados.

Hasta ahora no existe un marcador para evaluar la exposición a temefos en los seres humanos, sólo se encontró en el estudio *in vivo* que el metabolito Tem-SO<sub>2</sub>-OH es el más abundante, específico y estable en sangre y tejidos de ratas, por lo que fue propuesto como un posible biomarcador de exposición al temefos (Verdín-Betancourt y cols., 2021). Asimismo, la información sobre las enzimas involucradas en su biotransformación es muy limitada. En estudios preliminares se ha descrito que algunas isoformas del citocromo P450 (CYP) como el CYP2B1/2 y 3A1/2 tienen una participación importante en la formación de oxones y dioxones del temefos en la rata (Hernández-Esteris, 2020); el temefos también puede ser desfosforilado o desalquilado por algunas isoformas del CYP y el oxón podría ser hidrolizado por esterazas, como la paraoxonasa, para convertirse en productos “desactivados” (Buratti y cols., 2007).

#### **1.1.5.4 Eliminación**

La información sobre la eliminación del temefos es muy limitada. Los únicos reportes disponibles son los de Blinn (1969) y Shafik (1970). En el primero se reportó que el temefos se elimina en una proporción similar por medio de las heces y la orina. Se ha calculado la constante de eliminación ( $K_{elim}$ ) del temefos en sangre de 0.078/h y la vida media de eliminación ( $t_{1/2\ elim}$ ) entre 7 y 10 h (Blinn, 1969; Ferguson y cols., 1985; Verdín-Betancourt y cols., 2021). Una parte se elimina como el compuesto sin biotransformar y otra corresponde al Tem-SO y a los metabolitos fenólicos TDF, TDF-SO y TDF-SO<sub>2</sub> en forma de conjugados como derivados glucuronidados y sulfatados. Hasta la fecha no se ha determinado la presencia de otros metabolitos del temefos en la orina u otros medios de excreción, tampoco se ha descrito la cinética de excreción

urinaria del temefos ni la de sus metabolitos. Solamente en el estudio de Shafik (1970) se reportó una gráfica tradicional de la cinética de excreción del TDF en orina, el cual se detecta incluso hasta dos semanas después de una dosis diaria por tres días, pero no se incluyeron parámetros cinéticos, tampoco se describe a otros metabolitos que se excreten por esa vía, además de los tres metabolitos fenólicos finales. Esta carencia de información nos indica la necesidad de llevar a cabo estudios para identificar los metabolitos del temefos que se excretan por orina y su comportamiento temporal. La realización de estos estudios permitirá identificar un metabolito que pueda ser empleado como biomarcador de exposición en modelos animales y en poblaciones.



**Figura 1.** Propuesta de ruta de biotransformación del temefos en ratas. Abreviaturas: Tem: temefos; SO: sulfóxido; SO<sub>2</sub>: sulfona; dox: dioxón; -OH: monohidrolizado o monodesfosforilado; TDP: tiodifenol; SIDP: 4,4'-sulfonildifenol; SODP: 4,4'-sulfonildifenol. \*Metabolito no detectado en las muestras, que es sugerido con base a la formación consecutiva. Tomado de Verdín-Betancourt y cols. (2021).

## **1.1.6 Toxicidad del temefos**

### **1.1.6.1 Clasificación toxicológica**

Existe controversia en la clasificación toxicológica del temefos, por un lado, la OMS lo ha catalogado como ligeramente peligroso (nivel III) y su ingesta diaria admisible (ADI, por sus siglas en inglés) es de 0.023 mg/kg/d. El Efecto Adverso Observable (NOAEL, por sus siglas en inglés) es de 2.3 mg/kg/d, empleando un factor de incertidumbre de 100; esto basado en la aparición de signos clínicos de intoxicación, el Nivel Más Bajo con Efecto Adverso Observado (LOAEL, por sus siglas en inglés) es de 100 mg/kg/d hasta por 44 días. La toxicidad oral aguda es baja, con una DL<sub>50</sub> oral en ratas de 4,000-13,000 mg/kg (WHO, 2009, 2017, 2020). Por otro lado, la Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos (EPA, por sus siglas en inglés) lo ha clasificado como moderadamente tóxico (nivel II), siendo un tóxico sistémico que puede generar efectos adversos al ambiente, organismos acuáticos y a los seres humanos. Para la EPA, la DL<sub>50</sub> oral en ratas es de 444 mg/kg, la cual es más baja que la propuesta por la OMS (EPA, 2014), y estableció una ADI de 0.0054 mg/kg/d, menor a la determinada por la OMS, una NOAEL de 0.3 mg/kg/d, basada en la inhibición de la actividad enzimática de la AChE eritrocitaria de ratas de ambos sexos. En los ratones, la DL<sub>50</sub> es de 2,062 (hembras) y de 4,700 mg/kg (machos); las aves son las especies más sensibles, su DL<sub>50</sub> oral es de 183 a 500 mg/kg.

### **1.1.6.2 Toxicidad aguda**

El temefos tiene una toxicidad aguda moderada por las vías oral y dérmica y tiene toxicidad baja por la vía inhalatoria. Se ha observado que la intoxicación en animales tratados con una dosis elevada de temefos se manifiesta con signos típicos de inhibición de la AChE, incluyendo hipoactividad, dificultad para respirar, pelaje áspero, cromodacriorrea, salivación, espasmos musculares y temblores. Es ligeramente irritante para los ojos, pero no es irritante para la piel ni produce sensibilización dérmica (WHO, 2006; EPA, 2016). Cuando se expusieron conejos a temefos por vía dérmica, éstos presentaron una DL<sub>50</sub> de 2,000 a 2,378 mg/kg y se reportó hipoactividad, pérdida de peso, diarrea, postración y anorexia; después de la autopsia, se observó que la mayoría (70-80%) mostraron sangre en la cavidad abdominal, zonas hemorrágicas en intestinos y descoloración de los riñones (WHO, 2006). Sin embargo, de acuerdo con

la OMS, en los estudios anteriores no se cumplieron las buenas prácticas de laboratorio (GLP, por sus siglas en inglés), lo que reduce la confiabilidad de estos resultados. Por la vía inhalatoria, en un estudio que sí cumplió con las GLP, se concluyó que la toxicidad aguda fue baja con una concentración letal 50 (CL<sub>50</sub>) mayor a 4.79 mg/L en ratas, que fue la mayor concentración empleada en este estudio; se reportó aumento del peso corporal, pelaje erizado, hipersensibilidad y temblores ligeros, los cuales fueron más severos en machos que en hembras, y en las autopsias de los animales que murieron (30%) se observó una disminución del tamaño del bazo y hemorragia en el timo, pulmón y en el contorno de los riñones (WHO, 2006).

### **1.1.6.3 Toxicidad crónica**

El temefos es considerado no carcinogénico, el único reporte corresponde a un estudio crónico de 2 años en ratas, en el que se observó que la dosis más alta probada (15 mg/kg/d) no indujo la formación de tumores. Además, varios estudios *in vitro* de mutagenicidad también resultaron negativos en las pruebas, aunque fueron considerados inadecuados para evaluar el carácter genotóxico del temefos (EPA, 2016; WHO, 2006). Sin embargo, otros estudios han demostrado la capacidad genotóxica y mutagénica del temefos; uno de ellos fue realizado por Aiub y cols. (2002), en el cual hicieron tres pruebas (ensayo cometa, ensayo colorimétrico SOS/umu y prueba de Ames) incubando células sanguíneas de ratas Wistar macho de ocho semanas y las bacterias (*E. coli* para el ensayo SOS/umu y *S. typhimurium* para la prueba de Ames) con el temefos a distintas concentraciones, pero similares a las empleadas en las reservas de agua domiciliaria para combatir los vectores. Las tres pruebas resultaron positivas de manera concentración-dependiente para el ensayo cometa. Asimismo, Bezerra de Mélo y cols. (2008) también reportaron el efecto genotóxico del temefos al encontrar una relación dosis-dependiente en la presencia de micronúcleos en células de médula ósea de ratones tratados con temefos, por vía oral a diferentes dosis. Más recientemente, Benitez-Trinidad y cols. (2015) encontraron que el temefos a una concentración de 10  $\mu$ M (concentración equivalente a la empleada en campañas de erradicación del dengue) podría tener efectos citostáticos y apoptóticos. Observaron que el temefos no tiene potencial citotóxico o genotóxico en linfocitos humanos, pero sí tiene un efecto genotóxico en células HepG2, las cuales



poseen capacidad metabólica, lo que sugirió la importancia de la biotransformación del compuesto padre en relación con su genotoxicidad. Resultados genotóxicos también fueron obtenidos por Cobanoglu y Cayir (2020), quienes encontraron un aumento significativo en el intercambio de cromátidas hermanas cuando se exponen los linfocitos de sangre periférica humana a concentraciones de 50 y 75  $\mu\text{g/mL}$ , concluyendo que el temefos puede ser genotóxico. Aunque cabe mencionar que estas concentraciones que emplearon son mucho más altas que la recomendada por la OMS en el agua potable.

Además de la genotoxicidad, en el estudio de Vani y cols. (2018) se evaluó también la teratogenicidad en ratones hembra preñadas, administradas por vía oral con una dosis diaria de temefos de 0.0043 mg/kg/d (dosis que equivale a cuando uno ingiere 3 L de agua diaria que contiene 1 ppm de temefos) y de 0.043 mg/kg/d durante toda la gestación. Los resultados de este estudio indican un incremento significativo en la formación de micronúcleos a la dosis más alta y no se detectó toxicidad materna ni alteró el desarrollo embrio-fetal al evaluar los parámetros biométricos, el desempeño reproductivo, la circunferencia cefálica y malformaciones, entre otros. Por lo tanto, se considera que el temefos tiene un riesgo bajo de teratogenicidad y genotoxicidad.

#### **1.1.6.4 Otros efectos tóxicos**

Uno de los primeros efectos descritos del temefos fue la inhibición de la actividad de la AChE eritrocitaria en ratas (Ferguson y cols., 1985). Recientemente se ha estudiado este efecto sobre la actividad de la AChE eritrocitaria en humanos y se demostró que el compuesto padre no exhibe dicho efecto incluso a concentraciones mayores a 50  $\mu\text{M}$ . En cambio, sus metabolitos oxidados sí inhiben la AChE de manera dependiente del grado de oxidación, siendo el Tem-dox-SO<sub>2</sub> el metabolito más oxidado y el más potente inhibidor, con una concentración inhibitoria 50 (CI<sub>50</sub>) de 24.87 nM, la cual fue más baja en comparación con la del paraoxón, otro OF considerado como uno de los más tóxicos, con una CI<sub>50</sub> de 88.16 nM (Verdín-Betancourt y cols., 2019). Por otra parte, en un estudio realizado en humanos quienes se expusieron a temefos a las dosis de 256 mg/persona/d por 5 d (3.65 mg/kg/d) y a 64 mg/persona/d (0.91 mg/kg/d) por cuatro semanas, no se detectaron efectos de intoxicación ni se detectaron efectos en

la actividad de la AChE (Laws y cols., 1967). Esto sugiere que posiblemente dichas dosis no fueron suficientemente altas para desencadenar signos colinérgicos visibles.

Asimismo, también se ha evidenciado que el temefos inhibe 30% la actividad de la AChE eritrocitaria de las crías de ratas a los 21 días de edad, después de que sus progenitoras estuvieron expuestas a una dieta con temefos a 500 ppm (equivalente a 22.5 mg/kg/d) durante el cortejo, gestación, parto y lactancia, lo que demuestra un riesgo del temefos sobre la función reproductiva (Gaines y cols., 1967). En el mismo ámbito, recientemente también se ha observado en dos estudios que, el temefos produce efectos dañinos en la fertilidad masculina en ratones y ratas. Esto se observó al incubar espermatozoides de ratón con temefos a las concentraciones de 1, 10 y 100  $\mu\text{M}$  por 90 minutos, resultando en una disminución de la motilidad de los espermatozoides, con modificaciones en los niveles de ATP intracelular, la actividad de proteína cinasa A y la fosforilación en tirosina, así como también la tasa de fertilización y desarrollo embrionario temprano (Kim y cols., 2020). El otro estudio realizado en ratas expuestas a dosis repetidas del plaguicida (100 mg/kg/d por 5 y 7 días, equivalente a la LOAEL de la OMS), mostró una disminución significativa de la motilidad y viabilidad de los espermatozoides, un aumento en la oxidación de lípidos de manera tiempo dependiente, se redujo la capacidad de fertilización a los ovocitos, y los ovocitos fertilizados con los espermatozoides de ratas expuestas mostraron alteración en el desarrollo y morfología del embrión (Ramos-Flores y cols., 2021).

El temefos también ha mostrado generar daño hepático, como se observó en el estudio de Gaines y cols. (1967), en el cual conejos expuestos por vía oral a temefos a la dosis de 10 mg/kg/d por 30 d presentaron ligeros cambios en el hígado, mientras que un 1/3 de los conejos expuestos a 100 mg/kg/d por 5 d murieron y en varios animales causó necrosis focal o difusa en el hígado. Sin embargo, en este estudio no se mencionó si los cambios hepáticos fueron examinados histopatológicamente o fueron sólo por observación durante la autopsia. Por otro lado, en ratas macho tratadas con 2 y 350 ppm y hembras con 18 ppm de temefos se observó una disminución significativa en el peso del hígado en comparación con los controles (WHO, 2006). De igual manera, Ramos-Flores y cols. (2021) también reportaron una disminución del 11% del peso

relativo del hígado, así como una mortalidad del 41% de los animales luego 5 días de tratamiento.

Por último, recientemente también se ha demostrado que el temefos puede alterar el comportamiento e interacción social de las ratas después de estar expuestas *in útero*, ocasionando hiperactividad, comportamiento estereotipado y discapacidad social, lo que genera preocupación sobre el uso amplio de este insecticida aparentemente de toxicidad baja (Laurentino y cols., 2019). Todo lo anteriormente descrito sugiere que es necesario replantear el uso extensivo del temefos, ya que no parece ser tan inofensivo para los mamíferos como lo ha planteado la OMS.

#### **1.1.6.5 Mecanismo de toxicidad**

Los OF actúan inhibiendo principalmente la actividad de la AChE mediante la unión del grupo fosfato al grupo -OH de la serina del sitio catalítico de la enzima, evitando la hidrólisis de la acetilcolina, lo que genera su acumulación en los espacios sinápticos neuromusculares. Esto provoca una sobre estimulación de los receptores colinérgicos de tipo muscarínico y nicotínico, debido a que estos receptores se encuentran distribuidos ampliamente en el organismo, lo anterior resulta en un síndrome colinérgico (Gallo y Lawrk, 1991; Costa, 2019). En el caso del temefos, la inhibición de la actividad de la AChE podría ser atribuida a un efecto aditivo inhibitorio de varios de los metabolitos oxidados generados durante su biotransformación, teniendo como base lo observado en el estudio *in vitro*, en el cual se evaluó el potencial inhibitorio de todos ellos (Verdín-Betancourt, 2020).

Otros dos metabolitos del temefos que pueden producir efectos tóxicos son el TDF-SO<sub>2</sub> o BPS y el TDF. El primero es un sustituto del bisfenol A (BPA) que se emplea comúnmente en el papel termosensible para recibos y en los plásticos. El BPA es un disruptor endócrino de reconocida capacidad estrogénica. El BPS por su semejanza química al BPA puede también provocar daños a nivel hormonal ya que también actúa como un disruptor endócrino (Sogorb y cols., 2019). En el caso del TDF, se ha encontrado que posee una actividad estrogénica aún más potentes que el BPA, incluso hasta diez veces más, sin embargo, aún no existen muchos estudios sobre este compuesto (Yamada y cols., 2010).

## 1.2 Cinética plasmática y urinaria

### 1.2.1 Modelos cinéticos plasmáticos

Los modelos compartimentales clásicos se basan en datos, midiendo la concentración de un xenobiótico en plasma o sangre a lo largo del tiempo y con base en esos datos se determina el número de compartimentos, en uno o hasta tres, dependiendo del comportamiento final de la curva. En un modelo de un compartimento (mono compartimental), se trata de un compartimento central donde se incluye a los órganos y tejidos que son perfundidos rápidamente (sangre, bazo, corazón, cerebro, riñones, hígado, etc.), y describe el cuerpo como una unidad homogénea. El segundo y tercer compartimento son el periférico y el profundo, respectivamente. Ambos incluyen los tejidos con baja perfusión sanguínea (músculos, tejido adiposo y piel). Estos requieren un periodo de tiempo para alcanzar un equilibrio de distribución con la concentración que hay en la sangre o plasma.

El grado de absorción de un compuesto se determina mediante el área bajo la curva (AUC), que representa la fracción de la dosis que logró ser absorbida hasta la circulación sistémica (llamado también biodisponibilidad) (Krishnan, 2019). Después de que el compuesto llega a la sangre, se distribuye a los tejidos extravasculares de acuerdo con sus propiedades fisicoquímicas, y uno de los parámetros que se miden es el volumen de distribución aparente que permanece constante en un modelo monocompartimental e incrementa en los modelos bi- y tri- compartimentales (Filser, 2021; Krishnan, 2019). En estos modelos se incluyen parámetros como la constante de absorción extravascular ( $K_a$ ) hacia el compartimento central, constante de eliminación ( $K_{elim}$ ) desde el compartimento central y  $K_{12}$  y  $K_{21}$  que son los constantes de primer orden para la distribución de un compuesto hacia y desde el compartimento periférico en un modelo bicompartimental (Krishnan, 2019). En los modelos bicompartimentales, se emplea la constante  $\alpha$  y la  $\beta$  como representación de las fases de absorción-distribución y eliminación, respectivamente; en la primera, la concentración plasmática del xenobiótico disminuye más rápido que en la segunda fase.

La eliminación abarca los procesos de biotransformación, la exhalación y la excreción, y se puede calcular una  $K_{elim}$  a partir de la pendiente de la curva del logaritmo de la concentración plasmática contra el tiempo, tiene al igual que el coeficiente  $\beta$  unidades de tiempo recíprocas y son dosis-independientes (Krishnan, 2019). A partir de la  $K_{elim}$  se puede calcular la vida media de eliminación ( $t_{1/2\ elim}$ ), que es el tiempo que se requiere para que la concentración de un compuesto en plasma disminuya a la mitad, y este depende del volumen de distribución y del aclaramiento (velocidad de eliminación de un compuesto) (Krishnan, 2019).

### 1.2.2 Análisis de datos urinarios

Un xenobiótico después de alcanzar a la circulación sistémica puede ser eliminado por vía urinaria directamente como un compuesto sin biotransformar o como un metabolito (Bourne, 2014). En la práctica, después de que se expone un individuo a un xenobiótico, se pueden coleccionar las muestras de orina por intervalos de tiempo durante un periodo, y posteriormente cuantificar la concentración del xenobiótico no biotransformado o sus metabolitos en dichas muestras. Con los datos crudos de las concentraciones obtenidas, se puede calcular la velocidad de excreción ( $\Delta U/\Delta t$ ) de cada uno de los compuestos excretados. La  $\Delta U$  indica la cantidad excretada durante una variación en el tiempo ( $\Delta t$ ). Debido a que las muestras se coleccionan después de un intervalo de tiempo, esta unidad se requiere transformar a un punto medio del intervalo (tiempo de punto medio). Al graficar el logaritmo de  $\Delta U/\Delta t$  *versus* el tiempo de punto medio se obtiene la pendiente correspondiente a la  $K_{elim-U}$  (Bourne, 2014). A partir de esta  $K_{elim-U}$  se puede calcular el  $t_{1/2\ elim-U}$  del compuesto en la orina mediante la ecuación:

$$t_{\frac{1}{2}elim-U} = \frac{\ln 2}{K_{elim}}$$

Por otro lado, con los datos de  $\Delta U$  se puede generar una gráfica de excreción acumulativa, después de realizar la suma de cada concentración a través del tiempo, obteniendo así la cantidad acumulada del compuesto excretado hasta un tiempo en específico (U). Para obtener la gráfica de excreción acumulativa se grafica la  $\Delta U$  *versus* el tiempo de punto medio la que permite calcular el AUC de cada uno de los

compuestos excretados en orina, y visualizar de manera más fácil el tiempo máximo de detección de cada uno de los compuestos (Bourne, 2014).

### **1.3 Biomarcadores**

Los biomarcadores son una característica definida que es medida como un indicador de un proceso biológico normal, patogénico o respuestas ante una exposición o intervención (FDA, 2021). La medición de estos biomarcadores puede reflejar el curso temporal de una lesión o exposición y proveer información sobre mecanismos de toxicidad (Gupta, 2019). Son empleados para el biomonitoreo, desde el monitoreo de la exposición hasta el monitoreo de riesgos, manejo y regulaciones (Ganzleben y cols., 2017). Pueden clasificarse en: de exposición, efecto y susceptibilidad (Alegría-Torres, 2022). Los primeros incluyen sustancias exógenas o su metabolito, o producto de interacción entre un agente xenobiótico y un blanco interno que es medido en un compartimento del organismo; el segundo se refiere a una alteración a nivel bioquímico, fisiológico, de comportamiento u otro, que se puede medir y dependiendo de la magnitud, asociarlo con un daño a la salud o enfermedad; el tercero, se refiere a un indicador de la capacidad de un organismo de responder ante el estímulo de la exposición a algún xenobiótico en específico (WHO, 1993). En este apartado se tratará sobre los biomarcadores de exposición.

#### **1.3.1 Biomarcadores de exposición**

Para conocer si un individuo ha estado expuesto a una sustancia, se requiere de biomarcadores, como se ha mencionado anteriormente, son indicadores o características biológicas, físicas o químicas que pueden ser medidas de manera objetiva y que reflejan la exposición o interacción entre el individuo y un xenobiótico (WHO, 1993; Gupta, 2019; Alegría Torres, 2022). Pueden aportar evidencias cuantitativas y cualitativas de la exposición a xenobióticos; en el caso de los plaguicidas, puede ser a través de la examinación de muestras de tejidos humanos y animales, fluidos y heces para llevar a cabo la medición y el monitoreo de dichos indicadores (Gupta y cols., 2019).

Debido a que la exposición a las sustancias como plaguicidas puede ser de manera ocupacional, para-ocupacional y ambiental, existe riesgo de desarrollar alteraciones

fisiológicas (dependiendo del grado de exposición), por lo que es necesario un biomarcador para la medición y monitoreo de la magnitud de exposición a dichos xenobióticos y poder monitorear sus efectos (Aprea, 2012; Gupta, 2019). Para que un compuesto pueda ser considerado como un biomarcador de exposición, idealmente debe cumplir con ciertas características tales como: el compuesto debe ser fácilmente medible y económico, debe ser sensible a las técnicas analíticas, producir resultados rápidos, obtenido de fuentes accesibles, el metabolito debe ser específico del compuesto estudiado, y en la matriz de orina el metabolito debe ser preferentemente el mayoritario, los niveles de excreción del metabolito debe ser más alto que los niveles basales, el metabolito debe ser detectable mínimo tres vidas medias después de la exposición (Aprea, 2012; Angerer y cols., 2007; Gupta, 2019).

#### **1.3.1.1. Marcadores de exposición a plaguicidas organofosforados**

Los marcadores de exposición a OF incluyen la determinación del residuo del compuesto padre y/o sus metabolitos, y células o moléculas modificadas en tejidos y fluidos biológicos (Gupta y cols., 2019). Estos podrían ser determinados por métodos cromatográficos, espectrofotométricos y otros ensayos empleando muestras biológicas y pueden llegar a detectar concentraciones en ppm o ppb (Gupta y cols., 2019). Debido a que estos compuestos pueden ser biotransformados en los sistemas biológicos, es más probable que se detecten los metabolitos en una proporción mayor con respecto al compuesto padre, tal como el caso del temefos (Gupta y cols., 2019; Verdín-Betancourt y cols., 2021).

Para los OF se han identificado marcadores de exposición cuantificados en muestras de orina, refiriéndose a los seis metabolitos dialquilfosfatos (DAF), entre los que se incluyen los metabolitos dimetilfosfato (DMF) y dietilfosfato (DEF) (Gupta y cols., 2019). Sin embargo, esos metabolitos no son específicos. En el caso del clorpirifos se ha encontrado el metabolito 3,5,6-tricloro-2-piridinol (3,5,6-TCP) en orina y ha sido empleado como un marcador de exposición específico a este plaguicida en estudios poblacionales, correlacionando con el grado de inhibición de las esterasas butirilcolinesterasa (BuChE) plasmática y AChE eritrocitaria en trabajadores expuestos a clorpirifos (Barr y cols., 2005; Farahat y cols., 2011).

En el caso del temefos, hay un solo estudio realizado en dos ratas hembra SD en el que se les administró por vía oral una dosis diaria del plaguicida por tres días consecutivos (9.6 mg para las dos ratas que pesaban 242 y 238 g), disuelto en aceite de cacahuate. En este estudio se observó que el TDF pudo ser detectado y cuantificado en cantidades de  $\mu\text{g/d}$  aún incluso después de dos semanas después de la última administración (Shafik, 1970). Esto sugirió que el temefos y sus metabolitos pueden ser almacenados en los tejidos de las ratas e ir liberándose paulatinamente para ser metabolizados hasta formar el metabolito final, TDF, el cual fue detectado en la orina aún después de un tiempo considerable y ser el metabolito mayoritario. Aunque en este estudio se propuso al TDF como un biomarcador, aún se desconoce la cinética de excreción urinaria de los metabolitos del temefos, ya que la colección de las muestras se realizó en periodos de 24 h. Además, las condiciones experimentales para el procesamiento de muestras de orina tanto de Shafik (1970) como de Blinn (1969), mencionado previamente en apartados anteriores, fueron extremas empleando ácidos y bases fuertes y temperaturas elevadas para las hidrólisis, lo que pudo conducir a la desfosforilación de los metabolitos, el número de animales empleados no fue adecuado y las condiciones analíticas para la determinación de los metabolitos no cumplieron con las GLP. Por lo que se requiere de más estudios con métodos analíticos más adecuados y precisos para la determinación de la cinética de excreción urinaria antes mencionada.



#### **1.4 Justificación**

El temefos es un larvicida OF ampliamente usado para el control de los vectores transmisores de los virus del dengue, Zika y chikungunya. Se considera de baja toxicidad, sin embargo, hay cierta controversia entre la OMS y la EPA sobre la clasificación toxicológica. El principal efecto que se le ha atribuido es la inhibición de la AChE, sin embargo, más recientemente se han documentado otros efectos como la genotoxicidad, efectos sobre la función reproductiva masculina, función hepática, desarrollo embrionario y alteraciones neuroconductuales por exposición intrauterina, entre otros. A pesar de su amplio uso por más de 50 años, la información sobre su toxicocinética y toxicodinamia es todavía escasa. El temefos se absorbe fácilmente, se distribuye a prácticamente todos los órganos y tejidos, mostrando una acumulación preferencial en el tejido adiposo, se biotransforma eficientemente y ampliamente al menos a once metabolitos por medio de reacciones de fase I generando metabolitos oxidados como oxones, dioxones, sulfóxidos, sulfonas y productos mono- y di-desfosforilados, los cuales pueden ser sustratos para el metabolismo de fase II. No se conoce con precisión cuáles son los productos de excreción del temefos, aunque se ha descrito la presencia de derivados glucuronidados y sulfatados de los metabolitos fenólicos del temefos en la orina y las heces de ratas tratadas. Tampoco se ha determinado la magnitud de la exposición al temefos de la población en general, debido a que no se cuenta con un biomarcador de exposición para su evaluación, lo que dificulta la extrapolación toxicológica de modelos animales a los seres humanos. Todo lo anterior indica la necesidad de realizar estudios para la caracterización toxicológica del temefos, así como también determinar la cinética de la excreción urinaria de sus metabolitos, lo que permitirá proponer un biomarcador de exposición, con particular interés en su aplicación poblacional.

## **1.5 Hipótesis**

El temefos se metaboliza ampliamente en la rata y varios de sus metabolitos desfosforilados se eliminan en la orina, de los que se obtendrá una propuesta de biomarcador de exposición.

## **1.6 Objetivos**

### **1.6.1 Objetivo general**

Determinar la cinética de excreción urinaria del temefos y sus metabolitos en ratas macho adultas tratadas con una sola dosis oral del plaguicida.

### **1.6.2 Objetivos particulares**

- Establecer las condiciones experimentales para el procesamiento de las muestras de orina para determinar los metabolitos excretados de temefos.
- Identificar y determinar los metabolitos del temefos que se excretan en la orina por HPLC-DAD.
- Calcular los parámetros toxicocinéticos del temefos y sus metabolitos excretados en la orina.
- Proponer un biomarcador de exposición al temefos.

## 2. Materiales y métodos

### 2.1. Origen de los reactivos

El temefos se purificó (>97%) a partir del producto comercial T.M. FOS® 500 CE, grado comercial 50% (Agromundo, S.A. de C.V., Ciudad de México, México).

Los estándares de temefos (95.6% de pureza, lote #SZBD207XV), 4,4'-tiodifenol (TDF) (99% de pureza, lote #MKBK8728V) y sulfonildifenol (TDF-SO<sub>2</sub>) (98% de pureza, lote #MKBV2777V), y el extracto de *Helix pomatia* (enzima β-glucuronidasa/sulfatasa) fueron obtenidos de Sigma Aldrich (Saint Louis, MO, EUA).

El kit para la determinación de creatinina se obtuvo de Randox (Crumlin, UK).

El metanol, acetonitrilo, agua grado HPLC y cloruro de metileno fueron obtenidos de Fermont (Monterrey, N.L., México).

El éter dietílico fue obtenido de Fisher Scientific (Nueva Jersey, EUA).

El ácido acético glacial se obtuvo de J.T. Baker (Xalostoc, Edo. de México, México).

El acetato de sodio fue obtenido de Merck-México, S.A. (Naucalpan de Juárez, Edo. de México, México).

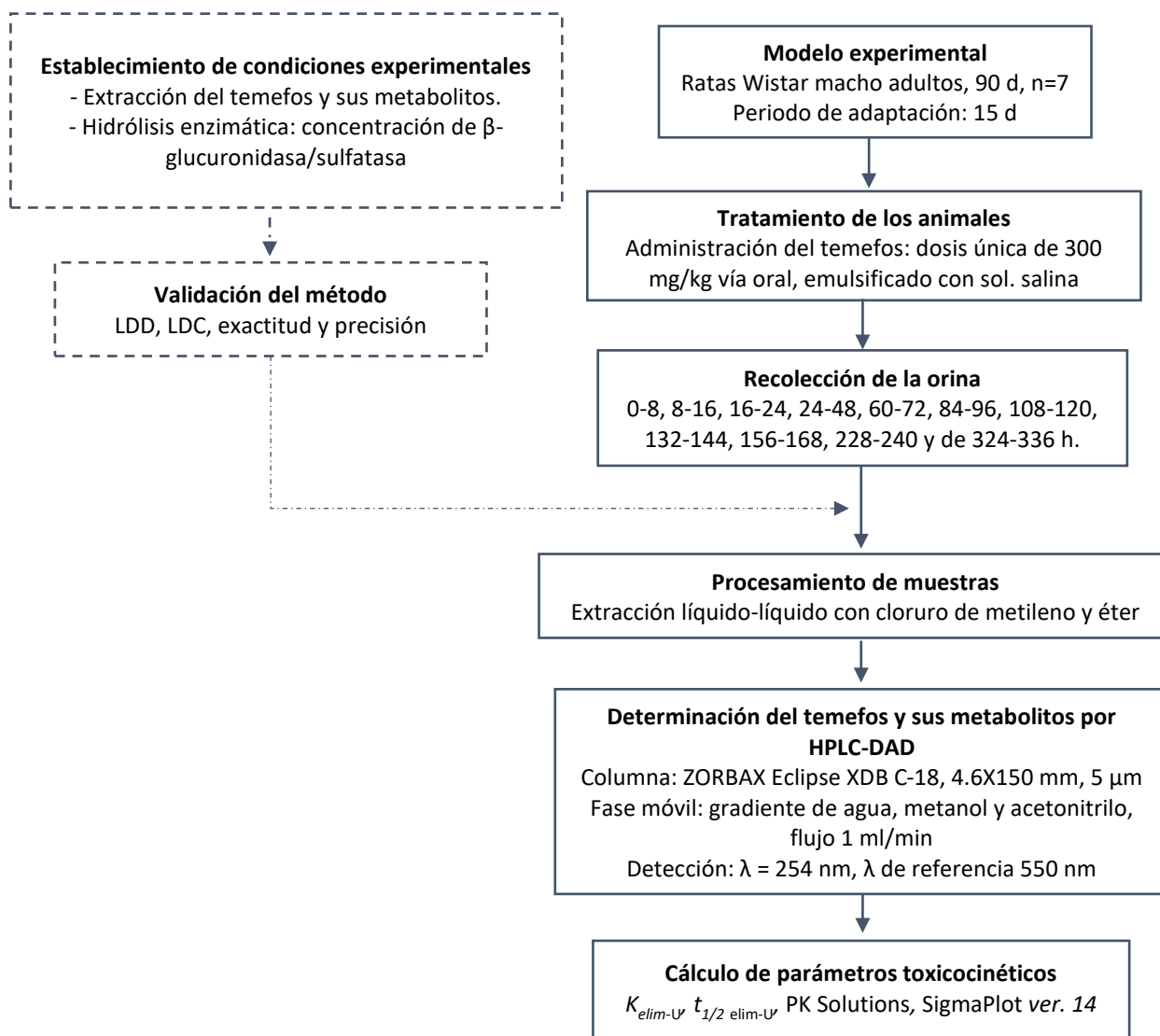
El agua Milli-Q (Resistencia 18.2 Ω) se obtuvo de un equipo Milli-Q (Millipore de México, Ciudad de México, México).

El sulfato de sodio anhidro granular fue obtenido de Merck (Darmstadt, Alemania).

Los cartuchos para la extracción en fase sólida fueron Bond Elut Plexa Polymer de 200 mg, 3 mL, de Agilent Technologies Inc. (EUA).

## 2.2. Estrategia experimental

El desarrollo de este estudio se describe en la Figura 2, inicialmente se establecieron las condiciones experimentales para la determinación del temefos y sus metabolitos en orina.



**Figura 2.** Estrategia experimental. Abreviaturas: LDD: límite de detección; LDC: límite de cuantificación;  $K_{elim-U}$  constante de eliminación urinaria;  $t_{1/2 elim-U}$ : vida media de eliminación urinaria.

### **2.3. Animales**

Se utilizaron ratas Wistar macho adultas de 90 días de edad obtenidas de la Unidad de Producción y Experimentación de Animales de Laboratorio (UPEAL, Cinvestav-IPN). Los animales tuvieron libre acceso a alimento y agua, se mantuvieron en un ambiente con ciclo de luz oscuridad de 12:12 h, una humedad relativa de  $50 \pm 10\%$ , a una temperatura ambiental de  $21 \pm 1$  °C, todo esto de acuerdo con la norma oficial mexicana NOM-ZOO-062-1999.

#### **2.3.1. Tratamiento de los animales**

Los animales tuvieron dos periodos de adaptación, el primero fuera del bioterio de 7 días y en el segundo se mantuvieron individualmente en jaulas metabólicas de acrílico diseñadas para la recolección de orina y heces por separado en ciclos de 12 h durante 8 días previos al tratamiento. Se les administró una sola dosis de temefos de 300 mg/kg emulsificado con solución salina (NaCl 0.9%) por vía oral con sonda gástrica. Después de la administración, se colectó la orina en los periodos de 0-8, 8-16, 16-24, 24-48, 60-72, 84-96, 108-120, 132-144, 156-168, 228-240 y de 324-336 h.

### **2.4. Ensayo enzimático con $\beta$ -glucuronidasa/sulfatasa**

#### **2.4.1. Principio**

La conjugación de compuestos con el ácido glucurónico y el sulfonato es un proceso involucrado en la biotransformación de fase II, ambos aumentan la hidrofiliidad de los productos generados por el metabolismo de fase I, facilitando así la eliminación de éstos por la vía urinaria. Se ha demostrado que la eliminación de metabolitos hidrolizados del temefos en orina son conjugados mayormente con el ácido glucurónico y con el sulfonato (Blinn, 1969). En este sentido, la  $\beta$ -glucuronidasa y la sulfatasa son enzimas que actúan hidrolizando a los derivados glucuronidados y los ésteres de sulfato, respectivamente, para liberar el metabolito previo a la conjugación, permitiendo así la preparación de las muestras previo al análisis por técnicas analíticas específicas como la cromatografía de líquidos.

#### **2.4.2. Soluciones para la reacción enzimática**

A. Solución de ácido acético 0.5 M: se emplearon 7.5 mL de ácido acético glacial y se llevó a un volumen final de 250 mL con agua Milli-Q.

B. Solución de acetato de sodio 0.5 M: se pesaron 17.04 g de acetato de sodio, se disolvieron y se llevaron a un volumen final de 250 mL con agua Milli-Q.

C. Solución amortiguadora de acetatos 0.5 M pH 5.0: se mezclaron 74 mL de la solución de ácido acético 0.5 M (solución A) y 176 mL de acetato de sodio 0.5 M (solución B), se aforó esta mezcla a un volumen final de 500 mL añadiendo agua Milli-Q, y el pH se ajustó con la adición de solución A o B.

### **2.4.3. Procedimiento para el procesamiento de las muestras de orina**

Los metabolitos de los extractos fueron desconjugados enzimáticamente, basándose en el método establecido por Cruz-Hurtado y cols. (2018), con algunas modificaciones. Para ello, en 1 mL de la solución amortiguadora de acetatos 0.5 M a pH 5 (solución C), se agregaron 200  $\mu$ L de orina de rata no tratada o tratada y 2,000 UI/mL de enzima  $\beta$ -glucuronidasa/sulfatasa, la mezcla se agitó vigorosamente por un minuto, y se incubó en un baño de agua por una hora a 50°C. La reacción se detuvo con la adición de 10 mL de cloruro de metileno y se dejó enfriar a temperatura ambiente. La mezcla se agitó vigorosamente durante 1 minuto, luego se centrifugó a 1600 x g por 15 minutos a 25°C, la fase orgánica se colectó y al precipitado se le hizo la misma extracción con éter dietílico en las mismas condiciones. Se juntaron las 2 fases orgánicas, la mezcla se secó empleando sulfato de sodio anhidro y luego se evaporó bajo una corriente de nitrógeno en una campana de extracción. El residuo de los extractos se conservó a -20 °C hasta el momento de su análisis por HPLC-DAD, previa disolución en acetonitrilo.

## **2.5. Determinación de creatinina**

### **2.5.1. Principio**

La creatinina es un producto de desecho de la degradación de la creatina (compuesto nitrogenado encargado de transportar energía a las miofibrillas musculares). Se genera naturalmente durante el metabolismo de los músculos de manera constante dependiendo de la masa muscular del organismo, es filtrado por los riñones y es excretada en la orina. La medición de la creatinina en orina puede ser usada como un factor de corrección de la concentración de la orina, la cual varía a lo largo del día,

excretando agua a diferente cantidad junto con otros productos de desecho. El ensayo de la creatinina se basa en el método de Jaffé, en el cual la creatinina reacciona con el picrato en un medio alcalino formando un complejo de color rojizo que se mide a una longitud de onda de 750 nm (Butler, 1975).

### **2.5.2. Procedimiento**

La concentración de creatinina en las muestras de orina se determinó por medio del kit comercial CR510 (Randox). En el kit se cuenta con el reactivo A (ácido pícrico, 35 mmol/L), el reactivo B (hidróxido de sodio, 0.32 mol/L) y un reactivo de calibración (creatinina, 1.99 mg/dL). Para preparar la solución de trabajo se mezclaron los reactivos A y B 1:1 (v/v). La solución blanco o control consistió en 500 µL de agua Milli-Q. El reactivo de calibración se preparó al mezclar 50 µl de la solución patrón con 450 µl de reactivo de trabajo y se midió la absorbancia en el espectrofotómetro automatizado Microlab 300. Se diluyó el estándar interno concentrado de creatinina (76.2 mg/dL) 1:50 con agua Milli-Q, se tomaron 50 µL de dicha dilución y se mezcló con 450 µL de la solución de trabajo, se agitó por 30 segundos y se midió la absorbancia. Las muestras de orina también fueron procesadas de la misma manera que el estándar interno. Las lecturas fueron realizadas por duplicado y los resultados se obtuvieron en mg/dL.

## **2.6. Análisis del temefos y sus metabolitos por cromatografía de líquidos**

### **2.6.1. Principio**

La cromatografía de líquidos es una técnica de separación, identificación y determinación de los componentes químicos de mezclas complejas empleando una fase móvil líquida y una fase estacionaria. Se basa en las diferencias de las velocidades de migración entre los componentes de la fase móvil al interactuar con distintas afinidades con la fase estacionaria contenida dentro de una columna. En este estudio se empleó la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC, por sus siglas en inglés) en fase reversa, empleando una columna de fase estacionaria apolar con moléculas C18 y una fase móvil polar, permitiendo eluir más rápido los compuestos más polares a través de la columna y más lento los apolares al aplicar una presión y un flujo determinado (Skoog y cols., 2014).

### 2.6.2. Soluciones para las curvas de calibración

Se preparó una solución inicial de mezcla de estándares a una concentración de 1 mg/mL incluyendo a los metabolitos TDF, TDF-SO, TDF-SO<sub>2</sub> y al temefos, se disolvió en metanol y a partir de esta solución se diluyó 1:10 con acetonitrilo para obtener una solución de 0.1 mg/mL la cual se diluyó de nuevo 1:10 para obtener una solución de 0.01 mg/mL. Las mismas diluciones a partir de la solución de 1 mg/mL se realizaron también en orina de rata no tratada.

### 2.6.3. Procedimiento

Los extractos urinarios desconjugados se inyectaron a un HPLC-DAD (HP 1200, Agilent Technologies). Se empleó una columna ZORBAX Eclipse XDB C-18 de 4.6 x 150 mm con un tamaño de partícula de 5 µm (Agilent Technologies, Deerfield, IL, EUA). La fase móvil consistió en una mezcla de metanol (A), acetonitrilo (B) y agua (C), con un flujo de 1 mL/minuto a temperatura ambiente. El programa para la separación de los compuestos de las muestras de orina se muestra en la Tabla 2.

**Tabla 2.** Programa de fase móvil para la elución del temefos y sus metabolitos.

Tiempo (min)	Metanol (%)	Acetonitrilo (%)	Agua (%)
0	27	8	65
2.5	23.5	12.5	64
3.5	23.5	12.5	64
6	18	18	64
10	20	30	50
12	20	30	50
15	70	25	5
18	27	8	65

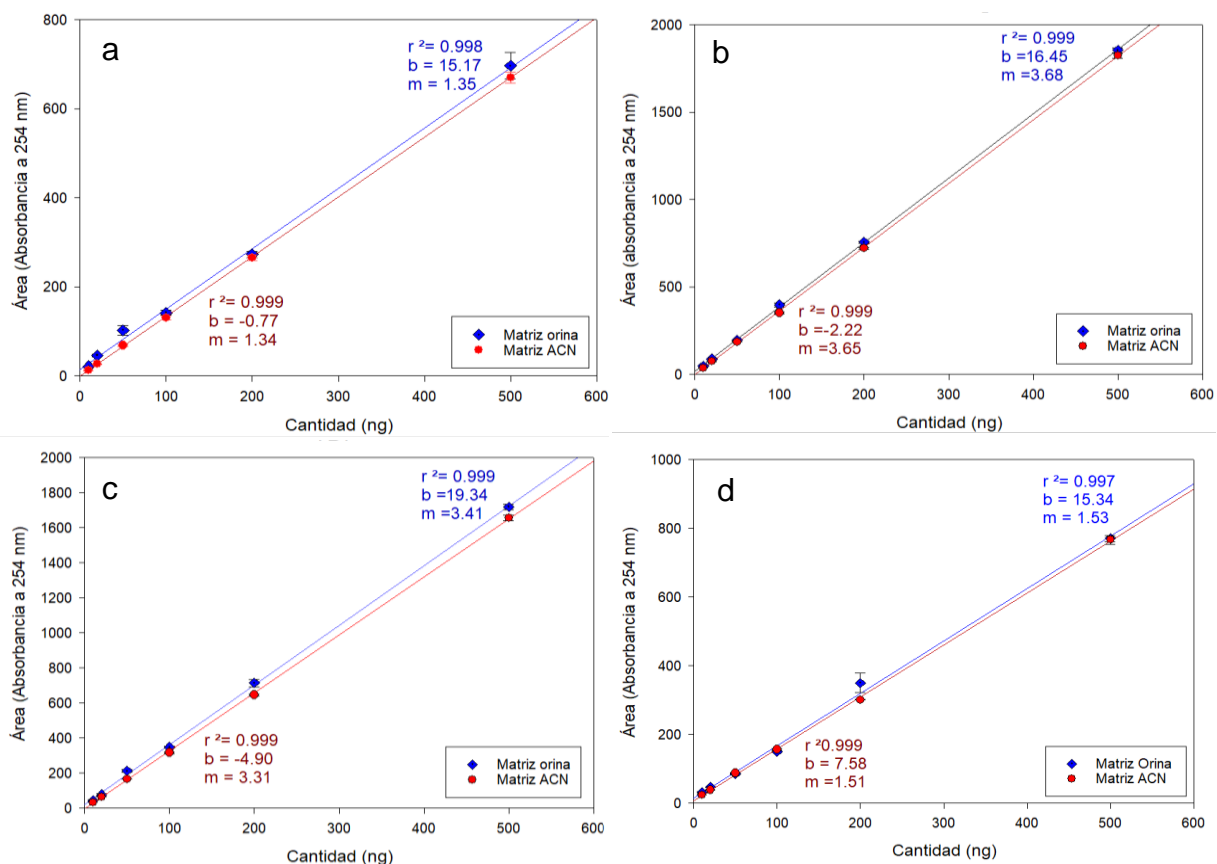
Después de inyectar la muestra se aplicó un cambio de gradiente lineal después de 2.5 minutos a 23.5% A, 12.5% B y 64% C, se mantuvo por un minuto, y seguido de un segundo cambio de gradiente lineal de 2.5 minuto a 18% A, 18% B y 64% C. Posteriormente, se aplicó otro cambio de gradiente lineal hasta alcanzar 20% A, 30% B y 50% C de 4 min. Se mantuvieron estas condiciones por 2 min. Después se aplicó otro cambio de gradiente hasta alcanzar 70% A, 25% B y 5% C. Por último, se



reestablecieron las condiciones iniciales a 27% A, 8% B y 65% C, y la columna se equilibró por 2 minutos antes de la siguiente inyección. La  $\lambda$  del detector se ajustó a 254 nm con una  $\lambda$  de referencia de 550 nm. La identidad del temefos y sus metabolitos se confirmó con el tiempo de retención ( $t_{ret}$ ) y los espectros de UV de los estándares. Se empleó el Software ChemStation para la captura de datos y el análisis cromatográfico.

### 2.6.4 Curvas de calibración

Se realizaron las gráficas de calibración usando como matrices a la orina y acetonitrilo en las que no se observó alguna interferencia entre ambas matrices ya que después de comparar la pendiente entre cada una prácticamente no existe alguna diferencia (Figura 3).



**Figura 3.** Gráficas de calibración para temefos y sus metabolitos. a) TDF-SO; b) TDF-SO<sub>2</sub>; c) TDF; d) Temefos.

Posteriormente, se calcularon los LDD y LDC para cada metabolito, que se presentan en la Tabla 3.

**Tabla 3.** LDD y LDC del temefos y sus metabolitos.

<b>Compuesto</b>	<b>LDD (ng)</b>	<b>LDC (ng)</b>
TDF-SO	4.0	12.1
TDF-SO <sub>2</sub>	0.5	1.6
TDF	0.4	1.1
Tem	2.1	6.3

Los valores se calcularon mediante las fórmulas:  $LDD = 3.3 \cdot DE / \text{pendiente}$  y  $LDC = 10 \cdot DE / \text{pendiente}$ . La DE se calculó mediante la inyección de siete veces una concentración baja de mezcla de estándares.

Se consideró la cuantificación del temefos en las muestras de orina, sin embargo, solamente se detectaron trazas y no se pudo cuantificar de manera adecuada, por lo que no fue considerado posteriormente en los resultados.

#### **2.6.5 Control de calidad**

Todas las determinaciones se hicieron por lo menos por duplicado. El límite de detección (LDD) del instrumento se calculó mediante la fórmula  $LDD = 3.3 \cdot DE / \text{pendiente}$ . El límite de cuantificación (LDC) se calculó mediante la fórmula  $LDC = 10 \cdot DE / \text{pendiente}$  (Shrivastava y Gupta, 2011). La desviación estándar (DE) se calculó mediante la inyección de siete réplicas de un estándar de concentración baja de la gráfica de calibración. Se analizaron blancos de disolventes para verificar la limpieza de la columna, pureza de los reactivos, disolventes y de una mezcla de estándares para confirmar los  $t_{ret}$  para temefos y sus metabolitos. La exactitud se determinó por medio de la recuperación de muestras enriquecidas con estándares conocidos (2, 10 y 50  $\mu\text{g/mL}$ ). La precisión se determinó por medio del coeficiente de variación ( $CV = (DE / \text{media}) \cdot 100$ ). Los valores se muestran en la Tabla 4. Para verificar la estabilidad del equipo y de los estándares, se realizaron cartas control de exactitud y precisión a través del tiempo durante el desarrollo del estudio.

**Tabla 4.** Porcentajes de exactitud (recuperación) y precisión de los metabolitos del temefos realizados con muestras de orina enriquecidas con estándares.

Metabolito	2 µg/mL		10 µg/mL		50 µg/mL	
	Exactitud (%)	Precisión (%)	Exactitud (%)	Precisión (%)	Exactitud (%)	Precisión (%)
TDF-SO + compuesto endógeno	235.7 ± 40.1	8.8	448.1 ± 474.3	8.4	103.3 ± 8	7.9
TDF-SO <sub>2</sub>	74.3 ± 12.9	3.3	100.6 ± 12.9	5.2	92.8 ± 10.3	4.9
TDF	90.5 ± 15.9	11.7	100.3 ± 19.8	3.5	87.4 ± 12.6	7.0

La precisión se calculó mediante el coeficiente de variación (CV) = (DE/media)\*100 entre las réplicas de cada rata y la media de los CV entre las ratas. Los resultados representan la media ± DE (n=4).

## 2.7 Parámetros toxicocinéticos y análisis estadísticos

La constante de eliminación urinaria ( $K_{elim-U}$ ) y la vida media de eliminación urinaria ( $t_{1/2_{elim-U}}$ ) de los metabolitos del temefos se estimaron mediante la pendiente de las curvas lineales logarítmicas de la velocidad de excreción ( $\Delta U/\Delta t$ ) versus el tiempo de punto medio (Sigmaplot versión 14.0). El AUC, la concentración máxima ( $C_{m\acute{a}x-U}$ ) y tiempo máximo ( $t_{m\acute{a}x-U}$ ) fueron calculados con el programa PK Solutions.

Los análisis estadísticos fueron realizados para la comparación de las condiciones experimentales empleando el ANOVA de una vía seguida de una prueba *post hoc* de Holm-Sidak cuando se comparan entre más de dos grupos, la significancia fue establecida en  $p < 0.05$ ; cuando se compararon solamente dos grupos, se empleó la prueba el “*t*” de Student. Los resultados obtenidos de los experimentos se representan como la media ± DE y en porcentaje los valores de recuperación y precisión. Todo lo anterior realizado con el programa SigmaPlot Versión 14.0.

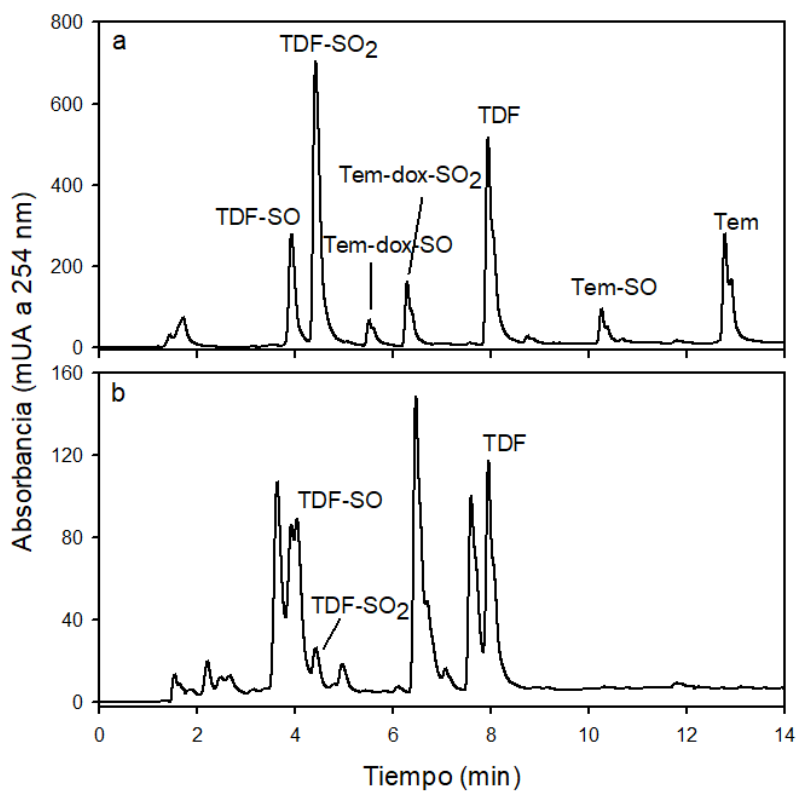
### 3. Resultados

#### 3.1. Optimización de las condiciones cromatográficas para la determinación del temefos y sus metabolitos en la orina

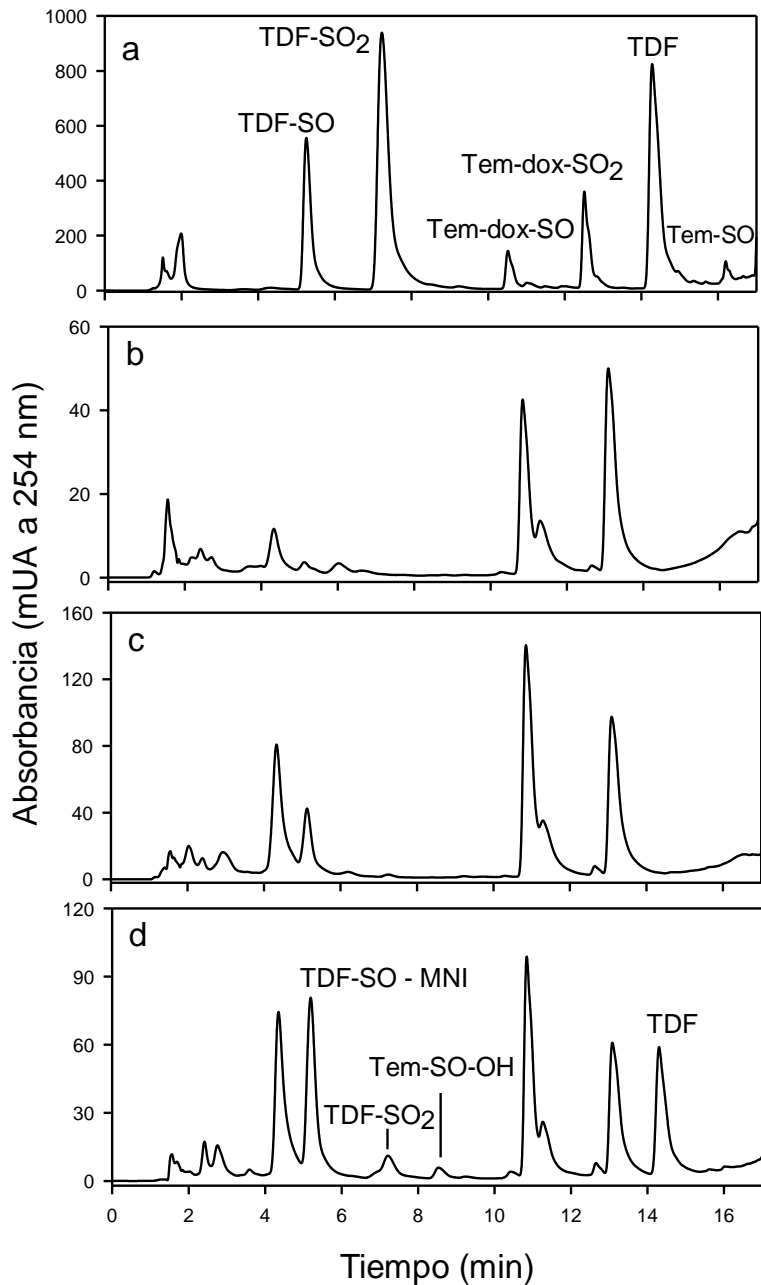
En la Figura 4a se presenta un cromatograma típico de una mezcla de estándares de siete compuestos usando las condiciones cromatográficas reportadas por Verdín-Betancourt y cols. (2019). En los extractos de orina de las ratas tratadas se observaron los picos correspondientes a los metabolitos TDF, TDF-SO y TDF-SO<sub>2</sub>, sin embargo, en el cromatograma aparecieron otros picos de compuestos no identificados, además, de presentar una baja resolución entre ellos como se muestra en la Figura 4b. Por lo tanto, se procedió a realizar modificaciones en la proporción de los componentes de la fase móvil con el fin de mejorar la resolución de los picos que aparecen en la parte inicial del cromatograma que corresponde a la región donde eluyen los componentes más polares y de esta manera poder detectar la posible presencia de otros metabolitos. El programa de solventes de la fase móvil desarrollado para la separación y detección de los picos de los compuestos se presentó previamente en la Tabla 2. En la Figura 5 se muestran los cromatogramas de las muestras analizadas con el programa nuevo de fase móvil, que corresponden a la mezcla de estándares del temefos (Figura 5a), los extractos de orina de rata no tratada con y sin hidrólisis enzimática (Figura 5b y c) y a un extracto de orina de rata tratada con temefos y con hidrólisis enzimática (Figura 5d). Esta figura nos muestra que los cambios realizados al programa de solventes no alteraron el orden de elución de los metabolitos, sólo se desplazaron a mayores  $t_{ret}$ , respecto a los reportados por Verdín-Betancourt y cols. (2019).

Con el programa de la fase móvil modificado se logró una mejor resolución de los picos y una detección más fácil de los metabolitos TDF-SO, TDF-SO<sub>2</sub> y TDF con  $t_{ret}$  de 5.2, 7.2 y 14.3 minutos, respectivamente. Adicionalmente, en los extractos de orina de las ratas tratadas se identificó otro pico con un  $t_{ret}$  de 8.4 minutos, el cual, con base en su espectro UV, fue identificado como Tem-SO-OH ya que presentó un 99.7% de similitud con el espectro de un estándar de ese compuesto (Figuras 5d y 6). También se observó la co-elución de un pico con un  $t_{ret}$  semejante al del TDF-SO (Figuras 5b, c y d), el cual pertenece a un compuesto endógeno de la rata y se excreta por la orina, además, su intensidad también se incrementa con la hidrólisis enzimática con  $\beta$ -

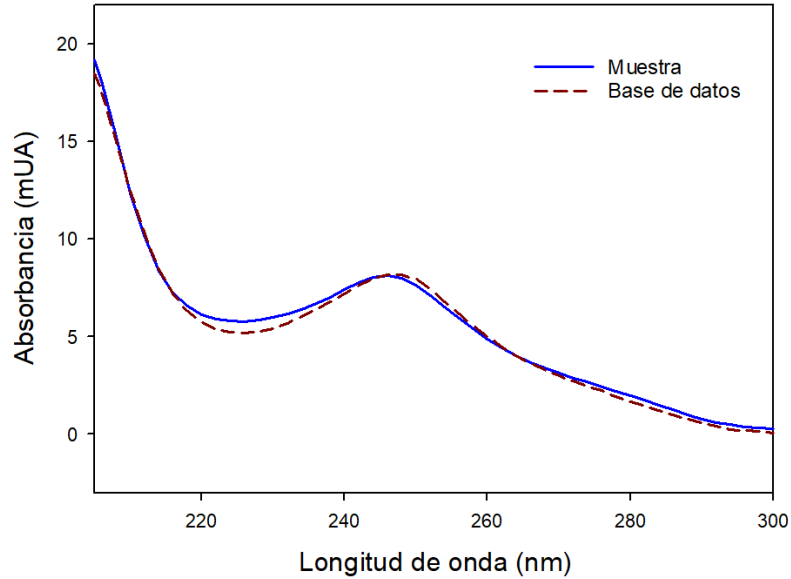
glucuronidasa/sulfatasa. La superposición de estos picos (TDF-SO y el metabolito endógeno no identificado: TDF-SO-MNI) dificultó la cuantificación exacta del TDF-SO, por lo que los valores que se presentan no son confiables.



**Figura 4.** Cromatogramas típicos de HPLC-DAD del temefos y sus metabolitos con el programa de disolventes descrito por Verdín-Betancourt y cols. (2019). a) Mezcla de estándares; b) extracto de orina de rata tratada con temefos.



**Figura 5.** Cromatogramas típicos de HPLC-DAD de los metabolitos del temefos analizados mediante condiciones cromatográficas modificadas. a) Mezcla de estándares; b) extracto de orina de rata no tratada con temefos y sin hidrólisis enzimática; c) extracto de orina de rata no tratada con temefos y con hidrólisis enzimática; d) extracto de orina de rata tratada con temefos y con hidrólisis enzimática.



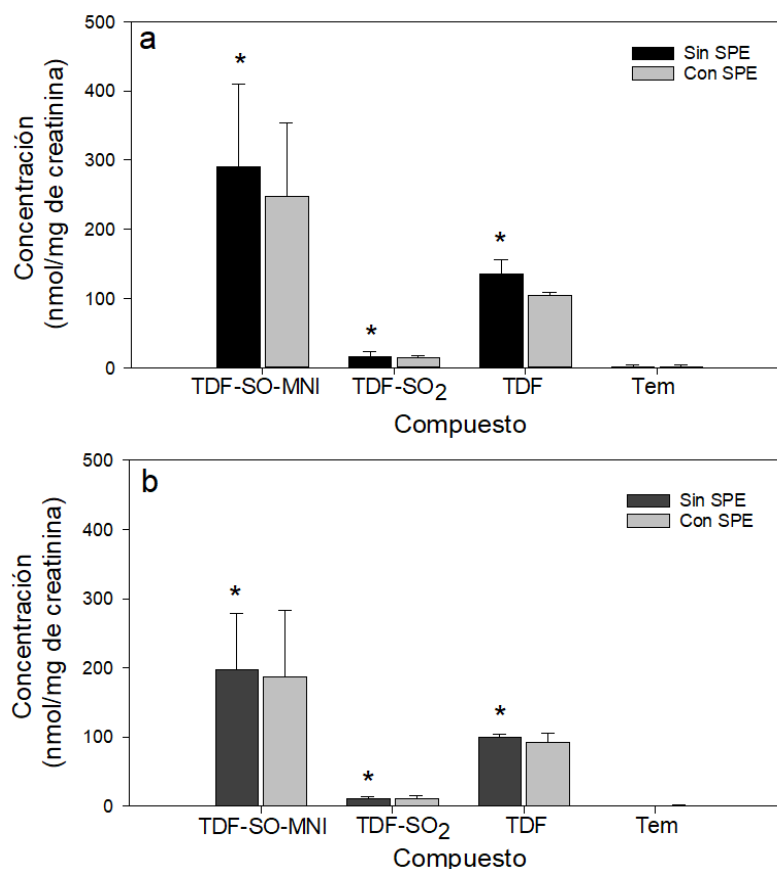
**Figura 6.** Espectro UV del compuesto con  $t_{ret}$  a los 8.4 min.

### 3.2. Estandarización de las condiciones experimentales para la extracción de los metabolitos conjugados del temefos en la orina

Después de establecer las condiciones cromatográficas para la separación y análisis de los metabolitos del temefos en orina, se procedió a optimizar el procesamiento de las muestras de orina para la extracción de los metabolitos conjugados del temefos. Las muestras de orina empleadas para la estandarización correspondieron a las obtenidas a un tiempo de 36 h en un estudio preliminar. Las variables experimentales que se consideraron fueron: extracción en fase sólida (SPE) como pretratamiento o aislamiento de los metabolitos las muestras de orina antes de la hidrólisis enzimática, efecto de la hidrólisis enzimática con  $\beta$ -glucuronidasa/sulfatasa a diferentes concentraciones para la desconjugación y efecto del pH del medio para la posterior extracción líquido-líquido con diferentes disolventes, tales como el acetonitrilo, acetato de etilo, cloruro de metileno y éter, estos últimos en forma secuencial.

En primera instancia se evaluó el efecto del pretratamiento o aislamiento de los metabolitos conjugados de las muestras de orina con la SPE para someterlos a hidrólisis enzimática y su extracción posterior (Figura 7). Los resultados indican que no fue necesaria la SPE antes de la hidrólisis enzimática, ya que se obtuvieron mejores

resultados sin aplicar este pretratamiento. Así mismo, la extracción líquido-líquido después de la hidrólisis enzimática, en este caso acetato de etilo, a pH ácido resultó ser ligeramente mejor que a pH alcalino.

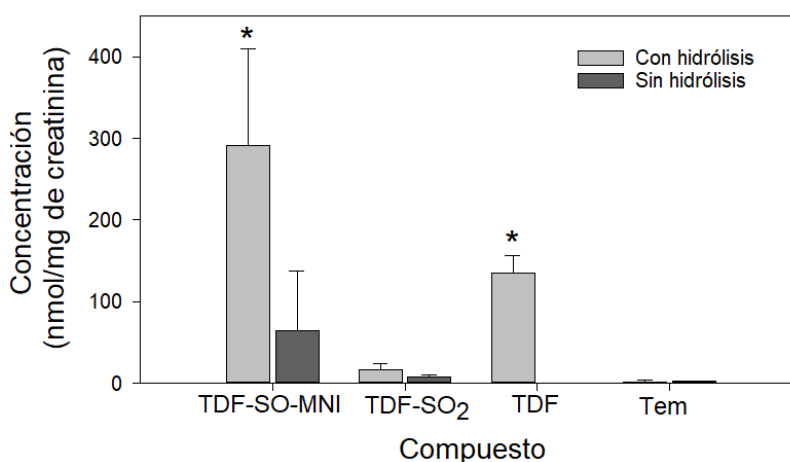


**Figura 7.** Efecto del pretratamiento con la SPE sobre los metabolitos extraíbles del temefos en orina. La extracción líquido-líquido posterior fue realizada con acetato de etilo en medios **a)** ácido y **b)** alcalino tras hidrólisis enzimática. Los resultados representan la media  $\pm$  DE. \* $p < 0.05$ , “ $t$ ” de Student ( $n=3$ ).

Continuando con la optimización de las condiciones para el procesamiento de las muestras de orina, se observó que para detectar al TDF fue necesario llevar a cabo la hidrólisis enzimática con  $\beta$ -glucuronidasa/sulfatasa ya que cuando esta reacción no se aplicó este compuesto prácticamente no fue detectado (Figura 8). Por el contrario, en el caso del TDF-SO y la TDF-SO<sub>2</sub>, estos compuestos sí fueron detectados sin llevar a cabo la hidrólisis enzimática y se incrementó su concentración después de la reacción enzimática. Lo anterior indica que estos compuestos se excretan en la orina de rata



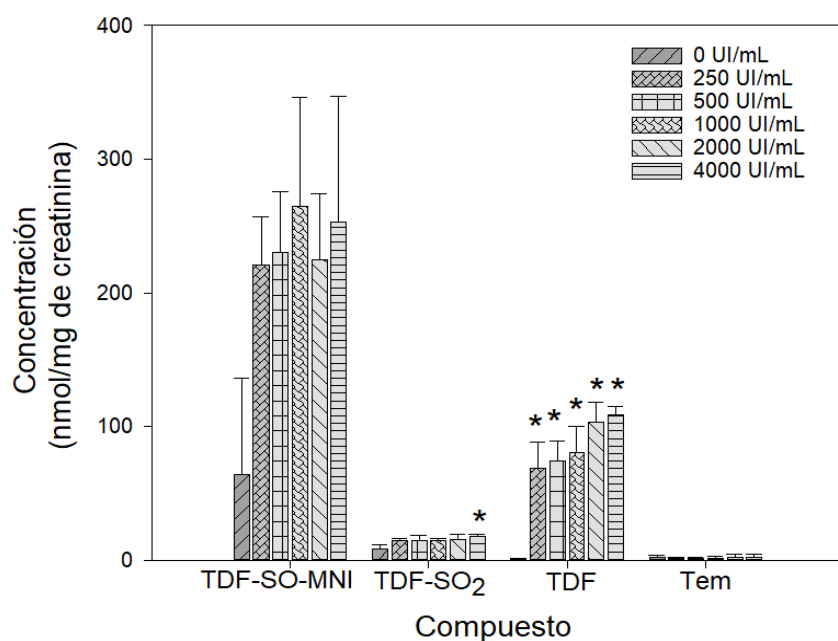
tratada en forma libre y conjugada. La presencia del temefos en la orina se detectó a nivel traza en los extractos con y sin la aplicación de la hidrólisis enzimática. Posteriormente, se evaluó la generación de los metabolitos conjugados de temefos a diferentes concentraciones de las enzimas de hidrólisis. En la Figura 9 se presenta cómo fue la concentración de los metabolitos generados en los extractos a las diferentes concentraciones de la enzima. Para el TDF ocurre un aumento muy pronunciado desde la concentración más baja probada (200 UI/mL) en comparación cuando no se lleva a cabo la reacción enzimática y su efecto permaneció constante hasta una concentración de 4,000 UI/mL. En el caso del TDF-SO<sub>2</sub>, su concentración aumentó alrededor de 2 veces al aplicar la reacción enzimática y en el caso del temefos, su presencia fue similar aún a la concentración más alta de las enzimas. La hidrólisis enzimática también produjo un cambio muy importante en la co-elución del pico del TDF-SO y el compuesto endógeno a todas las concentraciones de las enzimas (Figura 9). Esto nos indica que ambos compuestos que co-eluyen al mismo  $t_{ret}$  se incrementan con la hidrólisis enzimática.



**Figura 8.** Efecto de la hidrólisis enzimática con  $\beta$ -glucuronidasa/sulfatasa sobre la concentración de los metabolitos desconjugados del temefos. La extracción líquido-líquido posterior fue realizada con acetato de etilo en medio ácido. Los resultados representan la media  $\pm$  DE. \* $p < 0.05$ , "t" de Student (n=3).

Después de verificar el efecto de la hidrólisis enzimática sobre la concentración de los metabolitos desconjugados, se probaron distintas concentraciones de las enzimas  $\beta$ -

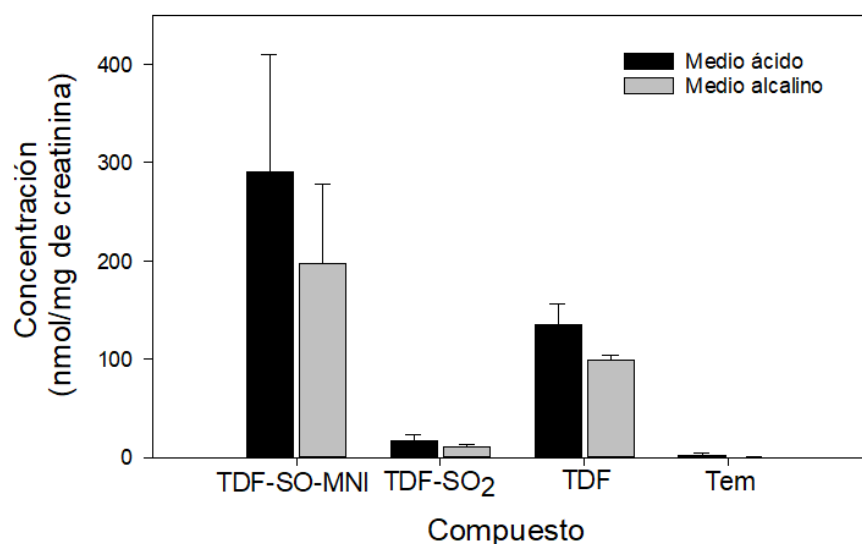
glucuronidasa/sulfatasa para evaluar su efecto sobre la hidrólisis de los metabolitos conjugados del temefos (Figura 9). La concentración de 4,000 UI/mL de enzima pudo hidrolizar significativamente más TDF-SO<sub>2</sub> en comparación cuando no se realizó la hidrólisis; en el caso del TDF, todas las concentraciones probadas tuvieron una diferencia significativa cuando se compararon con el grupo sin hidrólisis, sugiriendo de nuevo que es indispensable la hidrólisis enzimática para la detección y cuantificación de este metabolito. Por lo anterior, se decidió usar la concentración de 2,000 UI/mL de las enzimas con el fin de garantizar la hidrólisis total de los conjugados presentes en el extracto aún en los tiempos con mayor contenido de metabolitos conjugados.



**Figura 9.** Efecto de la concentración de la enzima  $\beta$ -glucuronidasa/sulfatasa sobre la hidrólisis de los metabolitos conjugados del temefos. La extracción líquido-líquido posterior fue realizada con acetato de etilo en medio ácido. Los resultados representan la media  $\pm$  DE (n=3). \* $p$ <0.05, ANOVA de una vía, seguido de una prueba de Holm-Sidak comparados contra el grupo sin enzima (0 UI/mL).

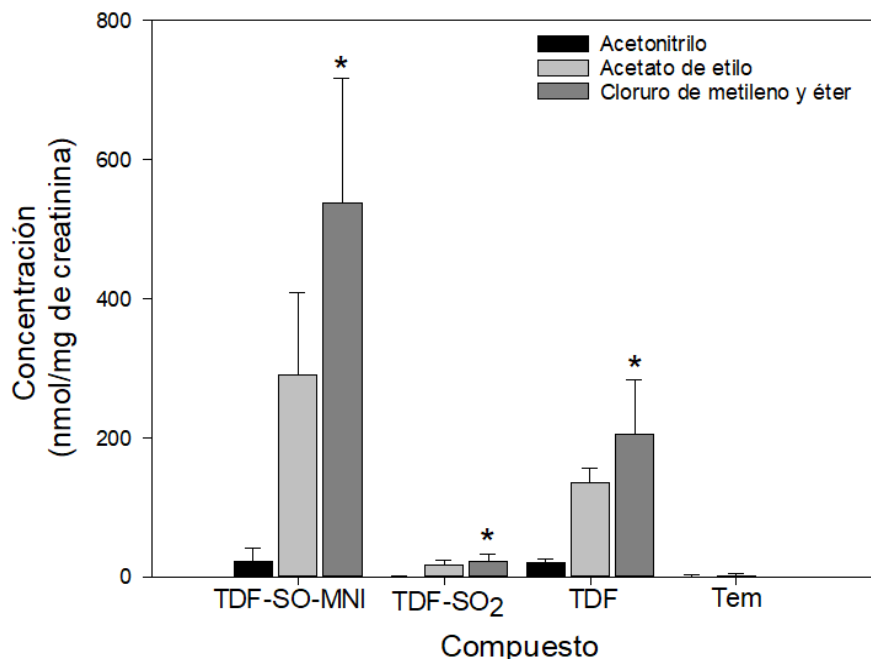
En algunos estudios reportados previamente, la reacción enzimática de hidrólisis se detiene mediante la alcalinización del medio de incubación con la adición de una solución amortiguadora de carbonatos pH 8.5 (Cruz-Hurtado y cols., 2018). En este estudio, se probó el efecto de la extracción líquido-líquido en ambas condiciones de

pH (5 y 8.5). Los resultados obtenidos indican que la concentración de los metabolitos extraídos a los dos valores de pH no presentó una diferencia significativa, sin embargo, hay mayor eficiencia en la extracción a pH ácido (Figura 10). Por lo anterior, se consideró que no es necesario la alcalinización para detener la reacción enzimática, ya que la adición del disolvente y el enfriamiento a temperatura ambiente fueron suficientes para tal acción, además, esto evita un paso adicional en el procesamiento de la muestra y reduce el tiempo requerido para el análisis.



**Figura 10.** Efecto del pH del medio sobre la extracción líquido-líquido de los metabolitos desconjugados del temefos. Extracción líquido-líquido con acetato de etilo después de la hidrólisis enzimática. Los resultados representan la media  $\pm$  DE. Sin diferencias significativas con la prueba de “*t*” de Student (n=3).

Por último, se evaluó el efecto de la polaridad de algunos disolventes para optimizar la extracción de los metabolitos desconjugados del temefos del medio de incubación de la reacción enzimática. Los disolventes probados fueron el acetonitrilo y el acetato de etilo con sólo una extracción cada uno y con cloruro de metileno y éter en extracciones independientes pero consecutivas. Los resultados de estos ensayos indicaron que hay mayor eficiencia en la extracción con dos etapas, una con cloruro de metileno y otra con éter, en comparación con la extracción individual tanto de acetonitrilo como acetato de etilo (Figura 11).



**Figura 11.** Efecto de la polaridad de los disolventes sobre la eficiencia de extracción de los metabolitos desconjugados del temefos. Los resultados representan la media  $\pm$  DE (n=3). \* $p < 0.05$ , ANOVA de una vía, seguido de una prueba de Holm-Sidak, respecto al grupo de acetonitrilo.

Con base en los resultados de estos ensayos se determinó que no es necesario un pretratamiento de las muestras de orina con SPE, la hidrólisis enzimática para la desconjugación de los metabolitos es indispensable para la detección de los metabolitos en la orina, especialmente para el TDF, no es necesario detener la reacción por medio de la alcalinización y la extracción es más eficiente con las extracciones consecutivas con cloruro de metileno y éter.

Después de haber establecido las condiciones experimentales para el procesamiento de las muestras y la extracción de los metabolitos, se evaluó la recuperación en muestras enriquecidas con los metabolitos TDF, TDF-SO y TDF-SO<sub>2</sub>, así como la precisión usando como matriz orina de ratas no tratadas (aplicando las condiciones experimentales establecidas). Debido a que no se contaba con información de las concentraciones de los metabolitos en las muestras de los animales tratados, se seleccionaron las concentraciones de 2, 10 y 50  $\mu\text{g/mL}$  para abarcar un rango amplio

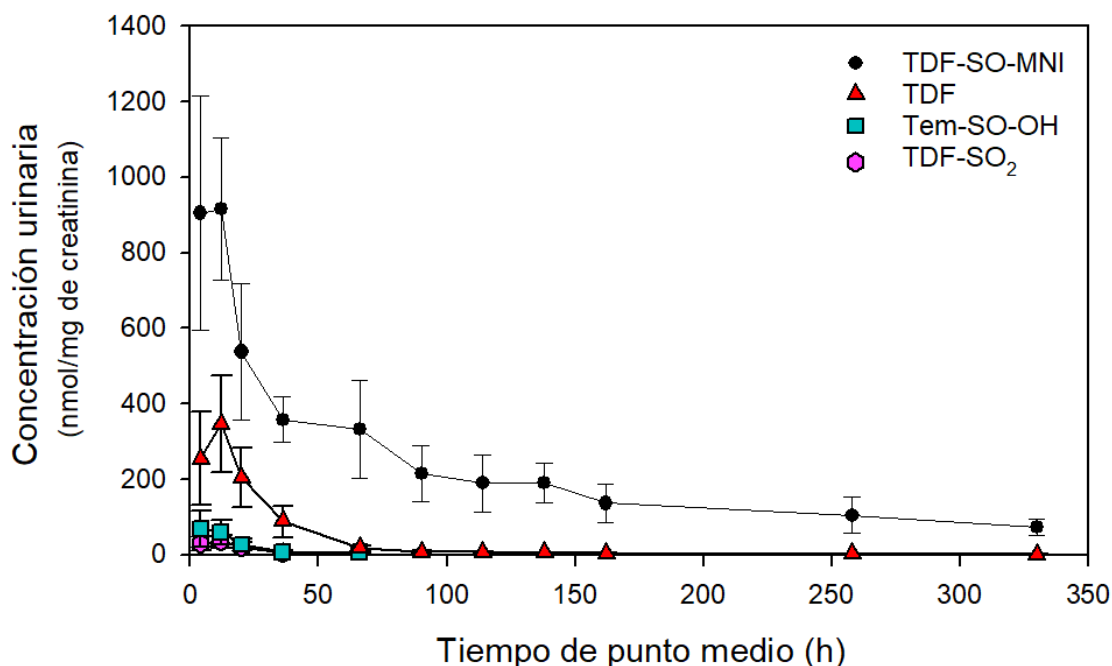
de comportamiento. Los resultados de exactitud (recuperación) y precisión (CV) obtenidos se presentan en la Tabla 4. La recuperación de los compuestos varió entre 74 y 120% y los valores de precisión se encontraron por debajo de 9%, excepto a la concentración más baja del TDF. Estos valores de exactitud y recuperación garantizan la confianza de los resultados sobre las concentraciones de los metabolitos de temefos en la orina.

### **3.3. Patrón de excreción de los metabolitos del temefos en orina de ratas y parámetros toxicocinéticos**

Después de establecer las condiciones cromatográficas y experimentales para el procesamiento de las muestras, se procedió a procesar las muestras de orina colectadas a los diferentes intervalos de tiempo después de la administración de una sola dosis de temefos (300 mg/kg). Los metabolitos detectados en las muestras de orina fueron el TDF-SO-MNI, el TDF-SO<sub>2</sub>, el Tem-SO-OH (verificado solamente con su espectro UV) y el TDF (Figura 5d). En la Figura 12 se presenta el curso temporal de la concentración urinaria de los metabolitos del temefos hasta los 14 días. Las concentraciones de ellos disminuyeron gradualmente, excepto el TDF, el cual durante las primeras 8 h mostró una concentración menor y después aumentó para posteriormente disminuir gradualmente, lo cual difiere de un comportamiento común de una cinética urinaria. La concentración máxima excretada en orina ( $C_{m\acute{a}x-U}$ ) del TDF-SO-MNI fue de  $938 \pm 379$  nmol/mg de creatinina, del TDF de  $366 \pm 115$ , del Tem-SO-OH de  $88 \pm 40$  y el TDF-SO<sub>2</sub> de  $41 \pm 16$  nmol/mg de creatinina, que fueron observadas a un tiempo máximo ( $t_{m\acute{a}x-U}$ ) de  $9 \pm 4$ ,  $10 \pm 4$ ,  $7 \pm 4$  y  $9 \pm 6$  h, respectivamente (Figura 12 y Tabla 5).

Para el análisis de los datos de una cinética de excreción urinaria es recomendable calcular la velocidad de excreción ( $\Delta U/\Delta t$ ) de cada uno de los metabolitos contra el tiempo de punto medio del intervalo de colección de muestras, tal como se muestra en la Figura 13. En el caso del TDF-SO-MNI y el TDF, ambos compuestos exhibieron un comportamiento bifásico, mientras que el TDF-SO<sub>2</sub> y el Tem-SO-OH presentaron sólo una fase. En este tipo de gráficas, la pendiente de cada una de las fases representa la  $K_{elim-U}$ , la cual se usó para calcular el  $t_{1/2 elim-U}$ . Se construyó también la gráfica de

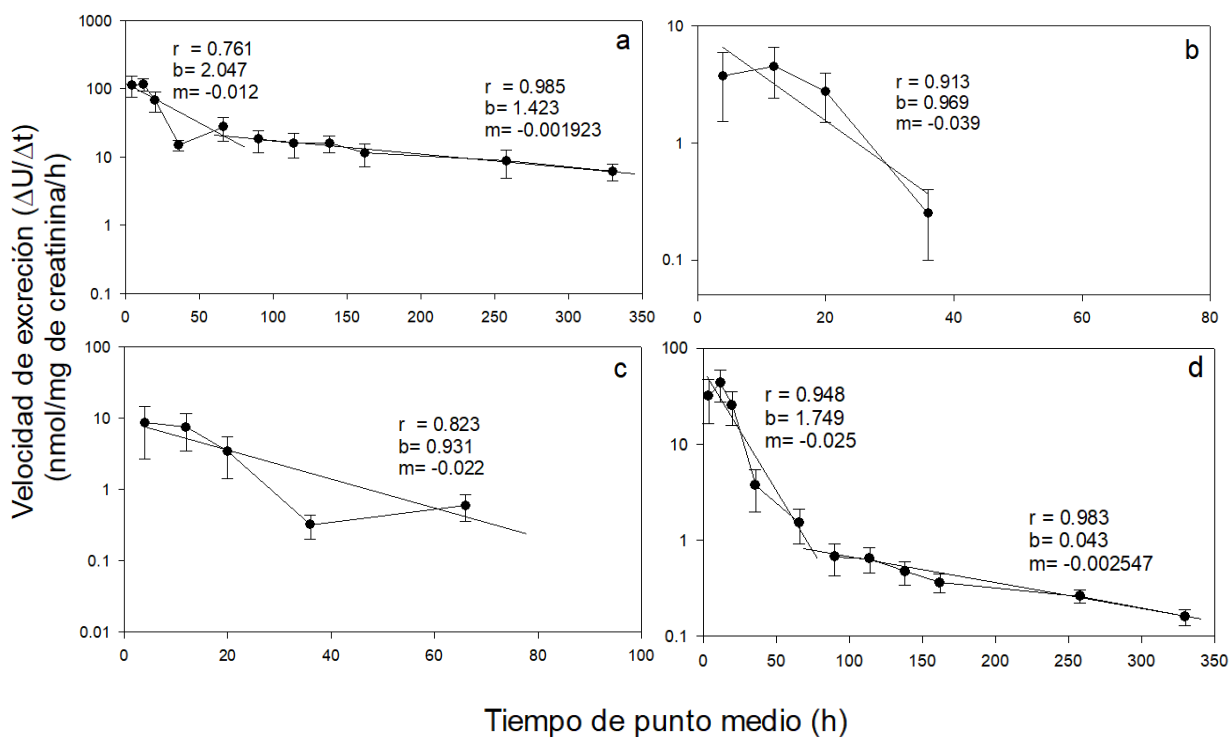
concentración acumulada excretada de cada uno de los metabolitos (Figura 14). Con esta gráfica se calculó el AUC de los metabolitos y se puede ver los tiempos hasta donde es posible detectarlos. En la Tabla 5 se presentan los valores de los parámetros de la cinética de excreción urinaria de los metabolitos del temefos.



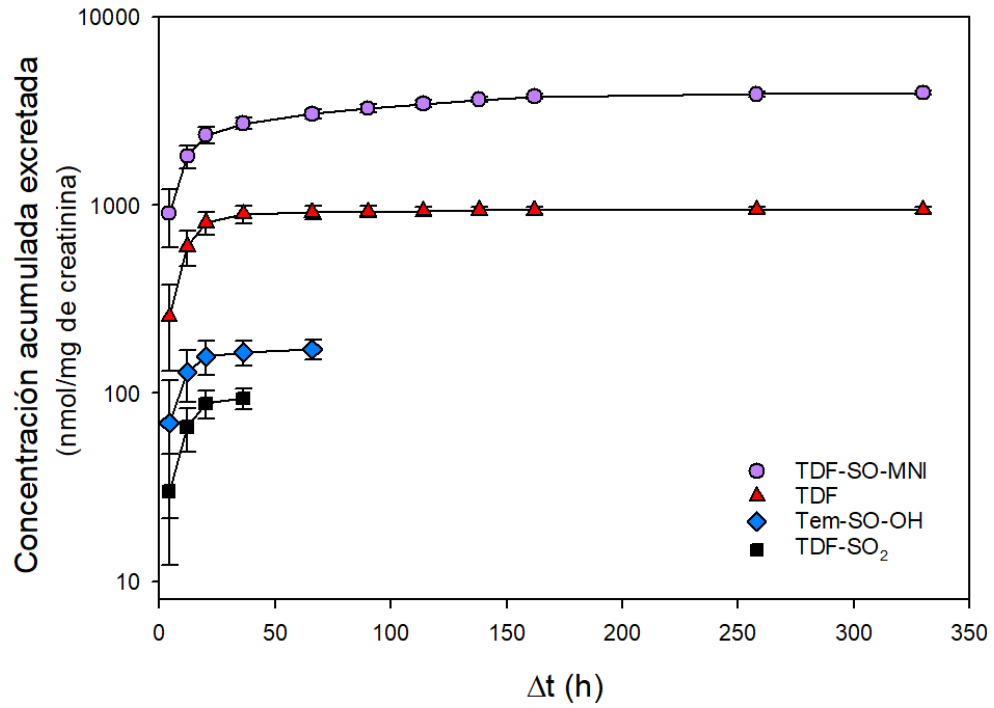
**Figura 12.** Cinética de excreción urinaria de los metabolitos del temefos después de una dosis oral única del temefos (300 mg/kg). Los datos representan la media  $\pm$  DE (n=7).

De los tres metabolitos que se pudieron cuantificar con exactitud en este estudio, el TDF presentó un AUC de  $297,540 \pm 76,013$  nmol-h/mg de creatinina, en el caso del Tem-SO-OH el valor calculado representa 3.2% del valor obtenido para el TDF y para el TDF-SO<sub>2</sub> representa sólo 0.83% del de TDF, lo que sugiere que probablemente este metabolito del temefos sea el mayoritario excretado en la orina, sin embargo, aún falta comprobarlo después de poder cuantificar con exactitud al TDF-SO. Asimismo, el tiempo máximo de detección del TDF-SO<sub>2</sub> fue de 48 h, el de Tem-SO-OH fue de 72 h y el de TDF fue de 336 h, lo que indica que dos semanas después de la administración de una sola dosis de temefos, el TDF aún puede ser detectado en las muestras de orina, lo que coincide con su  $t_{1/2 \text{ elim-U}}$  tan prolongado, de más de 270 h (11.3 d), en la segunda fase de su eliminación (Tabla 5). Por otro lado, el TDF-SO<sub>2</sub> y el Tem-SO-OH

presentaron un  $t_{1/2 \text{ elim-U}}$  de 17.7 h y 31.7 h, respectivamente. En el caso del TDF-SO no se dispone de las concentraciones exactas en la orina para el cálculo de sus parámetros toxicocinéticos, lo cual permanece pendiente para ser aclarado en otros estudios.



**Figura 13.** Gráficas semilogarítmicas de la velocidad de excreción ( $\Delta U/\Delta t$ ) Vs el tiempo de punto medio de los metabolitos del temefos excretados en orina. a) TDF-SO-MNI; b) TDF-SO<sub>2</sub>; c) Tem-SO-OH; y d) TDF. Los datos representan la media  $\pm$  DE (n=7).



**Figura 14.** Gráfica de excreción urinaria acumulada de los metabolitos del temefos. Los datos representan la media  $\pm$  DE (n=7).



**Tabla 4.** Parámetros toxicocinéticos en orina de los metabolitos del temefos.

Metabolito	$K_{elim-U}$ ( $h^{-1}$ )		$t_{1/2\ elim-U}$ (h)		$AUC_{0-\infty}$ (nmol-h/mg de creatinina)	$C_{m\acute{a}x-U}$ (nmol/mg de creatinina)	$t_{m\acute{a}x-U}$ (h)
	1 <sup>a</sup> fase	2 <sup>da</sup> fase	1 <sup>a</sup> fase	2 <sup>da</sup> fase			
<b>TDF-SO - MNI</b>	-0.01215	-0.00192	57.0	360.4	1,136,688 ± 207547	938 ± 379	9 ± 4
<b>TDF-SO<sub>2</sub></b>	-0.03912	-	17.7	-	2,455 ± 974	41 ± 16	9 ± 6
<b>Tem-SO-OH</b>	-0.02188	-	31.7	-	9,541 ± 3,843	88 ± 40	7 ± 4
<b>TDF</b>	-0.02496	-0.00255	27.8	272.1	297,540 ± 76,013	366 ± 115	10 ± 4

Los datos representan la media ± DE (n=7).  $K_{elim-U}$ : constante de eliminación urinaria;  $t_{1/2\ elim-U}$ : vida media de eliminación urinaria;  $AUC_{0-\infty}$ : área bajo la curva total;  $C_{m\acute{a}x-U}$ : concentración máxima excretada en orina;  $t_{m\acute{a}x-U}$ : tiempo de excreción máxima en orina.

#### 4. Discusión

El temefos es un plaguicida usado ampliamente como larvicida en muchos países tropicales donde se presentan de manera endémica algunas enfermedades transmitidas por mosquitos como el dengue, Zika, chikungunya, entre otros. Para ello, se agrega en los contenedores de agua, incluyendo los de agua potable, a una concentración que no exceda 1 mg/L, de acuerdo con la recomendación de la OMS desde la década de los 1970's (Rozendaal, 1997; WHO, 2017). Sin embargo, en la práctica, esta concentración se rebasa comúnmente por la adición repetida y en ocasiones indiscriminada, pues no se conocen con precisión los volúmenes exactos de agua en los contenedores. En México es el plaguicida de elección para controlar la forma larvaria de los mosquitos en las áreas endémicas de dengue (CENAPRECE, 2021).

El temefos es un compuesto inestable que sufre fotodegradación rápida debido a su doble estructura aromática que absorbe a longitudes de onda de la región UV, se excitan los electrones y al estar en un ambiente oxigenado al aire libre, se transforma en productos oxidados; la formación de los derivados oxidados del temefos es similar a lo que ocurre cuando éste se agrega al agua tratada con hipoclorito de sodio para su potabilización (Lacorte y cols., 1996; Kamel y cols., 2009). Por lo tanto, la población en general y diversas especies de animales domésticos y de vida silvestre están en riesgo de exposición al temefos y sus derivados oxidados, al estar en contacto por este medio. Además, el temefos es un componente normal en las mezclas de plaguicidas aplicados en forma de aerosoles por medio de nebulizadores térmicos para aumentar la efectividad del control de los mosquitos en etapa larvaria (Satriawan y cols., 2019), lo que aumenta el riesgo de exposición. A pesar del uso intensivo del temefos durante las campañas de abatización por alrededor de cinco décadas, no se conocen el grado de exposición en los humanos, tampoco se sabe de la exposición a sus derivados oxidados, los cuales, de acuerdo a su  $K_{ow}$  calculado por métodos computacionales (entre 2.46 y 3.99) son fácilmente absorbidos (Reyes-Chaparro, 2021). Lo anterior pone en evidencia la falta de un biomarcador de exposición que cumpla los requisitos necesarios para ser usado en estudios epidemiológicos.

Hasta la fecha, la información toxicológica y toxicocinética del temefos es todavía limitada y también se desconoce con precisión su patrón metabólico y su cinética de excreción en la orina. Ante esta situación, este estudio se enfocó en determinar la cinética de los metabolitos excretados en la orina con la finalidad de proponer un marcador de exposición en esta muestra de fácil acceso.

Para cumplir con esta propuesta, se administraron ratas Wistar macho adultas con una dosis única de 300 mg/kg de temefos por vía oral. Los organismos se colocaron en jaulas metabólicas para recolectar la orina producida en diferentes intervalos de tiempo y posteriormente determinar el patrón metabólico de excreción urinaria. Para esto, se estandarizaron las condiciones cromatográficas para analizar muestras urinarias con los metabolitos del temefos por HPLC-DAD y se optimizaron las condiciones para el procesamiento de las muestras, considerando la desconjugación enzimática con  $\beta$ -glucuronidasa/sulfatasa de *H. pomatia*, pH y disolvente. Finalmente, las concentraciones de los metabolitos fueron ajustadas por creatinina y se analizaron y procesaron para calcular los parámetros toxicocinéticos de excreción urinaria.

El esquema de administración y la dosis de temefos usada en este estudio se basó en estudios previos donde se empleó la misma dosis que no provoca la muerte de los animales, además, permite que los resultados puedan ser comparables entre un estudio y otro (Ferguson y cols., 1985; Verdín-Betancourt y cols., 2021). Además, como es un estudio para determinar la toxicocinética de excreción urinaria para calcular las constantes de eliminación, éstas no cambian a diferentes dosis. Por otro lado, aunque la dosis empleada en este estudio fue mayor a la LOAEL sugerido por la OMS (100 mg/kg), también se consideró detectar la mayor variedad y cantidad de metabolitos en la orina.

### **Optimización de las condiciones cromatográficas**

Inicialmente se probaron las condiciones desarrolladas por Verdín-Betancourt y cols. (2019) para determinar los metabolitos que aparecen en los extractos de orina de ratas tratadas con temefos. Con estas condiciones se detectaron los metabolitos TDF, TDF-SO y TDF-SO<sub>2</sub>; sin embargo, la resolución de los picos en los cromatogramas no era la adecuada y dificultó la posibilidad de detectar a otros metabolitos debido a la

presencia de otros picos, correspondientes a productos de excreción urinaria de la rata en la región donde aparecen los compuestos más polares. Para mejorar la resolución de los picos, se modificó el programa de disolventes cambiando la polaridad, con esto fue posible detectar al Tem-SO-OH, identificado por su espectro UV (semejanza del 99.7%). Sin embargo, con el fin de confirmar la identidad de este nuevo compuesto es conveniente realizar estudios posteriores para aislarlo e identificarlo con apoyo de otras técnicas como la espectrometría de masas y resonancia magnética nuclear.

El método analítico (cromatografía de líquidos) desarrollado en este estudio ofrece ventajas en comparación al usado por Shafik (1970). En ese reporte, el autor realizó la derivatización de los metabolitos para su posterior análisis por cromatografía de gases, sin embargo, sólo pudo cuantificar con exactitud al TDF con una cantidad mínima de detección de 5 ng (LDD). Con las condiciones cromatográficas establecidas en este estudio, es posible determinar con confianza los compuestos TDF, TDF-SO<sub>2</sub>, Tem-SO-OH y el temefos, sin requerir una derivatización de los compuestos para su detección. Generalmente, la inclusión de este paso en el método analítico incrementa el tiempo de procesamiento, el costo del análisis y afecta los valores de recuperación de muestras enriquecidas o de estándares certificados debido al manipuleo de las muestras, los cuales en el reporte de Shafik fueron de 75 a 87% en muestras de orina humana enriquecidas, mientras que en el presente estudio fueron de 74.5 a 120% en muestras de orina de rata para los metabolitos analizados.

Con las modificaciones de las condiciones cromatográficas se aumentó el tiempo de duración total de la corrida, los  $t_{ret}$  de todos los estándares aumentaron ligeramente y no se consiguió resolver el pico que corresponde a la co-elución del TDF-SO y el MNI endógeno. Esta interferencia se verificó analizando el espectro UV en forma tridimensional del pico, por medio del software del equipo, observando la sobre posición espectral entre el del TDF-SO y el del MNI. En los estudios de Blinn (1969) y de Shafik (1970) no se reportó problema de sobre posición de picos debido a que se emplearon técnicas y métodos distintos para la determinación. En el primero de ellos se usó cromatografía de capa fina y en el otro se hizo por cromatografía de gases, y el compuesto endógeno que co-eluye con el TDF-SO pudo haber sido hidrolizado o

desintegrado en los procesos de tratamiento de las muestras, bajo condiciones de pH extremas (ácido o básico), presencia de catalizadores y temperaturas superiores a los 100 °C que fueron empleadas, las que pudieron haber hidrolizado a la mayor parte de los compuestos. Todo esto indica la necesidad de realizar otras modificaciones a las condiciones cromatográficas, con el fin de cuantificar con mayor exactitud al TDF-SO. Entre los factores a considerar están el uso de una columna diferente, adición de otro disolvente a la fase móvil, aumentos ligeros de temperatura de la columna y aumentos del flujo del disolvente.

### **Condiciones experimentales para la optimización del procesamiento de las muestras**

En diversos reportes, en los cuales se han determinado metabolitos endógenos o exógenos conjugados, se recomienda una etapa de aislamiento o purificación de los metabolitos excretados usando una SPE antes de llevar a cabo la hidrólisis enzimática para desconjugarlos. En el presente estudio se evaluó la preparación de muestras usando cartuchos a base un polímero de partículas adsorbentes que cubren todos los rangos de pH, que son recomendados por su eficiencia para otro tipo de compuestos. Sin embargo, los resultados de este pretratamiento de la muestra fueron similares a los obtenidos sin hacer el pretratamiento antes de llevar a cabo la hidrólisis enzimática. Este pretratamiento tampoco disminuyó o eliminó la presencia de los compuestos endógenos encontrados en las muestras de orina, que se visualizan en los cromatogramas de los extractos de las ratas tratadas y no tratadas con temefos. Por lo tanto, se decidió no someter las muestras de orina de las ratas a este pretratamiento, consecuentemente se tuvo una disminución del uso de disolventes. Es recomendable realizar más ensayos usando SPE, pero con otro tipo de fase estacionaria en los cartuchos, debido a que los metabolitos del temefos pudieran requerir otro tipo de fase para ser purificados y eliminar o reducir la interferencia de los metabolitos endógenos antes de la hidrólisis enzimática. Esta propuesta de pretratamiento puede ser útil en el caso de muestras biológicas con bajos niveles de los metabolitos del temefos, en las cuales se requiera un paso de concentración usando volúmenes mayores de orina.

La identificación del TDF, TDF-SO y el TDF-SO<sub>2</sub> en este estudio, después de la hidrólisis enzimática ( $\beta$ -glucuronidasa/sulfatasa) en las muestras de orina de los animales tratados con temefos, está de acuerdo con los descritos por Blinn (1969) y Shafik (1970), quienes, aunque detectaron estos metabolitos no identificaron a los otros mencionados anteriormente. En otra etapa del presente estudio se enfocó en establecer las condiciones experimentales para el procesamiento de las muestras de orina, debido a que en la limitada información bibliográfica para determinar a los metabolitos del temefos se utilizaron condiciones experimentales extremas de pH (ácido y básico), temperatura elevada, inclusión de catalizadores, entre otros, los cuales pueden conducir a que prácticamente todos los derivados del temefos sean llevados finalmente hasta los derivados desfosforilados como TDF, TDF-SO y TDF-SO<sub>2</sub> (Blinn, 1969; Shaffik, 1970). Además, para una buena caracterización del patrón metabólico de excreción urinaria era necesario una hidrólisis enzimática controlada, para desconjugar todos los metabolitos potenciales que pueden estar presentes sin destruirlos ni modificarlos químicamente, los cuales de acuerdo con la ruta de biotransformación propuesta en la rata y los seres humanos (Reyes-Chaparro y cols., 2021; Verdín-Betancourt y cols., 2021) corresponden a 9 metabolitos, todos ellos poseen un grupo -OH generado a partir de la desfosforilación en el sustrato para la conjugación. Los resultados de este estudio indican que el patrón metabólico de excreción urinaria del temefos está conformado por el TDF, TDF-SO, TDF-SO<sub>2</sub>, Tem-SO-OH y niveles traza del compuesto original. De estos compuestos, el TDF-SO, el TDF-SO<sub>2</sub> y el Tem-SO-OH se excretan en forma libre y conjugada y el TDF está presente en el medio casi en su totalidad en forma conjugada, por lo que es necesario llevar a cabo la hidrólisis enzimática para su detección.

La presencia de TDF, como uno de los metabolitos finales de excreción sugiere una biotransformación exhaustiva a partir del temefos sin que ocurra la oxidación del azufre central. Por el contrario, si ocurre la oxidación del azufre central, la ruta se va hasta el producto final TDF-SO y si ocurre la doble oxidación de este azufre central el producto final corresponde al TDF-SO<sub>2</sub>. Además, también puede ocurrir la oxidación del TDF a TDF-SO y TDF-SO<sub>2</sub>. Los resultados obtenidos en este estudio indican la eliminación libre y conjugada de TDF-SO, TDF-SO<sub>2</sub> y Tem-SO-OH (este último visualizado en los

cromatogramas durante el procedimiento de estandarización de condiciones experimentales, no se cuantificó en ese momento). En cuanto a TDF, todo está prácticamente conjugado, lo que sugiere una mayor afinidad por parte de las enzimas involucradas en la biotransformación por los sustratos que no presentan oxidación del azufre central. Asimismo, indica también que ocurre una oxidación parcial del átomo del azufre central para formar el sulfóxido y posteriormente la sulfona. Esta propuesta está apoyada por la presencia del Tem-SO-OH, el cual puede ser un indicador de una afinidad menor por parte de las enzimas para llevarlo hasta el producto final TDF-SO para su conjugación. En el mismo sentido, en exposiciones repetidas al temefos, después de 7 d de tratamiento, el principal metabolito en sangre fue el TDF (Ramos-Flores y cols., 2021), al mismo tiempo, esto sugiere una afinidad mayor en la ruta metabólica para biotransformar al compuesto original aún en exposiciones repetidas, debido a que es el compuesto almacenado en el tejido adiposo (Verdín-Betancourt y cols., 2021).

Hasta la fecha, la información acerca de las enzimas involucradas en la biotransformación del temefos es muy limitada. En ensayos *in vitro* con microsomas hepáticos de rata (MHR), en presencia de inhibidores del CYP y de las FMO, se observó que la formación de los derivados mono-oxón y dioxón del temefos son llevados a cabo casi exclusivamente por isoformas del CYP, teniendo los CYP2B1/2 y 3A1/2 una participación importante en la formación de oxones y dioxones del temefos, así como en la formación de los sulfóxidos y sulfonas hay una participación tanto de los CYP como de las FMO en la rata (Hernández-Esteris, 2020). En cambio, en los humanos, los CYP2B6, 2C9 y 2C19 son las principales isoformas involucradas en el metabolismo del temefos y una contribución menor de los CYP3A4 y 2D6, de acuerdo con los resultados *in silico* reportados por Reyes-Chaparro y cols. (2020). Tampoco se conoce cuáles enzimas podrían estar involucradas en la hidrólisis de los enlaces fosfodiéster del temefos para generar finalmente a los metabolitos aromáticos. Por lo tanto, es necesario considerar que una alteración en la expresión o la inhibición por xenobióticos de las enzimas involucradas pueden modificar el patrón metabólico urinario del temefos. Asimismo, nos indica también que es necesario realizar más

estudios para determinar qué otras enzimas están involucradas en la biotransformación del temefos, tanto en la rata como en los humanos.

### **Patrón de excreción urinaria de los metabolitos del temefos**

Actualmente existen pocos estudios sobre la toxicocinética de los plaguicidas y menos aún sobre su cinética de excreción urinaria. En el caso del temefos, los resultados muestran que el comportamiento del TDF se ajusta a un modelo de excreción de dos fases, mostrando ambas fases un comportamiento lineal ( $r > 0.9487$ ), mejor que el observado con los otros metabolitos, aun cuando sólo presentaron una sola fase en la gráfica de la velocidad de excreción ( $\Delta U/\Delta t$ ) respecto al tiempo, que es una de las representaciones más adecuadas para el cálculo de la constante de eliminación urinaria (Bourne, 2014). Para el TDF, destaca su  $t_{1/2 \text{ elim-U}}$  de la segunda fase que es de aproximadamente 272 h (>11 días), lo cual es sumamente prolongado en comparación con otros plaguicidas; por ejemplo, es 10 veces más prolongado que el descrito para el metabolito urinario 3,5,6-TCP (3,5,6-tricloro-2-piridinol) del plaguicida clorpirifos, cuyo  $t_{1/2 \text{ elim-U}}$  es de 27 h aproximadamente (Nolan y cols., 1983). En el caso de la primera fase, no existe una diferencia en el valor del  $t_{1/2 \text{ elim-U}}$  tan grande, respecto a los de los otros metabolitos, aunque hace falta determinar con precisión el  $t_{1/2 \text{ elim-U}}$  del TDF-SO.

Por otro lado, el AUC de los metabolitos indica la biodisponibilidad o la fracción del temefos que logró alcanzar la circulación sanguínea, y en este estudio también muestra la biodisponibilidad de los metabolitos para ser excretado por la orina, lo que depende de factores como las características fisicoquímicas del compuesto, la vía de administración, vehículo, efecto de primer paso hepático e intestinal, vaciamiento gástrico, acumulación tisular, entre otros (Mehta, 1987; Baynes y Hodgson, 2010; Krishnan, 2019). De los metabolitos que se pudieron cuantificar con exactitud en este estudio indican que el TDF probablemente sea el metabolito mayoritario en la orina, ya que el valor de la AUC del Tem-SO-OH representó 3% del de TDF y el de TDF-SO<sub>2</sub> representó 0.8%, lo que indica una diferencia muy grande entre ellos sobre su biodisponibilidad. A pesar de faltar los datos del AUC del TDF-SO, estos resultados concuerdan con los reportados por Blinn (1969) y Shafik (1970), quienes comentaron



que el TDF es el metabolito mayoritario del temefos en la orina sin importar las dosis utilizadas o los esquemas de exposición utilizados en los tres estudios. Además, de acuerdo con la gráfica de excreción acumulada, el TDF se detectó fácilmente hasta los 14 d después de la administración, mientras que el TDF-SO<sub>2</sub> y el Tem-SO-OH ya no fue posible cuantificarlos con la metodología analítica usada en este estudio después de 72 h después de la administración.

Tanto la gráfica de la cinética tradicional como en la gráfica de la velocidad de excreción ( $\Delta U/\Delta t$ ) del TDF respecto al tiempo, muestran un incremento de la concentración detectada en la orina en el segundo tiempo evaluado (8 – 16 h). Este comportamiento es un tanto atípico en una gráfica de excreción urinaria de acuerdo con lo reportado en la literatura (Bourne, 2014). Una posible explicación a este comportamiento podría ser que probablemente el temefos entra a recirculación enterohepática intensa durante las primeras horas después de la administración, lo que por una parte favorece su acumulación en el tejido adiposo y se retrasa su biotransformación debido a una posible saturación de las enzimas que lo metabolizan. De esta manera, al disminuir su biodisponibilidad aumenta la capacidad metabólica, lo que incrementa el producto final TDF y por ende su presencia en la orina para ser eliminado. Posteriormente, el TDF detectado es el que se origina del metabolismo del temefos, proveniente de la liberación paulatina del tejido adiposo principalmente y en menor proporción de otros órganos (Verdín-Betancourt y cols., 2021). La presencia del TDF en la orina desde las primeras horas indica una biotransformación amplia y muy eficiente que permanece por un largo periodo de tiempo, siendo ésta la principal explicación del valor bajo de la pendiente que se refleja finalmente en un  $t_{1/2}$  relativamente largo. Esta eficiencia metabólica para generar el TDF parece no ser afectada por el esquema de dosificación, ni por el sexo de los animales como se ha mostrado en este estudio y en otros. En exposiciones repetidas al temefos, el TDF fue el metabolito mayoritario encontrado en sangre de ratas macho adultas después de dosis repetidas (5-7 días) de 100 mg/kg/d (Ramos-Flores y cols., 2021), así como en el de Shafik (1970), en el que se administraron a ratas hembra Sprague-Dawley con tres dosis de 9.6 mg de temefos.

### **Propuesta de un posible marcador de exposición al temefos**

Los plaguicidas son metabolizados a través de varias rutas, tanto el compuesto padre como sus metabolitos pueden ser usados como biomarcadores de exposición (Gupta y cols., 2019). Algunos criterios que deben cumplir los metabolitos para ser considerado como un biomarcador de exposición incluyen la especificidad, de preferencia que sea el metabolito mayoritario, que tenga un  $t_{1/2 \text{ elim}}$  prolongado o que puede ser detectado después de varias vidas medias, y que pueda ser monitoreado en muestras de fácil acceso (Aprea, 2012). Con base en los resultados de los parámetros de la cinética de excreción de los metabolitos del temefos, se propone al TDF como un excelente candidato de biomarcador de exposición, debido a su especificidad, es muy probable que sea el metabolito mayoritario excretado en orina (con la información que se tiene hasta ahora), puede ser detectado incluso después de dos semanas tras una exposición única, y se puede detectar en muestras de fácil acceso como la orina.

El TDF fue previamente propuesto por Shafik (1970) como un posible marcador de exposición a temefos, aunque ese estudio carece de varios requisitos que no fueron contemplados; por ejemplo, sólo se reportó el tiempo de detección (de dos semanas), se describió una metodología por cromatografía de gases, en la cual solo se refiere la cantidad mínima cuantificable de 5 ng de TDF, que fue el único metabolito que pudo determinar con mayor exactitud, y no se determinaron los parámetros cinéticos. Por el contrario, con el fin de proponer un marcador de exposición al temefos, en el presente estudio se llevó a cabo la caracterización del patrón metabólico de excreción en la orina, que incluye una propuesta de metodología analítica por HPLC-DAD. Se establecieron las condiciones experimentales para llevar a cabo la desconjugación de los metabolitos excretados y se calcularon los parámetros cinéticos de excreción urinaria con la administración de una dosis del plaguicida. Este esquema de administración evita factores que cambian su cinética de eliminación, por ejemplo, la exposición a dosis repetidas puede modificar el patrón metabólico debido a una posible alteración de la capacidad metabólica hepática, provocar alteraciones fisiológicas en órganos y sistemas involucrados debido a la toxicidad intrínseca del temefos o de sus metabolitos generados. Además, con base en resultados de una evaluación *in silico*

(Reyes-Chaparro y cols., 2020), existe la posibilidad de que también se pueda usar en humanos. Otro candidato como biomarcador de exposición es el TDF-SO, el cual desafortunadamente no pudo ser determinado con exactitud en este trabajo. Esto reitera la necesidad de realizar más estudios para determinar la cinética de excreción de este metabolito usando otras condiciones cromatográficas para su determinación.

El metabolito Tem-SO<sub>2</sub>-OH no fue detectado en la orina, sin embargo, fue el metabolito mayoritario detectado en sangre y tejido renal desde las primeras 4 h post-tratamiento, su concentración permaneció relativamente constante durante 36 h (Verdín-Betancourt y cols., 2021), además contiene un grupo -OH que lo hace candidato para ser conjugado por fase II. Esta ausencia en la orina sugiere que posiblemente no es un sustrato para la conjugación, sino más bien su biotransformación continuó hasta llevarlo finalmente al TDF-SO<sub>2</sub>, después de ser desfosforilado. No obstante, en lugar del Tem-SO<sub>2</sub>-OH, se detectó el Tem-SO-OH en la orina, el cual representa su precursor y sugiere que los metabolitos oxidados en el azufre central tienen menor afinidad para ser conjugados.

Debido a la evidencia de toxicidad del BPA, se han usado otros análogos alternativos en la industria de los plásticos. En este contexto, aunque es escasa la información, se sabe que el TDF es usado como monómero funcional para la fabricación de plásticos y resinas epóxicas (Songwon, 2017). También se ha reportado como un agente catalizador para el proceso de polimerización y reticulación química (curado o endurecimiento de un polímero) para fabricar resinas (Chow y cols., 2012). Hasta la fecha, no hay información suficiente sobre su liberación a partir de esos productos al medio ambiente, probablemente logre alcanzar al ambiente mediante el desecho de las industrias plásticas que lo emplean, pero es importante considerar que el TDF en el medio ambiente es persistente bajo condiciones aeróbicas y anaeróbicas empleando microorganismos nativos del agua de río y de sedimentos de pantanos (Ike y cols., 2006), aunque se ha reportado posteriormente que el TDF puede ser removido de manera efectiva en un medio de *P. oleracea* determinado por medio de la disminución de su actividad estrogénica (Okuhata y cols., 2013).

Los antecedentes anteriores sobre el TDF deben ser tomados en cuenta para la propuesta surgida de este estudio para usar a este metabolito como marcador de exposición específico del temefos, sobre todo en exposiciones prolongadas a dosis bajas, tal como se ha descrito para todos los tiodifenoles usados como subrogados del BPA (Li y cols., 2020), ya que en determinadas condiciones el TDF proveniente de plásticos podría ser mayor al proveniente del metabolismo de temefos. Además, también hay que considerar que el TDF, el TDF-SO y el TDF-SO<sub>2</sub> también pueden sufrir una biotransformación posterior, lo que daría origen a otros metabolitos, como ha sido propuesto para el TDF-SO<sub>2</sub> (Gys y cols., 2018). Por lo tanto, si se expone al TDF a través de compuestos industriales o de plásticos, probablemente se metabolice y aparezcan otros compuestos en orina, pero aún se requiere estudiar el metabolismo de este compuesto.

### **Mecanismos de acción asociados al temefos y sus metabolitos**

Un aspecto muy relevante del TDF propuesto como marcador de exposición al temefos radica en sus propiedades toxicológicas descritas en la literatura. El TDF ha mostrado ser diez veces más potente que el BPA en su actividad estrogénica (Yamada y cols., 2010); actúa como agonista del receptor de estrógenos  $\alpha$  (ER- $\alpha$ ) y del receptor de la hormona tiroidea  $\alpha$  (TR- $\alpha$ ); estimula la proliferación de las células MCF-7 (línea celular del cáncer de mama dependiente de estrógenos, a través de distintas vías de señalización) (Lei y cols., 2017a, 2017b), además, tiene mayor actividad citotóxica sobre las células HepG2 que el BPA y el BPS (Liu y cols., 2020). Algunos de los efectos sobre la función reproductiva masculina asociados a la exposición al temefos podrían ser parcialmente explicados con base en su interacción con diversos receptores, como los estrogénicos, tal como fue reportado en el estudio de Ramos-Flores y cols. (2021). En este estudio realizado en ratas, el temefos ocasionó una disminución significativa en la motilidad y viabilidad de los espermatozoides, aumentó la oxidación de lípidos de manera tiempo dependiente, se redujo la capacidad de fertilización a los ovocitos, y los ovocitos fertilizados mostraron alteración en el desarrollo y morfología del embrión (Ramos-Flores y cols., 2021). En el mismo sentido, en el estudio *in vitro* reportado por Kim y cols. (2020) se observó que al incubar espermatozoides de ratón con temefos a las concentraciones de 1, 10 y 100  $\mu$ M por 90 minutos, resultó en una disminución de

la motilidad y cinemática de los espermatozoides, de los niveles de ATP intracelular, de la actividad de proteína cinasa A y de la fosforilación en tirosina, así como también en la tasa de fertilización y desarrollo embrionario temprano.

Otros mecanismos muy importantes de mencionar asociados al temefos, es que el metabolito TDF-SO<sub>2</sub> puede interactuar con otros receptores nucleares como el receptor X de pregnanos (PXR) y el receptor de glucocorticoides (GR) ejerciendo actividad antagonista, mientras que co-estimula al receptor de andrógenos (AR) en presencia de dihidrotestosterona (Zenata y cols., 2017).

Además, también debemos considerar que conforme ocurre la biotransformación del temefos se originan los oxones y dioxones, los cuales tienen el potencial de fosforilar a diversas proteínas lo que puede provocar la inhibición de su actividad catalítica, tal es el caso de la AChE y la BuChE (Verdín-Betancourt y cols., 2019) y carboxilesterasas (Murphy y Cheever, 1972), y podría alterar las funciones reproductivas al fosforilar proteínas espermáticas (Urióstegui-Acosta y cols., 2014). Durante la formación de los oxones, el azufre liberado resultado de la desulfuración oxidativa puede inhibir a las enzimas involucradas en la reacción por medio de la inhibición por sustrato, tal como ha sido descrito para otros OF (Usmani y cols., 2006). Finalmente, la biotransformación del temefos, al igual que la de otros xenobióticos mediada por los CYP, está acompañada de un aumento en la generación de especies reactivas de oxígeno, por lo tanto, también se debe considerar un posible desbalance al interior de la célula en las vías de señalización al interior de la célula que se puede generar debido a este metabolismo tan exhaustivo principalmente en el hígado y en menor proporción en otros órganos, lo que conllevaría a diversas patologías (Nebert y Dalton, 2006; Veith y Moorthy, 2018).

Como se ha descrito, durante la biotransformación de temefos se generan una gran variedad de compuestos, cada uno de ellos con diverso potencial toxicológico y diferentes propiedades toxicocinéticas. Por lo tanto, resulta relevante identificar cuál metabolito puede ser usado como marcador de exposición a temefos, lo cual permitirá evaluar con mayor certeza su toxicidad en diferentes órganos o sistemas. Atendiendo a esta necesidad, en este estudio se caracterizó el patrón metabólico de temefos en la

orina, se establecieron condiciones cromatográficas y experimentales para el procesamiento y análisis por HPLC-DAD, se determinó el patrón metabólico de excreción, se determinaron los parámetros toxicocinéticos y se ha propuesto al TDF como marcador de exposición al temefos.

## 5. Conclusiones

1. Se establecieron las condiciones experimentales para el procesamiento de las muestras de orina para el análisis de los metabolitos de temefos y también las condiciones cromatográficas para su determinación por HPLC-DAD.
2. Los productos metabólicos de excreción de temefos en la orina de rata son el TDF, TDF-SO, TDF-SO<sub>2</sub> y el Tem-SO-OH (identificado por espectro UV).
3. El TDF se excreta sólo de manera conjugada, por lo que es necesario la hidrólisis enzimática con  $\beta$ -glucuronidasa/sulfatasa para su detección y cuantificación. El TDF-SO y TDF-SO<sub>2</sub> se excretan de manera libre y conjugada.
4. La cinética de excreción urinaria del TDF mostró un comportamiento bifásico y la de TDF-SO<sub>2</sub> y Tem-SO-OH se comportaron de manera monofásica.
5. El TDF representa un buen candidato de biomarcador de exposición al temefos, ya que tiene una vida media de eliminación prolongada (>270 h), es específico con lo que se conoce hasta ahora y es detectable después de 336 h en muestras de orina después de una dosis única.

## **6. Perspectivas**

1. Comprobar la identidad del Tem-SO-OH mediante técnicas como la espectrometría de masas y resonancia magnética nuclear.
2. Modificar las condiciones cromatográficas que permitan determinar con exactitud al TDF-SO y sus parámetros cinéticos urinarios.
3. Desarrollar un método de extracción del temefos y sus metabolitos en muestras de heces y determinar su cinética de excreción en esa matriz.
4. Determinar la toxicocinética plasmática y de excreción urinaria del temefos y sus metabolitos en exposiciones repetidas en ratas macho, y exposición única y repetida en ratas hembra.
5. Estandarizar las condiciones de la metodología desarrollada en este estudio en muestras de orina humana.
6. Caracterizar la biotransformación del TDF y de otros metabolitos en las ratas, para determinar los metabolitos que podrían encontrarse en las muestras de orina al exponerse ambientalmente a estos compuestos.



## 7. Referencias

- Aiub, C.A.F., Coelho, E.C.A., Sodré, E., Pinto, L.F.R., Felzenszwalb, I. (2002). Genotoxic evaluation of the organophosphorous pesticide temephos. *Genet. Mol. Res.* 1(2), 159-166.
- Alegría Torres, J.A. (2022). Capítulo 6: Biomarcadores. En S. G. Huerta Olvera, *Toxicología ambiental, cl nica y cotidiana. Bases y casos de estudio. 1  Edición*, (p. 73-84). Ciudad de México: El Manual Moderno.
- Angerer, J., Ewers, U., Wilhelm, M. (2007). Human biomonitoring: State of art. *Int. J. Hyg. Environ. Health* 210, 201-228.
- Apr a, M.C. (2012). Environmental and biological monitoring in the estimation of absorbed doses of pesticides. *Toxicol. Letters* 210(2), 110-8.
- Ba-Omar, T.A., Al-Kharusi, I., Victor, R. (2013). Effects of Pesticide Temephos on the Liver of *Aphanius dispar* (R uppell 1828) (Pisces: Cyprinodontidae): A Microscopic Study. *Sultan Qaboos University Journal for Science [SQUJS]*, 18, 11.
- Barr, D.B., Allen, R., Olsson, A.O., Bravo, R., Caltabiano, L.M., Montesano, A., Nguyen, J., Udunka, S., Walden, D., Walker, R.D., Weerasekera, G., Whitehead, R.D. Jr, Schober, S.E., Needham, L.L. (2005). Concentrations of selective metabolites of organophosphorus pesticides in the United States population. *Environ. Res.* 99(3), 314-26.
- Baynes, R.E., Hodgson, E. (2010). Chapter 5: Absorption and distribution of toxicants. En: *A Textbook of Modern Toxicology*. New Jersey. John Wiley & Sons.
- Bradway, D.E., Shafik, T.M. (1977). Malathion exposure studies. Determination of mono- and dicarboxylic acids and alkyl phosphates in urine. *J. Agric. Food Chem.* 25, 1342-1344.
- Benitez-Trinidad, A.B., Herrera-Moreno, J.F., Vázquez-Estrada, G., Verdín-Betancourt, F.A., Sordo, M., Ostrosky-Wegman, P., Bernal-Hernández, Y.Y., Medina-Díaz, I.M., Barr n-Vivanco, B.S., Robledo-Marengo, M.L., Salazar, A.M., Rojas-García, A.E.

(2015). Cytostatic and genotoxic effect of temephos in human lymphocytes and HepG2 cells. *Toxicol. In Vitro* 29(4), 779–786.

Bezerra de Mélo, M.E., da Costa Merlo, K., de Carvalho Fernandes, R.R., Feitosa Luna, C., Nunes Diniz, G.T., Jansem de Almeida Catanho, M.T., Regis, L. (2008). Mutagenic effects of the organophosphate insecticide temephos on mice bone marrow cells. *Rev. Inst. Adolfo Lutz* 67, 96–201.

Blinn, R. C. (1969). Metabolic Fate of Abate Insecticide in the Rat. *J. Agric. Food Chem.* 17, 118-122.

Bourne, D. (2014). Analysis of urine data. Disponible en: <https://www.boomer.org/c/p1/index.html>

Buratti, F.M., Leoni, C., Testai, E. (2007). The Human Metabolism of Organophosphorothionate Pesticides: Consequences for Toxicological Risk Assessment *J. Verbrauch. Lebensm.* 2(1), 37-44.

Butler, A. (1975). The Jaffe reaction. Identification of the coloured species. *Clin. Chim. Act.* 59, 227-232.

CENAPRECE (2021). Productos recomendados por el CENAPRECE para el combate de insectos vectores de enfermedades a partir de 2018. Recuperado de: <http://www.cenaprece.salud.gob.mx/programas/interior/vectores/descargas/pdf/ListaProductosRecomendadosCenaprece18.pdf>

COFEPRIS (2022). Registro Sanitario de Plaguicidas y Nutrientes Vegetales. Recuperado de: <https://www.gob.mx/cofepris/acciones-y-programas/registro-sanitario-de-plaguicidas-y-nutrientes-vegetales>

Chow, W.S., Grishchuk, S., Burkhart, T., Karger-Kocsis, J. (2012). Gelling and curing behaviors of benzoxazine/epoxy formulations containing 4,4'-thiodiphenol accelerator. *Thermochim. Acta* 543, 172-177.

Cobanoglu, H., Cayir, A. (2020). Assessment of the genotoxic potential of temephos. *Pestic. Phytomed.* 35(3), 183-191.

Costa, L.G. (2019). Chapter 22: Toxic effects of pesticides. En Klaassen C. D. (Ed.). Toxicology, the basic science of poisons. (9<sup>th</sup> Ed.). McGraw-Hill.

Cruz-Hurtado, M.C., López-González, M. de L., Escobar-Wilches, D.C., Sierra-Santoyo, A. (2018). Analysis of 3',5'-dichloro-2,3,4-trihydroxy-2-methylbutylanilide (DTMBA) as a new potential biomarker of exposure to vinclozolin in urine. Toxicol. Appl. Pharmacol., 346, 1-8.

Farahat, F.M., Ellison, C.A., Bonner, M.R., McGarrigle, B.P., Crane, A.L., Fenske, R.A., Lasarev, M.R., Rohlman, D.S., Anger, W.K., Lein, P.J., Olson, J.R. (2011). Biomarkers of chlorpyrifos exposure and effect in Egyptian cotton field workers. Environ. Health Perspect. 119(6), 801-6.

Ferguson, P.W., Medon, P.J., Nasri, E. (1985). Temephos (Abate) Metabolism and Toxicity in Rats. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 147, 143–147.

Filser, J.G. (2021). Toxicokinetic Models. En: Reichl, FX., Schwenk, M. (Eds.) Regulatory Toxicology. Springer, Cham.

Food and Drug Administration (2021). About Biomarkers and Qualification. Recuperado el 1 de octubre del 2022 de: <https://www.fda.gov/drugs/biomarker-qualification-program/about-biomarkers-and-qualification#:~:text=The%20Biomarkers%2C%20EndpointS%20and%20other,or%20intervention%2C%20including%20therapeutic%20interventions.>

Gaines, T., Kimborough, R., Laws, E.R.J. (1967). Toxicology of Abate in laboratory animals. Arch. Environ. Health. 14, 283-288.

Gallo, M.A., Lawrk, N.J. (1991). Organic Phosphorus Pesticides. En W. J. Hayes, E.R. J. Laws (Eds.), Handbook of Pesticide Toxicology (1st ed., pp. 917-1123). Academic Press. New York, NY, USA.

Ganzleben, C., Antignac, J.P., Barouki, R., Castaño, A., Fiddicke, U., Klánová, J., Lebret, E., Olea, N., Sarigiannis, D., Schoeters, G.R., Sepai, O., Tolonen, H., Kolossa-Gupta, R.C. (2019). Chapter 1: Introduction. En: Hill-Parks E. y Anderson K. (Eds.) Biomarkers in Toxicology (p. 3-5). Elsevier.

Gupta, R.C., Miller Mukherjee, I.R., Malik, J.K., Doss, R.B., Dettbarn, Wolf-D., Milatovic, D. (2019). Chapter 26: Insecticides. En: Hill-Parks E. y Anderson K. (Eds.) *Biomarkers in Toxicology* (p. 455-475). Elsevier.

Gys, C., Kovačič, A., Huber, C., Lai, F.Y., Heath, E., Covaci, A. (2018). Suspect and untargeted screening of bisphenol S metabolites produced by in vitro human liver metabolism. *Toxicol. Letters* 295, 115-123.

Hernández-Esteris A. (2020). Efecto del plaguicida organofosforado Temefos sobre la expresión de los citocromos P450 hepáticos de rata macho adulta y la participación de éstos en su biotransformación. Tesis de Maestría. CINVESTAV-IPN.

Ike, M., Chen, M.Y., Danzl, E., Sei, K., Fujita, M. (2006). Biodegradation of a variety of bisphenols under aerobic and anaerobic conditions. *Water Sci. Technol.* 53, 153-159.

Instituto Nacional de Ecología y Cambio Climático (2021). Temefos. Recuperado el 8 de julio de 2021 de <http://www2.inecc.gob.mx/sistemas/plaguicidas/pdf/temefos.pdf>

Insecticide Resistance Action Committee (2022). THE IRAC MODE OF ACTION CLASSIFICATION ONLINE. Recuperado en enero de 2022 en: <https://irac-online.org/modes-of-action/>

Kamel, A., Byrne, C., Vigo, C., Ferrario, J., Stafford, C., Verdin, G., Siegelman, F., Knizner, S., Hetrick, J. (2009). Oxidation of selected organophosphate pesticides during chlorination of simulated drinking water. *Water Res.* 43(2), 522-534.

Kim, S.H., Bae, J.W., Kim, D.H., Jeong, D.J., Ha, J.J., Yi, J.K., Kwon, W.S. (2020). Detrimental effects of temephos on male fertility: an in vitro study on a mouse model. *Reprod. Toxicol.* 96, 150-155.

Krishnan, K. (2019). Chapter 7: Toxicokinetics. En Klaassen C. D. (Ed.). *Toxicology, the basic science of poisons.* (9<sup>th</sup> Ed.). McGraw-Hill.

Lacorte, S., Ehresmann, N., Barceló, D. (1996). Persistence of temephos and its transformation products in rice crop field waters. *Environ. Sci. Technol.* 30, 917-923.

Lacorte, S., Jeanty, G., Marty, J.L., Barceló, D. (1997). Identification of fenthion and temephos and their transformation products in water by high-performance liquid chromatography with diode array detection and atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometric detection. *J. Chromat. A.* 777, 99-114.

Laurentino, A.O.M., Durante de Medeiros, F., de Oliveira, J., da Rosa, N., Mateus Gomes, T., de Medeiros Peretti, E., Somariva Prophiro, J., Fortunato, J.J. (2019). Effects of prenatal exposure to temephos on behavior and social interaction. *Neuropsychiatr. Dis. Treat.* 15, 669-673.

Laws, E.R.Jr., Morales, F.R., Hayes, J.Jr., Joseph, C.R. (1967). Toxicology of Abate in volunteers. *Arch. Environ. Health.* 14, 289-291.

Laws, E.R., Sedlak, V.A., Miles, J.W., Joseph, C.R., Lacomba, J.R., Diaz Rivera, A. (1968). Field study of the safety of abate for treating potable water and observations on the effectiveness of a control programme involving both abate and malathion. *Bull. World Health Organ.* 38, 439-445.

Lei, B., Xu, J., Peng, W., Wen, Y., Zeng, X., Yu, Z., Wang, Y., Chen, T. (2017a). *In vitro* profiling of toxicity and endocrine disrupting effects of bisphenol analogues by employing MCF-7 cells and two-hybrid yeast bioassay. *Environ. Toxicol.* 32(1), 278-289.

Lei, B., Peng, W., Xu, G., Wu, M., Wen, Y., Xu, J., Yu, Z., Wang, Y. (2017b). Activation of G protein-coupled receptor 30 by thiodiphenol promotes proliferation of estrogen receptor  $\alpha$ -positive breast cancer cells. *Chemosphere.* 169, 204-211.

Li, X., Wen, Z., Wang, Y., Mo, J., Zhong, Y., Ge, R.S. (2020). Bisphenols and Leydig Cell Development and Function. *Front. Endocrinol. (Lausanne).* 11, 447.

Liu, Q., Shao, W., Weng, Z., Zhang, X., Ding, G., Xu, C., Xu, J., Jiang, Z., Gu, A. (2020). *In vitro* evaluation of the hepatic lipid accumulation of bisphenol analogs: A high-content screening assay. *Toxicol. in Vitro* 68, 104959.

Magara, Y., Aizawa, T., Matumoto, N., Souna, F. (1994). Degradation of pesticides by chlorination during water purification. *Water Sci. Technol.* 30(7), 119-128.

Mehta, A.C. (1987). Pharmacokinetic and the analytical chemist. *Talanta* 3, 355-360.

Morgan, D.P., Hetzler, H.L., Slach, E.F., Lin, L.I., (1977). Urinary excretion of p-nitrophenol and alkyl phosphates following ingestion of methyl or ethyl parathion by human subjects. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 65, 342-347.

Murphy, S.D., Cheever, K. L. (1972). Carboxylesterase and cholinesterase inhibition in rats. *Arch. Environ. Health*, 24(2), 107-114.

National Center for Biotechnology Information (2021). PubChem Annotation Record for TEMEPHOS, Source: Hazardous Substances Data Bank (HSDB). Recuperado el 6 de julio de 2021 de <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/source/hsdb/956>.

National Center for Biotechnology Information (2022). PubChem Compound Summary for CID 6626, 4,4'-Sulfonyldiphenol. Recuperado el 20 de septiembre del 2022 de [https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/4\\_4\\_Sulfonyldiphenol](https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/4_4_Sulfonyldiphenol).

Nebert, D.W., Dalton, T.P. (2006). The role of cytochrome P450 enzymes in endogenous signalling pathways and environmental carcinogenesis. *Nature Rev.* 6, 947-960.

Nolan, R.J., Rick, D.L., Freshour, N.L., Saunders, J.H. (1983). Chlorpyrifos: pharmacokinetics in human volunteers. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 73, 8-15.

Okuhata, H., Ninagawa, M., Takemoto, N., Ji, H., Miyasaka, H., Iwamoto, A., Nagae, M., Ishibashi, Y., Arizono, K. (2013). Phytoremediation of 4,4'-thiodiphenol (TDP) and other bisphenol derivatives by *Portulaca oleracea* cv. *J. Biosci. Bioeng.* 115(1), 55-7.

Ramos-Flores, A., Camacho-Hernández, I., Sierra-Santoyo, A., Solís-Heredia, M.J., Verdín-Betancourt, F.A., Parra-Forero, L.Y., López-González, M.L., Hernández-Ochoa, I., Quintanilla-Vega, B. (2021). Temephos decreases sperm quality and fertilization rate and is metabolized in rat reproductive tissues at low-dose exposure. *Toxicol. Sci.* 184(1), 57-66.

Reyes-Chaparro, A., Verdín-Betancourt, F.A., Sierra-Santoyo, A. (2020). Human biotransformation pathway of temephos using an *in silico* approach. *Chem. Res. Toxicol.* 33 (11), 2765-2774.

Reyes-Chaparro, A. (2021). Evaluación *in silico* de la biotransformación y toxicidad de temefos y sus metabolitos en seres humanos. Tesis de Doctorado. CINVESTAV-IPN.

Rozendaal, J. (1997). Vector control: methods for use by individuals and communities. World Health Organization, Geneva, Switzerland. Recuperado de: [http://whqlibdoc.who.int/publications/1997/9241544945\\_eng.pdf](http://whqlibdoc.who.int/publications/1997/9241544945_eng.pdf).

Satriawan, D., Sindjaja, W., Richardo, T. (2019). Toxicity of the organophosphorus pesticide temephos. Indon. J. Life Sci. 1(2), 62-76.

Shafik, M.T. (1970). The determination of 4,4'-thiodiphenol in human and rat urine as an indication of exposure to low levels of Abate. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 5, 311-316.

Shrivastava, A., Gupta, V.B. (2011). Methods for the determination of limit of detection and limit of quantitation of the analytical methods. Chron. Young Sci. 2, 21-25.

Skoog, D., West, D., Holler, F., Crouch, S. (2014). Fundamentos de Química Analítica. 9a. Edición. Cengage learning.

Sogorb, M.A., Estévez, J., Vilanova, E. (2019). Case study: Is bisphenol S safer than bisphenol A in thermal papers? Arch. Toxicol. 93(7), 1835-1852.

Songwon, (2017). Functional monomers. Recuperado el 11 de septiembre de 2022 de: [https://www.songwon.com/assets/images/contentModellImages/SONGWON\\_Technical\\_Sheet\\_Functional-Monomers\\_V2.pdf](https://www.songwon.com/assets/images/contentModellImages/SONGWON_Technical_Sheet_Functional-Monomers_V2.pdf)

United States Environmental Protection Agency (2001). Reregistration Eligibility Decision for Temephos. Recuperado el 6 de julio de 2021 de <https://nepis.epa.gov>.

United States Environmental Protection Agency. (2014). Health and Environmental Effects Profile for Temephos. U.S. Environmental Protection Agency, Washington, D.C., EPA/600/X-84/230 (NTIS PB88162342).

United States Environmental Protection Agency (2016). Temephos RED. Recuperado en julio de 2021 de [https://archive.epa.gov/pesticides/reregistration/web/html/temephos\\_red.html](https://archive.epa.gov/pesticides/reregistration/web/html/temephos_red.html)

United States Environmental Protection Agency (2021). Basic information about pesticide ingredients. Recuperado en enero de 2022 en: <https://www.epa.gov/ingredients-used-pesticide-products/basic-information-about-pesticide-ingredients>

Urióstegui-Acosta, M., Hernández-Ochoa, I., Sánchez-Gutiérrez, M., Pina-Guzmán, B., Rafael-Vázquez, L., Solís-Heredia, M. J., Martínez-Aguilar, G., Quintanilla-Vega, B. (2014). Methamidophos alters sperm function and DNA at different stages of spermatogenesis in mice. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 279, 391-400.

Usmani, K.A., Cho, T.M., Rose, R.L., Hodgson, E. (2006). Inhibition of the human liver microsomal and human cytochrome P450 1A2 and 3A4 metabolism of estradiol by deployment-related and other chemicals. *Drug Metabol. Dispos.* 34(9), 1606-14.

Vani, J.M., de Carvalho Schweich, L., de Oliveira, K.R.W., Auharek S.A., Cunha-Laura, A.L., Antonioli-Silva, A.C.M.B., Nazario, C.E.D., Oliveira, R.J. (2018). Evaluation of the effects of the larvicides temephos on reproductive performance, embryofetal development and DNA integrity of Swiss mice. *Pest. Biochem. Physiol.* 148, 22-27.

Veith, A., Moorthy, B. (2018). Role of cytochrome P450s in the generation and metabolism of reactive oxygen species. *Curr. Opin. Toxicol.* 7, 44-51.

Verdín-Betancourt, F.A., Figueroa, M., López-González, M. de L., Gómez, E., Bernal-Hernández, Y.Y., Rojas-García, A.E., Sierra-Santoyo, A. (2019). In vitro inhibition of human red blood cell acetylcholinesterase (AChE) by temephos-oxidized products. *Sci. Rep.* 9(1), 1-11.

Verdín-Betancourt, F.A. (2020). Toxicocinética del plaguicida organofosforado temefos en rata macho adulta. Tesis de Doctorado. CINVESTAV-IPN.

Verdín-Betancourt F.A., Figueroa M., Soto-Ramos A.G., de Lourdes López-González M., Castañeda-Hernández G., Bernal-Hernández Y.Y., Rojas-García A.E., Sierra-Santoyo A. (2021). Toxicokinetics of temephos after oral administration to adult male rats. *Arch. Toxicol.* 95(3), 935-947.



Whyatt, R.M., Barr, D.B. (2001). Measurement of organophosphate metabolites in postpartum meconium as potential biomarker of prenatal exposure: a validation study. *Environ. Health Perspect.* 109, 417-420.

World Health Organization (1993). *Biomarkers and Risk Assessment: Concepts and Principles*. Recuperado en 26 de diciembre de 2021 de: <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/39037/9241571551-eng.pdf>

World Health Organization (2006). *Temephos*. En: Joint por FAO y WHO, *Pesticide residues in food*.

World Health Organization (2009). *Temephos in Drinking-water: Use for Vector Control in Drinking-water Sources and Containers*. Recuperado el 6 de julio de 2021 en <https://www.who.int>

World Health Organization (2017). *Guidelines for drinking-water quality. Fourth Edition*. Recuperado el 5 de julio de 2021 de <https://www.who.int/publications/i/item/9789241549950>

World Health Organization (2020). *The WHO Recommended Classification of Pesticides by Hazard and Guidelines to Classification 2019*. Recuperado de <https://www.who.int/publications/i/item/9789240005662>

Wu, J., Laird, D.A. (2003). Abiotic transformation of chlorpyrifos to chlorpyrifos oxon in chlorinated water. *Environ. Toxicol. Chem.*, 22(2), 261–264.

Yamada, K., Terasaki, M., Makino, M. (2010). Estrogenic activity of alkyl(thio)phenols and 4,4'-thiodiphenol formed from degradation of commercial insecticides. *J. Health Sci.* 57(2), 134-141.

Zenata, O., Dvorak, Z., Vrzal, R. (2017). Profiling of bisphenol S towards nuclear receptors activities in human reporter cell lines. *Toxicol. Letters* 5(281), 10-19.