



**INSTITUTO LATINO-AMERICANO DE CIÊNCIAS  
DA VIDA E DA NATUREZA**

**BIOTECNOLOGIA -  
BACHARELADO**

**INVESTIGACIÓN DE LA PRESENCIA DE  
CLORPIRIFOS POR GC-MS/MS EN EL FLUIDO  
TESTICULAR Y SU EFECTO EN LA CALIDAD DE  
LOS ESPERMATOZOIDES BOVINOS**

**LUIS ENRIQUE MENDOZA MARTENS**

Foz do Iguaçu  
2024

**INVESTIGACIÓN DE LA PRESENCIA DE  
CLORPIRIFOS POR GC-MS/MS EN EL FLUIDO  
TESTICULAR Y SU EFECTO EN LA CALIDAD DE  
LOS ESPERMATOZOIDES BOVINOS**

**LUIS ENRIQUE MENDOZA MARTENS**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Instituto Latino-Americano de Ciências da Vida e da Natureza da Universidade Federal da Integração Latino-Americana, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Weber Beringui Feitosa

Coorientador: Dra. Bianca do Amaral

Foz do Iguaçu  
2024

LUIS ENRIQUE MENDOZA MARTENS

**INVESTIGACIÓN DE LA PRESENCIA DE  
CLORPIRIFOS POR GC-MS/MS EN EL FLUIDO  
TESTICULAR Y SU EFECTO EN LA CALIDAD DE  
LOS ESPERMATOZOIDES BOVINOS**

Trabalho de Conclusão de Curso  
apresentado ao Instituto Latino-Americano  
de Ciências da Vida e da Natureza da  
Universidade Federal da Integração Latino-  
Americana, como requisito parcial à  
obtenção do título de Bacharel em  
Biotecnologia.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Orientador: Prof. Dr. Weber Beringui Feitosa  
UNILA

---

Coorientadora: Dra. Bianca do Amaral  
Itaipu Parquetec

---

Prof. Dr Cristian Antonio Rojas  
UNILA

---

Ma. Natalie Pereira Toyama  
Itaipu Parquetec

Foz do Iguaçu, 11 de outubro de 2024

Dedico este trabajo a mi familia que me dio su apoyo incondicional, especialmente a mi querida madre que siempre estuvo ahí.

## **AGRADECIMENTOS**

### **A usted**

En este viaje que ha sido mi vida académica, me detengo un momento para reflexionar y expresar mi más profundo agradecimiento a todas aquellas personas que, de una manera u otra, han dejado una huella imborrable en mi corazón y en mi formación. Este trabajo no es solo el fruto de mi esfuerzo, sino también el reflejo del apoyo incondicional, el amor y la guía que he recibido a lo largo de este camino. A través de estas palabras, deseo honrar a quienes han sido faros en la oscuridad, sostén en momentos de duda y alegría en tiempos de éxito.

Primeramente, elevo mi más sincero agradecimiento a Dios por iluminar mi sendero y otorgar la fortaleza y la perseverancia necesarias para llegar hasta aquí. Sin Su guía y Su gracia, este logro no habría sido posible.

Agradezco profundamente al profesor Dr. Weber Feitosa, cuya sabiduría y paciencia han sido un pilar fundamental en el proceso de este trabajo. Su fe en mí, incluso cuando las circunstancias parecían adversas, me enseñó que los límites son solo ilusiones que se desvanecen con la determinación. Sus palabras de aliento nunca faltaron en las conversaciones que teníamos sobre el trabajo.

A mi coorientadora Bianca do Amaral, mi gratitud es infinita. Desde el primer instante en que compartí con ella las ideas de mi Trabajo de Conclusión de Curso, se mostró plenamente dispuesta a acompañarme en esta etapa de mi formación. Su entusiasmo y confianza en mis capacidades me dieron fuerzas para continuar. Su apoyo y su disposición para orientarme fueron mis primeros pasos en este proyecto.

A Natalie Toyama, mi mentora, en quien encontré un cariño materno que llenó de calidez mis días en el laboratorio. Cada enseñanza suya, cada consejo, se convirtió en un peldaño que me acercaba más a mis metas. Le debo a ella la sólida base que hoy tengo en cromatografía y el crecimiento profesional que experimenté en el laboratorio. No encuentro palabras que puedan abarcar toda mi gratitud por abrirme las puertas de su conocimiento con tanta paciencia.

A mis padres, Hipólito y Claudelina, mi más profundo agradecimiento y amor eterno. Ustedes han sido el cimiento sobre el cual he construido mis sueños. Sé cuánto le costó a mi madre dejarme partir, ver cómo me alejaba del calor del hogar para perseguir mis anhelos en tierras lejanas. Sin embargo, en ningún momento se interpuso en mis decisiones; al contrario, fue un apoyo incondicional que me sostuvo

en cada paso. Los mensajes y llamadas diarias, llenos de amor y aliento, fueron el bálsamo que calmaba el techanga'u (añoranza) y fortalecía mi espíritu para seguir adelante. Madre, las largas esperas nocturnas en el frío, bajo la lluvia o en cualquier condición climática, nunca fueron en vano. Cada sacrificio tuyo está grabado en mi corazón, y este logro es un tributo especial a ti, que siempre creíste en mí y me impulsaste a alcanzar las estrellas.

A mis hermanas, compañeras de vida y guardianas de mis sueños, les agradezco por estar siempre a mi lado en los momentos más difíciles. Sus palabras de aliento, asegurándome que sí se podía, que confiaban en mí y que estaban orgullosas de lo que estaba haciendo, fueron el motor que me empujó a no rendirme. En ustedes encontré no solo el apoyo fraternal, sino también la inspiración para ser mejor cada día.

Al grupo Reproduñila: Thais, Karen, Livia, Sebas, Kevin, Haide y María. Ustedes no fueron simplemente compañeros de laboratorio; se convirtieron en mi familia académica. Su compañía y colaboración fueron fundamentales en el desarrollo de este trabajo. Cada experimento, cada momento compartido en el laboratorio enriqueció no solo el proyecto sino también mi vida. Sin ustedes, no habría podido alcanzar los resultados que hoy me enorgullezco de presentar. Gracias por caminar a mi lado en este viaje de descubrimiento y aprendizaje.

A mi gran amigo de la facultad, Nedice, mi gratitud es inmensa. En ti encontré no solo un compañero, sino un hermano. Fuiste mi brújula en los momentos de incertidumbre, mostrándome cómo enfrentar los retos académicos y personales. Tu influencia fue crucial para que este trabajo se encaminara hacia las áreas que tanto me apasionan. Nuestra amistad sincera y verdadera es uno de los tesoros más preciados que me llevo de esta etapa. Para mí, fuiste lo que para ti fue Bruno: un apoyo inquebrantable y una fuente de inspiración.

A Aline, esa persona maravillosa que el destino puso en mi camino a través de la facultad. Desde el primer día, me extendiste tu mano con una generosidad que nunca olvidaré. Tu gran personalidad y tu ejemplo influenciaron de manera total en mí, y esa influencia se reflejó en las materias que tuvimos la oportunidad de compartir. Gracias por ser un faro y una inspiración constante.

Agradezco a Johana y a Jhonatan, maestranda y graduado en biotecnología, quienes con paciencia me brindaron soporte en técnicas que inicialmente no comprendía. Su disposición para compartir su conocimiento añadió valiosos aprendizajes a mi trayectoria universitaria.

A mis amigos Mateo, Bruno, Berni, Andrés, Rochi, Christian, Leonardo, Ilenia, Rosangel, Analise y Susana, compañeros de batalla en esta larga lucha de resistencia que es la universidad. Sabemos lo difícil que es mantenerse cuerdos y fuertes en esta etapa, pero gracias a ustedes, los días se volvieron más tolerables y llenos de momentos inolvidables. Sus risas, consejos y compañía fueron el respiro necesario. Juntos compartimos no solo aulas, sino también sueños y esperanzas que nos unieron como una familia.

Agradezco a Itaipu Parquetec por proporcionarme las herramientas y el espacio necesarios para ejecutar mi proyecto en sus laboratorios. Su confianza en mi trabajo y su apoyo al proveerme los materiales necesarios para los análisis de cromatografía fueron esenciales para el desarrollo y éxito de este estudio. Su compromiso con la investigación y el apoyo a jóvenes profesionales es admirable y digno de reconocimiento.

Al PTI Paraguay, mi agradecimiento por el apoyo económico brindado durante cinco años. Su contribución no solo me proporcionó la solvencia para costear parte de mi estadía durante esos años, sino que también me dio la tranquilidad para concentrarme plenamente en mis estudios y desarrollo profesional. Su inversión en mi educación es un gesto que valoro profundamente y que me compromete a retribuir a la sociedad con mi trabajo y dedicación.

A la Universidad Federal de Integración Latinoamericana, expreso mi más sincero agradecimiento por abrirme las puertas y permitirme formar parte de su comunidad académica. Estudiar en Brasil, un país vecino con un alto nivel de educación. Fue una oportunidad invaluable que marcó mi vida. A todos los profesores que formaron parte del cuerpo docente de esta universidad, les agradezco por compartir su conocimiento y experiencia, por inspirar en mí la pasión por aprender y por desafiarme a superar mis propios límites. Su dedicación y compromiso con la enseñanza son el ejemplo que llevaré siempre conmigo.

Este logro no es solo mío; es de todos ustedes que creyeron en mí y me ayudaron a convertir los sueños en realidad. A todos, mi eterno agradecimiento y la promesa de honrar su confianza con integridad y dedicación en cada proyecto futuro.

*Si no puedes volar, entonces corre. Si no puedes correr, entonces camina. Si no puedes caminar, entonces arrástrate. Pero hagas lo que hagas, siempre sigue hacia adelante. La verdadera medida del éxito no se encuentra en la velocidad con la que avanzas, sino en la tenacidad con la que nunca te detienes, incluso cuando el camino parece imposible.*

***Martin Luther King Jr***

## RESUMO

O clorpirifós é um inseticida organofosforado amplamente utilizado na agricultura para o controle de pragas, sendo crucial para a manutenção da produtividade agrícola. No entanto, seu uso contínuo levanta preocupações importantes sobre seus efeitos adversos na saúde humana e animal assim como no meio ambiente. Estudos sugerem que o clorpirifós pode afetar a função reprodutiva em diversas espécies, mas seus efeitos diretos sobre a qualidade dos espermatozoides bovinos ainda não foram completamente compreendidos. Este projeto teve como objetivo investigar esses efeitos, expondo por 2 horas os espermatozoides do epidídimo bovino a diferentes concentrações de clorpirifós (0  $\mu\text{M}$ , 12,5  $\mu\text{M}$  e 25  $\mu\text{M}$ ). Após os tratamentos, a atividade mitocondrial e o estresse oxidativo espermático foram avaliados por microscopia de fluorescência, utilizando as sondas fluorescentes MitoTracker Green e CellROX Green, respectivamente. Os resultados demonstraram um efeito dose-dependente do clorpirifós na qualidade dos espermatozoides bovinos, onde foi observada uma redução significativa ( $p \leq 0,05$ ) na porcentagem de espermatozoides com alta atividade mitocondrial em resposta ao aumento da concentração de clorpirifós de 0  $\mu\text{M}$  para 25  $\mu\text{M}$ . Essa relação dose-dependente também foi evidenciada na produção de espécies reativas de oxigênio, com um aumento significativo ( $p \leq 0,05$ ) na porcentagem de espermatozoides sob estresse oxidativo à medida que a concentração de clorpirifós aumentou. Após confirmar o efeito deletério do clorpirifós na qualidade espermática, foi realizado um estudo para avaliar sua presença em testículo bovino por meio da técnica da análise de GC-MS/MS. Foi necessário, primeiramente, padronizar o procedimento de extração e preparo das amostras, além de validar a técnica de GC-MS/MS para detecção de clorpirifós em fluido testicular. Com a técnica devidamente validada, foram avaliadas amostras de fluido testicular de 15 animais adultos. Contudo, não foi detectada a presença de clorpirifós em nenhuma amostra avaliada. Considerando os efeitos negativos do clorpirifós na qualidade dos espermatozoides bovinos observados neste estudo, a padronização do método de GC-MS/MS para a detecção de clorpirifós em fluidos reprodutivos é fundamental para monitorar a contaminação em animais, garantindo que essa substância não comprometa a fertilidade animal.

**Palavras-chave:** organofosforados, fertilidade, qualidade espermática, estresse oxidativo, atividade mitocondrial, preparo de amostra, cromatografia gasosa.

## RESUMEN

El clorpirifos es un insecticida organofosforado ampliamente utilizado en la agricultura para el control de plagas, siendo crucial para el mantenimiento de la productividad agrícola. Sin embargo, su uso continuo plantea preocupaciones importantes sobre sus efectos adversos en la salud humana y animal, así como en el medio ambiente. Los estudios sugieren que el clorpirifos puede afectar la función reproductiva en diversas especies, pero sus efectos directos sobre la calidad de los espermatozoides bovinos aún no se han comprendido completamente. Este proyecto tuvo como objetivo investigar estos efectos, exponiendo durante 2 horas los espermatozoides del epidídimo bovino a diferentes concentraciones de clorpirifos (0  $\mu$ M, 12,5  $\mu$ M y 25  $\mu$ M). Después de los tratamientos, la actividad mitocondrial y el estrés oxidativo espermático fueron evaluados por microscopía de fluorescencia, utilizando las sondas fluorescentes MitoTracker Green y CellROX Green, respectivamente. Los resultados demostraron un efecto dependiente de la dosis del clorpirifos en la calidad de los espermatozoides bovinos, donde se observó una reducción significativa ( $p \leq 0,05$ ) en el porcentaje de espermatozoides con alta actividad mitocondrial en respuesta al aumento de la concentración de clorpirifos de 0  $\mu$ M a 25  $\mu$ M. Esta relación dependiente de la dosis también se evidenció en la producción de especies reactivas de oxígeno, con un aumento significativo ( $p \leq 0,05$ ) en el porcentaje de espermatozoides bajo estrés oxidativo a medida que aumentó la concentración de clorpirifos. Después de confirmar el efecto perjudicial del clorpirifos en la calidad espermática, se realizó un estudio para evaluar su presencia en el testículo bovino mediante GC-MS/MS. Fue necesario, en primer lugar, estandarizar el procedimiento de extracción y preparación de las muestras, además de validar la técnica de GC-MS/MS para la detección de clorpirifos en el fluido testicular. Con la técnica debidamente validada, se evaluaron muestras de fluido testicular de 15 animales. Sin embargo, no se detectó la presencia de clorpirifos en ninguna de las muestras evaluadas. Considerando los efectos negativos del clorpirifos en la calidad de los espermatozoides bovinos observados en este estudio, la estandarización del método de GC-MS/MS para la detección de clorpirifos en fluidos reproductivos es fundamental para monitorear la contaminación en animales, garantizando que esta sustancia no comprometa la fertilidad animal.

**Palabras clave:** Organofosforados, fertilidad, calidad espermática, estrés oxidativo, actividad mitocondrial, preparación de muestra, cromatografía de gases.

## ABSTRACT

Chlorpyrifos is an organophosphate insecticide widely used in agriculture for pest control, being crucial for maintaining agricultural productivity. However, its continued use raises significant concerns about its adverse effects on human and animal health, as well as on the environment. Studies suggest that chlorpyrifos may affect reproductive function in various species, but its direct effects on the quality of bovine sperm have not yet been fully understood. This project aimed to investigate these effects by exposing bovine epididymal sperm for 2 hours to different concentrations of chlorpyrifos (0  $\mu$ M, 12.5  $\mu$ M, and 25  $\mu$ M). After treatment, mitochondrial activity and sperm oxidative stress were evaluated by fluorescence microscopy using the fluorescent probes MitoTracker Green and CellROX Green, respectively. The results demonstrated a dose-dependent effect of chlorpyrifos on bovine sperm quality, with a significant reduction ( $p \leq 0.05$ ) in the percentage of sperm with high mitochondrial activity observed in response to an increase in chlorpyrifos concentration from 0  $\mu$ M to 25  $\mu$ M. This dose-dependent relationship was also evidenced in the production of reactive oxygen species, with a significant increase ( $p \leq 0.05$ ) in the percentage of sperm under oxidative stress as chlorpyrifos concentration increased. After confirming the deleterious effect of chlorpyrifos on sperm quality, a study was conducted to assess its presence in bovine testicular tissue using GC-MS/MS. It was first necessary to standardize the extraction and sample preparation process, as well as validate the GC-MS/MS technique for detecting chlorpyrifos in testicular fluid. With the technique duly validated, testicular fluid samples from 15 animals were evaluated. However, chlorpyrifos was not detected in any of the samples assessed. Considering the negative effects of chlorpyrifos on bovine sperm quality observed in this study, standardizing the GC-MS/MS method for detecting chlorpyrifos in reproductive fluids is essential to monitor contamination in animals, ensuring that this substance does not compromise animal fertility.

**Key words:** Organophosphates, fertility, sperm quality, oxidative stress, mitochondrial activity, sample preparation, gas chromatography.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> – Estructura química del clorpirifos.....	25
<b>Figura 2</b> – Desplazamiento de los pesticidas por el ambiente.....	29
<b>Figura 3</b> – Patrón de fluorescencia emitida por la sonda fluorescente MitoTracker en espermatozoides bovinos con alta actividad o baja actividad mitocondrial.....	49
<b>Figura 4</b> – Patrón de fluorescencia emitida por la sonda CellRox en espermatozoides bovinos con alto o bajo nivel de estrés oxidativo.....	52
<b>Figura 5</b> – Diferencias en la limpieza de la matriz para los test 1 y 2.....	56
<b>Figura 6</b> – Cromatograma de los diferentes testes realizados, teste 1 representado en la figura A que muestra el cromatograma de la primera inyección mostrada en la tabla 9.....	57
<b>Figura 7</b> – Cromatograma del comportamiento del clorpirifos en una solución de 500 µL de la matriz utilizada, después del método mini-QuEChERS.....	58
<b>Figura 8</b> – Curva analítica del clorpirifos en la matriz utilizada. Los puntos de concentración de la curva son 5, 10, 25, 50 y 75 µg/L.....	59
<b>Figura 9</b> – Grafico de dispersión de residuos CPF.....	60
<b>Figura 10</b> – Presenta el cromatograma de la matriz inyectada para análisis donde se puede observar la ausencia del pico que es el indicativo de la presencia o ausencia del compuesto en la muestra procesada.....	62

**LISTA DE TABLAS**

<b>Tabla 1</b> – Diferentes tipos de pesticidas basados en su función y el mecanismo de acción.....	21
<b>Tabla 2</b> – Muestra los principales metabolitos del clorpirifos reportados en la literatura, incluyendo sus fórmulas químicas y las masas exactas calculadas.....	27
<b>Tabla 3</b> – Efecto del clorpirifos en la actividad mitocondrial de espermatozoides bovinos. ....	50
<b>Tabla 4</b> – Actividad mitocondrial tratados estadísticamente.....	50
<b>Tabla 5</b> – Efecto del clorpirifos en el estrés oxidativo de espermatozoides bovinos....	53
<b>Tabla 6</b> – Tiempo de retención del CPF y TFF.....	55
<b>Tabla 7</b> – Total de inyecciones realizadas.....	55
<b>Tabla 8</b> – Parámetros de validación analítica del método de análisis de clorpirifos utilizando mini-QuEChERS y GC-MS/MS.....	60
<b>Tabla 9</b> – Repetibilidad y precisión intermedia para los analitos.....	61

## LISTA DE ABREVIATURAS Y SIGLAS

ACHÉ	Acetilcolinesterasa
CPF	Clorpirifos
C18	Octadecilsilano
PSA	Propil Sulfonato de Amina
TCP	2,4,6-Triclorofenol (TCP)
GC	Cromatografía Gaseosa
OMS	Organización Mundial de la Salud
LD50	Dosis Letal 50%
ACh	Acetilcolina
COPD	Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica
EPP	Equipos de Protección Personal
OMS	Organización Mundial de la Salud
2,4-D	Acido 2,4-diclorofenoxiacético
EFSA	Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria
EPA	Agencia de Protección Ambiental
ECD	Detector de Captura de Electrones
ERO	Especies Reactivas de Oxígeno
FSH	Hormona Foliculoestimulante
LH	Hormona Luteinizante
PUFAs	Acidos Grasos Insaturados
HPLC	Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia
ECD	Captura de Electrones
FID	Ionización de Llama
AOAC	Asociación de Químicos Analíticos Oficiales
LD	Límite de Detección
LQ	Límite de Cuantificación
FITC-PSA	Aglutinina de Pisum sativum
PBS	Solución Salina Tamponada con Fosfato
ACN	Acetonitrilo
TALP	Tyrode, albúmina, lactato y piruvato
TFF	Trifluorotolueno
R <sup>2</sup>	Coefficiente de Determinación
GC-MS/MS Tándem	Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas en Tándem

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>15</b>
1.1 JUSTIFICATIVA .....	17
1.2 OBJETIVOS.....	19
1.2.1 Objetivo geral .....	19
1.2.2 Objetivo específicos .....	19
<b>2 DESENVOLVIMENTO .....</b>	<b>20</b>
2.1 PESTICIDAS .....	20
2.2 CONTAMINACIÓN POR PESTICIDAS .....	22
2.3 CLORPIRIFÓS .....	24
2.3.1 Metabolitos de Clorpirifós.....	27
2.3.2 Factores que influyen en la persistencia ambiental del clorpirifos y sus metabolito .....	27
2.4 EFECTO TÓXICO DEL CLORPIRIFOS EN EL SEMEN .....	30
2.5 BIOACUMULACION.....	31
2.6 ANÁLISIS CROMATOGRÁFICA.....	33
2.6.1 Preparo de Amostra e Método QuEChERS .....	35
2.6.2 Validación de la Metodología .....	36
2.7 ANÁLISIS EN EL MICROSCOPIO DE FLUORESCENCIA .....	39
<b>3 METODOLOGIA .....</b>	<b>42</b>
3.1 DELINEAMIENTO EXPERIMENTAL DE TRATAMIENTO CON CLORPIRIFOS .....	42
3.1.1 Colecta De Los Testículos .....	42
3.1.2 Colecta De Los Espermatozoides.....	42
3.1.3 Colecta de fluido testicular .....	43
3.1.4 Incubación De Los Espermatozoides .....	43
3.1.5 Evaluación De La Actividad Mitocondrial.....	43
3.1.6 Evaluación De Las Espécies Reativas De Oxígeno.....	44
3.1.7 Análisis Estatística .....	44
3.2 DESENVOLVIMIENTO DE METODOLOGÍA PARA EXTRACCIÓN Y DETERMINACIÓN DE CLORPIRIFOS .....	45
3.2.1 Extracción con Acetonitrilo y Sales de Limpieza .....	45
3.2.2 Extracción Con Adición De Agua, Acetonitrila Y Sales De Limpieza.....	45
3.2.3 Extracción Optimizada Con Limpieza Adicional Mediante PSA Y C18 .....	46
3.2.4 Preparo De Muestras .....	46
3.2.5 Validación De La Metodologia .....	47
3.2.6 Condiciones cromatográficas.....	48
<b>4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>	<b>49</b>
4.1 EFECTO DEL CLORPIRIFÓS EN LA ACTIVIDAD MITOCONDRIAL DE ESPERMATOZOIDEOS BOVINOS.....	49
4.2 EFECTO DEL CLORPIRIFÓS EN EL ESTRÉS OXIDATIVO DE ESPERMATOZOIDEOS BOVINOS.....	52
4.3 DESENVOLVIMIENTO DA METODOLOGIA DE EXTRACCIÓN POR QuEChERS MINIATURIZADO E GC-MS/MS .....	54
4.4 VALIDACIÓN METODOLÓGICA.....	58
4.5 ANALISIS DE LA MATRIZ DE FLUIDO DEL TESTÍCULO .....	61
<b>5 CONCLUSIONES FINALES .....</b>	<b>64</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>66</b>

## 1 INTRODUCCIÓN

En el contexto global actual, la agricultura enfrenta el desafío de satisfacer las demandas alimentarias de una población en constante crecimiento. Para lograr este objetivo, el uso de pesticidas se ha convertido en una práctica casi indispensable en los sistemas agrícolas modernos. Estos compuestos químicos son empleados para proteger los cultivos de una amplia variedad de plagas y enfermedades, contribuyendo significativamente al aumento de la productividad y eficiencia en la producción de alimentos. Sin embargo, el uso intensivo y, en ocasiones, indiscriminado de pesticidas ha generado preocupaciones importantes en relación con sus impactos ambientales y efectos adversos en la salud humana y animal.

Los pesticidas pueden clasificarse desde múltiples perspectivas, incluyendo su función específica, el tipo de plaga que combaten y su origen químico. Generalmente, se dividen en dos categorías principales: sintéticos y naturales. Dentro de los sintéticos, destacan los organofosforados, organoclorados, carbamatos y piretroides, los cuales han sido ampliamente utilizados debido a su eficacia en el control de plagas. Sin embargo, estos compuestos suelen ser persistentes en el medio ambiente y pueden bioacumularse en los tejidos de organismos no objetivo, lo que genera un riesgo para la biodiversidad y la salud pública.

La contaminación por pesticidas es un problema global que afecta tanto a ecosistemas terrestres como acuáticos. Los pesticidas pueden transportarse a través del aire, el agua y el suelo, alcanzando lugares alejados de su punto de aplicación original. Esto ha llevado a la detección de residuos de pesticidas en aguas superficiales y subterráneas, suelos agrícolas y alimentos destinados al consumo humano y animal. La exposición a estos compuestos puede ser aguda, crónica o subcrónica, y puede ocurrir a través de diversas vías, incluyendo la inhalación, ingestión y absorción dérmica.

El clorpirifos, un insecticida organofosforado, ha sido ampliamente utilizado en la agricultura para el control de una variedad de plagas. A pesar de su eficacia, su persistencia en el medio ambiente y su capacidad de bioacumulación lo han convertido en un contaminante de gran preocupación. La persistencia del clorpirifos en el medio ambiente se ve influenciada por diversos factores, incluyendo las propiedades del suelo, las condiciones climáticas y los procesos de degradación biológica y química. Su capacidad para absorberse en partículas del suelo y su lenta degradación contribuyen a su acumulación en cuerpos de agua y suelos, donde puede representar

un riesgo tanto para organismos acuáticos como terrestres (Rostami et al., 2021). Además, los metabolitos del clorpirifos, como el 3,5,6-tricloro-2-piridinol (TCP), pueden ser incluso más tóxicos y persistentes que el compuesto original, lo que agrava los riesgos ambientales asociados con su uso.

La detección y análisis de residuos de clorpirifos y sus metabolitos en muestras biológicas es fundamental para evaluar el grado de exposición y sus posibles efectos tóxicos. Técnicas analíticas como la cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS/MS) y métodos de preparación de muestras como el QuEChERS han demostrado ser eficaces para este propósito. La validación de estos métodos analíticos es esencial para garantizar la precisión y confiabilidad de los resultados obtenidos, lo que es crucial para la toma de decisiones en materia de salud pública y regulación.

Además, la cromatografía gaseosa (GC), en combinación con detectores de espectrometría de masas (GC-MS), se ha establecido como una herramienta poderosa para la identificación y cuantificación de pesticidas. En estudios previos, esta técnica ha permitido detectar residuos de pesticidas en concentraciones bajas, lo que es fundamental para evaluar el impacto de estos compuestos en la salud reproductiva. El uso de GC-MS en este estudio no solo permitirá identificar la presencia de clorpirifos en el plasma seminal, sino que también facilitará un análisis detallado de la cantidad de este pesticida y su relación con los efectos observados en la calidad espermática. Este enfoque es particularmente relevante en el contexto de la creciente demanda de estudios toxicológicos que evalúen el impacto de los agroquímicos en la salud animal y humana. La bioacumulación de pesticidas como el clorpirifos no solo representa un riesgo para la fertilidad animal, sino que también puede afectar la calidad de los productos alimenticios destinados al consumo humano.

Este método, combinado con la metodología de preparo de muestras QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, and Safe), permite una extracción eficiente y precisa de residuos de pesticidas en matrices complejas, como el plasma seminal bovino. La metodología QuEChERS facilita la purificación y concentración de los analitos, eliminando interferencias y garantizando resultados precisos en la detección de contaminantes como el clorpirifos. A través de esta técnica, es posible evaluar con mayor exactitud la presencia de este pesticida en los tejidos reproductivos y analizar sus efectos posibles sobre la viabilidad espermática, la actividad mitocondrial y los niveles de estrés oxidativo.

El clorpirifos actúa inhibiendo la enzima acetilcolinesterasa, lo que

compromete la transmisión nerviosa en los insectos. No obstante, su exposición en el entorno agrícola ya sea a través de alimentos o agua contaminados, también puede afectar directamente la salud animal. La presencia de residuos de clorpirifos en la carne y en la leche puede generar preocupaciones sobre la seguridad alimentaria y afectar la competitividad de los productos brasileños en los mercados internacionales, especialmente en países con normativas más estrictas sobre residuos de pesticidas. Además, los residuos de este pesticida en el plasma seminal bovino pueden comprometer la fertilidad y reducir la productividad de las industrias cárnica y lechera, afectando así la competitividad del sector y la economía del país. Aunque los efectos del clorpirifos sobre la integridad y funcionalidad de los espermatozoides bovinos aún no se comprenden completamente, su posible influencia negativa en la reproducción es motivo de preocupación.

Este estudio tiene como objetivo no solo evaluar los efectos toxicológicos del clorpirifos sobre los espermatozoides bovinos, sino también optimizar y validar el uso de la cromatografía gaseosa y la metodología QuEChERS para su detección en el fluido testicular. Por lo tanto, este estudio no solo busca entender los mecanismos a través de los cuales el clorpirifos afecta la viabilidad y funcionalidad de los espermatozoides bovinos, además, validar la técnica de detección de clorpirifos por GC-MS en fluido testicular, así como evaluar su presencia en testículos de bovinos en la región de Foz do Iguaçu, proporcionando una base para la adopción de estrategias que busquen los riesgos asociados con su uso en la agricultura.

## 1.1 JUSTIFICATIVA

La relevancia de este proyecto radica en la necesidad de comprender y analizar los impactos de los pesticidas en la fertilidad animal, con especial énfasis en el ganado bovino en etapa reproductiva, una especie fundamental para la producción global de carne y leche. Aunque los pesticidas desempeñan un papel crucial en el mantenimiento de la productividad agrícola, su uso generalizado tiene importantes implicaciones adversas para el medio ambiente y la salud animal. Entre estos pesticidas, los organofosforados, en particular el clorpirifos, han atraído una creciente atención debido a su potencial impacto negativo en la salud reproductiva de animales y humanos.

Los organofosforados son conocidos por su capacidad para inhibir la

acetilcolinesterasa, lo que provoca la acumulación de acetilcolina y una posterior toxicidad neurológica (Eaton et al., 2008). Además de los efectos neurológicos, hay evidencia emergente que indica que estos compuestos pueden actuar como disruptores endocrinos, interfiriendo en los sistemas hormonales y provocando disfunciones reproductivas en varias especies, incluidos los bovinos (Slotkin, 2004; Rezg et al., 2010). Estas disfunciones pueden manifestarse como reducción de la motilidad y viabilidad espermática, disminución de la fertilidad y alteraciones hormonales, afectando directamente la eficiencia reproductiva de los rebaños (Meeker et al., 2004; Balbuena et al., 2015). El clorpirifos (CPF), uno de los organofosforados más ampliamente utilizados, es particularmente relevante en este contexto. Aunque ampliamente reconocido por sus efectos adversos, aún faltan investigaciones que aclaren su impacto específico en la fertilidad animal. A pesar de que algunos estudios indican que el clorpirifos desregula el sistema endocrino, afectando negativamente la espermatogénesis y reduciendo la calidad seminal, el efecto directo del clorpirifos en los espermatozoides sigue siendo poco comprendido. Por lo tanto, este estudio busca investigar los efectos directos del clorpirifos sobre los espermatozoides bovinos.

La validación de la técnica de cromatografía de gases acoplada a la espectrometría de masas (GC-MS) para la detección de clorpirifos en el fluido testicular de bovinos es esencial por varias razones. Primero, garantiza precisión y confiabilidad en la detección del pesticida, asegurando resultados consistentes y evitando falsos negativos o positivos. En segundo lugar, permite el monitoreo eficaz de la contaminación en animales expuestos al pesticida, especialmente en regiones agrícolas donde el clorpirifos puede impactar directamente la salud reproductiva. Tercero, es crucial para evaluar los efectos del clorpirifos en la reproducción y fertilidad, dado que los residuos en el fluido testicular pueden comprometer la calidad de los espermatozoides. Además, la técnica contribuye a la seguridad alimentaria y a la competitividad económica, ya que la contaminación puede afectar la producción de carne y leche, sectores fundamentales para Brasil. Finalmente, permite estudiar los efectos celulares y moleculares del clorpirifos en los tejidos reproductivos.

Así, el presente estudio se justifica por la necesidad de comprender los mecanismos de acción como disruptores endocrinos y sus interacciones con la toxicidad reproductiva del clorpirifos. Comprender estas interacciones es crucial para identificar y proponer metodologías para su identificación en muestras reales como también los mecanismos mediante los cuales el clorpirifos compromete la fertilidad bovina, ofreciendo una base sólida para estrategias que busquen mitigar la infertilidad

asociada con los organofosforados.

## 1.2 OBJETIVOS

### 1.2.1 Objetivo geral

Investigar los efectos del organofosforado clorpirifos en la calidad de los espermatozoides del epidídimo bovino y desarrollar una metodología estandarizada para la identificación y cuantificación de clorpirifos en muestras de fluido testicular bovino mediante el uso de la técnica QuEChERS combinada con GC-MS/MS.

### 1.2.2 Objetivo específicos

- 1) Analizar la influencia de las concentraciones de 12,5  $\mu\text{M}$  y 25  $\mu\text{M}$  de clorpirifos en la actividad mitocondrial de los espermatozoides bovinos.
- 2) Investigar el efecto del clorpirifos (12,5  $\mu\text{M}$  y 25  $\mu\text{M}$ ) en el estrés oxidativo de los espermatozoides bovinos.
- 3) Optimizar la metodología para la extracción y preparación de muestras de fluido testicular utilizando QuEChERS
- 4) Validar la metodología analítica de preparación y análisis de clorpirifos utilizando GC-MS/MS en fluido testicular
- 5) Realizar análisis cromatográficos para la detección de clorpirifos en las muestras biológicas preparadas a partir de fluido testicular.

## 2 DESENVOLVIMENTO

### 2.1 PESTICIDAS

Los pesticidas son compuestos químicos empleados en la agricultura para aumentar la productividad mediante la protección de cultivos y el almacenamiento de alimentos (Abubakar et al., 2020). En Brasil, estos productos se definen como sustancias diseñadas para interferir en procesos vitales de organismos perjudiciales para los cultivos (Brasil, 1989).

La clasificación de los pesticidas se puede realizar desde múltiples perspectivas, como la función o el tipo de plaga que combaten. Estos productos químicos se dividen generalmente en dos categorías principales: sintéticos y naturales, y dentro de los sintéticos se agrupan en cuatro grandes grupos: organofosforados, organoclorados, carbamatos y piretroides como se puede ver en la Tabla 1 con su respectivo mecanismo de acción (Hassaan & El Nemr, 2020; Moreira, S. et al, 2021). Además, los pesticidas también se clasifican por su toxicidad aguda y crónica según las directrices de la Organización Mundial de la Salud (OMS), basándose en la dosis letal media (LD50) y la exposición (Mieldazys et al., 2015; Souto et al., 2021).

El uso de pesticidas se justifica por su capacidad para aumentar la productividad de los cultivos, lo que responde a la necesidad de controlar plagas en los campos agrícolas (Souto et al., 2021). Sin embargo, su aplicación está estrechamente relacionada con efectos tóxicos tanto en el medio ambiente como en la salud humana y animal, lo que ha generado una creciente preocupación crítica sobre su utilización (Hassaan & El Nemr, 2020; Abubakar et al., 2020).

**Tabla 1 –** Diferentes tipos de pesticidas basados en su función y el mecanismo de acción

<b>Tipos de pesticidas</b>	<b>Mecanismos de acción</b>
<b>Organoclorados (OCP)</b>	Alterar la dinámica del intercambio iónico en los axones, en los sistemas nerviosos periférico y central, lo que conduce a una disminución de los potenciales de acción.
<b>Organofosforados (OP)</b>	Induce la inhibición irreversible de la enzima acetilcolinesterasa (AChE), provocando la acumulación de acetilcolina (ACh) en las sinapsis colinérgicas muscarínicas y nicotínicas, sobreestimando en consecuencia los receptores de ACh en el sistema nervioso y las uniones neuromusculares.
<b>Carbamatos</b>	Inhibe reversiblemente la AChE, que cataliza la hidrólisis de la ACh, lo que lleva a su aumento en las sinapsis nerviosas y las uniones neuromusculares, lo que desencadena una mayor estimulación de estas terminaciones nerviosas.
<b>Piretróides</b>	Previene el cierre de los canales de sodio dependientes de voltaje en las membranas axónicas, bloqueando los impulsos nerviosos normales, paralizando y, finalmente, matando al organismo.
<b>Fenilpirazoles</b>	Bloquea los canales de cloruro regulados por ácido gamma-aminobutírico (GABA) no competitivos, lo que genera una estimulación neuronal excesiva y muerte.
<b>Neonicotinoides</b>	Mayor selectividad y potencia para unirse a los receptores nicotínicos de ACh (nAChR), lo que conduce a una gran afluencia de cationes en la membrana postsináptica de las células nerviosas del sistema nervioso central, lo que desencadena una neurotransmisión excitatoria excesiva, que resulta en parálisis y muerte.

Fuente: adaptado de Moreira, S. et al. (2021)

## 2.2 CONTAMINACIÓN POR PESTICIDAS

Aunque históricamente los pesticidas han contribuido significativamente al aumento de la producción agrícola, su uso excesivo e inadecuado puede llevar a la

contaminación del medio ambiente (Bhatt et al., 2021). Este tipo de contaminación perjudica las cadenas ecológicas, afectando a una variedad de organismos, incluidos los humanos (Hassaan y el Nemr, 2020; Parra-Arroyo et al., 2022).

La problemática radica en los efectos sobre organismos no específicos que, al estar expuestos a ambientes contaminados, sufren intoxicaciones, como ocurre con los peces en áreas con altas concentraciones de pesticidas y sus residuos (Souto et al., 2021). Esta contaminación afecta múltiples ecosistemas, ya que los productos químicos se transportan a través del viento y las aguas pluviales, impactando suelos, ríos y otros cuerpos de agua esenciales como recursos naturales (Abubakar et al., 2020). La contaminación se puede encontrar tanto en aguas superficiales como subterráneas (Malhotra et al., 2021).

La contaminación por pesticidas está directamente relacionada con el tipo de exposición, que puede ser aguda, crónica o subcrónica. Estas formas de exposición se clasifican según la vía de entrada: inhalación (exposición respiratoria), ingestión a través de alimentos o agua contaminada (exposición oral) y absorción dérmica, especialmente durante el manejo de pesticidas sin el equipo de protección adecuado. Esto es especialmente preocupante en entornos laborales, donde los trabajadores agrícolas y de la industria de pesticidas suelen estar expuestos a altos niveles de estos compuestos (Sadler & Connell, 2022; Ye et al., 2013).

Los efectos tóxicos pueden incluir síntomas respiratorios como tos, inflamación de las vías respiratorias, e incluso enfermedades más graves como el asma o la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD), que se han observado en trabajadores expuestos a largo plazo (Ming et al., 2023). Además, las exposiciones accidentales, aunque menos frecuentes, son peligrosas y pueden resultar en intoxicaciones agudas que ponen en riesgo la salud inmediata de los afectados (Sadler & Connell, 2022).

Estos riesgos subrayan la necesidad de implementar medidas de seguridad más estrictas, como el uso de equipos de protección personal (EPP) y la formación adecuada en el manejo de pesticidas, especialmente en países en desarrollo donde los riesgos suelen ser mayores debido al uso indebido de estos productos.

El uso de pesticidas en los cultivos deja residuos en los alimentos, lo cual es preocupante por la adherencia de estos químicos a los productos agrícolas. Estudios recientes han demostrado que los residuos de pesticidas no solo se encuentran en alimentos cultivados de manera convencional, sino también en productos orgánicos debido a la contaminación ambiental por deriva de pesticidas y

residuos en el suelo (FAO & WHO, 2024). Estos residuos pueden encontrarse incluso en áreas urbanas alejadas de las zonas agrícolas, lo que indica que los pesticidas pueden ser transportados por aire y agua, contaminando el suministro de alimentos en lugares no directamente vinculados a la producción agrícola (EFSA, 2022). La cantidad y toxicidad de estos residuos dependen de diversos factores, incluyendo el tipo de pesticida y las condiciones ambientales en las que se aplica. Este tipo de contaminación es una preocupación global, lo que ha llevado a la Organización Mundial de la Salud (OMS) y la FAO (La FAO es la agencia de las Naciones Unidas que lidera el esfuerzo internacional para poner fin al hambre.) a establecer límites máximos de residuos permitidos en los alimentos para proteger la salud pública (FAO & WHO, 2024).

El uso masivo de pesticidas en comunidades rurales e indígenas en América Latina ha generado graves preocupaciones de salud y ambientales. En particular, en regiones como Mato Grosso del Sur, Brasil, se ha documentado que el uso intensivo de agroquímicos ha afectado gravemente a las comunidades indígenas, provocando problemas de salud crónicos, como trastornos endocrinos, infertilidad y cáncer, debido a la exposición continua a herbicidas como el 2,4-D. Estos químicos contaminan tanto los suelos como las fuentes de agua, exacerbando la vulnerabilidad de estas comunidades que ya carecen de acceso adecuado a servicios de salud (Savicki, 2023; Observatorio Pantanal, 2023). En Colombia, estudios han mostrado que muchas de las intoxicaciones por agroquímicos no se reportan adecuadamente, especialmente en áreas rurales e indígenas. Esto agrava aún más el problema, ya que la falta de regulación adecuada y la presión de la agroindustria impiden que los trabajadores y comunidades afectadas busquen tratamiento por temor a represalias o pérdida de empleo (Cabrera 2022). Además, se ha observado que los impactos ambientales, como la pérdida de biodiversidad y la degradación de los ecosistemas, son alarmantes en estas áreas. La situación subraya la necesidad urgente de políticas públicas que incluyan a estas comunidades en la gestión de pesticidas y promuevan alternativas agroecológicas más seguras para proteger su salud y sus territorios.

La contaminación ambiental y alimentaria es una cuestión crítica, pero es igualmente importante destacar las preocupaciones sociales relacionadas con las comunidades más expuestas al uso intensivo de pesticidas. Pequeños productores y comunidades cercanas a áreas agrícolas, incluidas las poblaciones indígenas, enfrentan graves riesgos para la salud debido a la exposición constante a pesticidas como el glifosato y la atrazina. La falta de acceso a servicios de salud y la gravedad

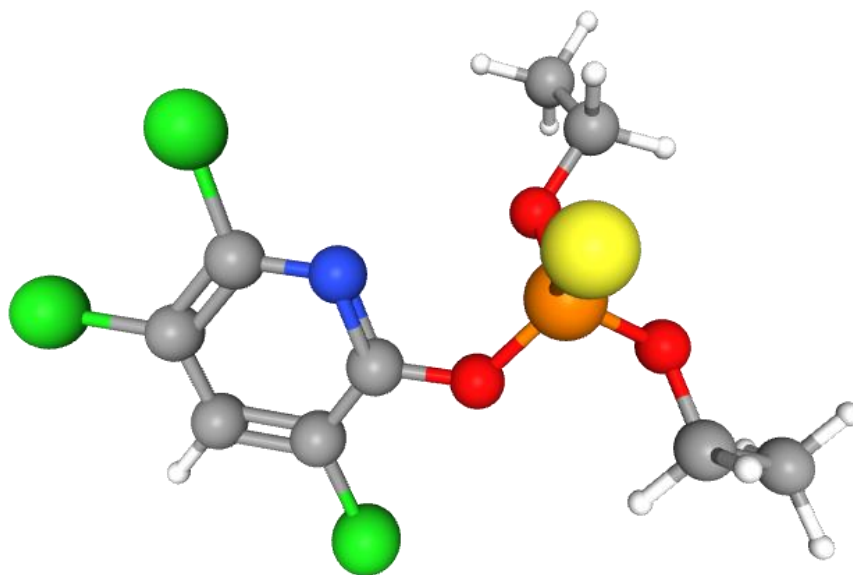
de las intoxicaciones, que a menudo no son reconocidas por los trabajadores, contribuyen a que estos grupos no sean conscientes de los peligros asociados con estos productos químicos (Silva et al., 2023). Además, la carencia de capacitación adecuada en el manejo seguro de pesticidas intensifica los efectos negativos sobre la salud de estas comunidades. La ausencia de políticas públicas efectivas para proteger las áreas indígenas ha resultado en un aumento de enfermedades relacionadas con el uso de pesticidas, especialmente a medida que la aplicación de estos productos se vuelve más frecuente (Melo et al., 2023; Oliveira et al., 2023). Por lo tanto, es esencial que las políticas gubernamentales reconozcan la vulnerabilidad de estas poblaciones y promuevan prácticas agrícolas más seguras y sostenibles para minimizar los riesgos asociados al uso de pesticidas.

## 2.3 CLORPIRIFOS

Los pesticidas organofosforados, como el clorpirifos (CPF), se han utilizado ampliamente en la agricultura para el control de plagas debido a su eficacia. Sin embargo, la persistencia del clorpirifos en el medio ambiente y su capacidad de bioacumulación en los tejidos animales lo convierten en un contaminante ambiental de gran preocupación (Bravo et al., 2011). Estos compuestos pueden causar una variedad de efectos tóxicos en organismos no objetivo, incluido el ganado bovino, y su presencia en alimentos de origen animal plantea serias preocupaciones sobre la seguridad alimentaria (Balbuena et al., 2015).

El clorpirifos, es absorbido tanto por las hojas como por las raíces de las plantas, y su acción principal consiste en bloquear la función de la enzima acetilcolinesterasa en los insectos, lo que provoca la interrupción de la transmisión nerviosa y la muerte de las plagas. Este insecticida es ampliamente utilizado en cultivos como el maíz y el algodón, siendo uno de los más comunes debido a su eficacia a largo plazo y su amplio espectro de aplicación (Shimabukuro & Swanson, 1969; Kumar et al., 2013; Sadeghnia et al., 2021).

**Figura 1** – Estrutura química do clorpirifos



Fuente: Adaptado de PubChem (NCBI, 2024)

La utilización del clorpirifos varía ampliamente entre los países y regiones, con políticas que reflejan las preocupaciones locales sobre la salud pública y el medio ambiente. Aunque Brasil cuenta con legislación sobre el límite máximo de concentración de clorpirifos en el agua potable (Brasil, 2021), su uso es significativamente más amplio y menos controlado en comparación con otros países. Por ejemplo, el límite establecido en la Unión Europea es de 0,1  $\mu\text{g/L}$  en agua potable, mientras que en Brasil este valor asciende a 2  $\mu\text{g/L}$ , lo que representa una diferencia considerable (González et al., 2021). Brasil, como uno de los principales productores de maíz a nivel mundial, se enfrenta a desafíos importantes en cuanto al uso de este insecticida, especialmente porque la Unión Europea es uno de sus mayores mercados de exportación (Magiotto et al., 2020; Silva et al., 2019). La principal preocupación radica en que los residuos de clorpirifos pueden ingresar en la cadena alimentaria a través del maíz, que se utiliza como materia prima en la producción de alimentos para animales, afectando a productos de origen animal como carne, leche y huevos (Moraes et al., 2021; Ferreira et al., 2022).

El clorpirifos fue introducido en el mercado por primera vez en 1965 y, desde entonces, ha sido ampliamente utilizado globalmente en el control de plagas en cultivos agrícolas, en la reducción de plagas domésticas como las termitas, en la disminución de daños causados por insectos en céspedes y en el control de mosquitos. Sin embargo, debido a los riesgos asociados con los organofosforados, el

uso residencial de clorpirifos (por ejemplo, en jardines residenciales, interiores de casas y en productos para el control de plagas urbanas) fue eliminado en los Estados Unidos en 2001 y posteriormente en 2007 en la Unión Europea. A pesar de esto, el clorpirifos continuó siendo utilizado a gran escala en la agricultura en todo el mundo.

Su uso en la agricultura fue prohibido en la Unión Europea en 2020, cuando la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) concluyó que el clorpirifos no cumplía con los criterios de seguridad para la renovación de su registro en la Unión Europea. En los Estados Unidos, en 2022 la Agencia de Protección Ambiental (EPA) anunció la prohibición del uso de clorpirifos en todos los alimentos destinados al consumo humano. Estas restricciones sobre el uso del clorpirifos en la agricultura fueron seguidas por varios países; sin embargo, en algunas regiones de Asia, África y América Latina, su uso sigue estando permitido en la agricultura, aunque frecuentemente bajo regulaciones más estrictas y limitadas a ciertos cultivos o condiciones de uso.

Brasil aún permite el uso de clorpirifos en la agricultura, aunque recientemente revisó sus directrices de seguridad para reducir la exposición y los riesgos asociados al pesticida. La legislación sobre el uso de clorpirifos está regulada por el Instituto Brasileño del Medio Ambiente y de los Recursos Naturales Renovables (IBAMA) y por la Agencia Nacional de Vigilancia Sanitaria (ANVISA). El clorpirifos es un pesticida registrado que se somete a evaluaciones de riesgo para determinar su seguridad en relación con la salud humana y el medio ambiente, y puede tener restricciones de uso en determinadas cultivos y regiones. En 2020 (MAPA, 2020), Brasil prohibió el uso de clorpirifos para ciertas aplicaciones agrícolas (cultivos como frutas y hortalizas) mientras que la ANVISA estableció directrices más rigurosas para monitorear la presencia de residuos de clorpirifos en alimentos y en el medio ambiente, buscando garantizar la seguridad alimentaria y la salud pública. Además de las normas federales, los estados y municipios tienen la capacidad de crear legislaciones propias que pueden restringir aún más el uso de clorpirifos, teniendo en cuenta las particularidades locales y las cuestiones ambientales

### 2.3.1 Metabolitos de Clorpirifos

Los insecticidas como el clorpirifos, al ser aplicados, atraviesan procesos de descomposición tanto bióticos como abióticos. Estas transformaciones originan

compuestos secundarios llamados metabolitos como se puede apreciar en la tabla 2, que, en la mayoría de los casos, presentan menor toxicidad para los ecosistemas que el compuesto original. Sin embargo, en determinadas circunstancias, estos metabolitos pueden resultar más tóxicos, agravando los riesgos ambientales (Sinclair & Boxall, 2003; Yadav et al., 2019). El clorpirifos, en particular, tiene una notable persistencia ambiental, lo que genera preocupación ecológica cuando se encuentran trazas del compuesto o de sus productos de degradación en cuerpos de agua superficiales y subterráneos, así como en cuencas hidrográficas (Rostami et al., 2021; Kumar & Singh, 2016; Sánchez-Bayo & Goka, 2014). Este problema es más pronunciado debido a la capacidad del insecticida de mantenerse en el medio por largos períodos, impactando así la salud de diversos organismos acuáticos (Barmiento et al., 2018; Brogan & Relyea, 2013).

**Tabla 2** – Muestra los principales metabolitos del clorpirifos reportados en la literatura, incluyendo sus fórmulas químicas y las masas exactas calculadas. Estos metabolitos son claves en los estudios de degradación y toxicidad del clorpirifos en diversos sistemas biológicos y ambientales.

Compuesto	Formula	Masa
3,5,6-TCP	C <sub>5</sub> H <sub>2</sub> CL <sub>3</sub> NO	198.4345
DEP	C <sub>4</sub> H <sub>11</sub> O <sub>4</sub> P	154.1015
DETP	C <sub>4</sub> H <sub>11</sub> O <sub>3</sub> PS	170.1671
CPO	C <sub>9</sub> H <sub>11</sub> Cl <sub>3</sub> N <sub>0</sub> O <sub>4</sub> P	332.9491

Fuente: Adaptado de Yu et al., 2022

### 2.3.2 Factores que influyen en la persistencia ambiental del clorpirifos y sus metabolitos

El clorpirifos presenta una alta persistencia en el ambiente, lo cual se explica por su limitada biodegradabilidad y su biodisponibilidad en el suelo y el agua. La biodisponibilidad del clorpirifos está influenciada por su capacidad de adsorberse en partículas del suelo, dependiendo de factores como el pH, la textura y el contenido de materia orgánica del suelo. Por otro lado, su biodegradación genera metabolitos, como el 3,5,6-tricloro-2-piridinol (TCP) mostrada en la tabla 2, que puede ser más tóxico y persistente que el compuesto original, prolongando su impacto ambiental

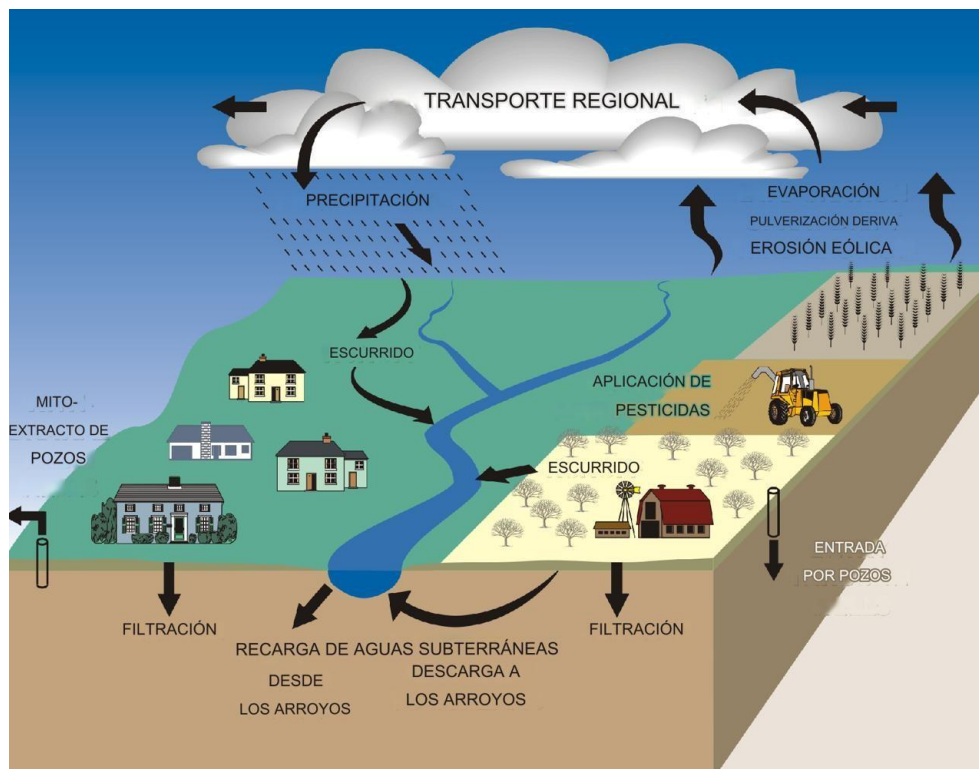
(Gebremariam et al., 2012; Rayu et al., 2017). La lenta degradación del clorpirifos y sus metabolitos se ve afectada por condiciones ambientales como la temperatura y la actividad microbiana, lo que contribuye a su acumulación en cuerpos de agua y suelos, donde puede representar un riesgo tanto para organismos acuáticos como terrestres (Mosquera-Vivas et al., 2016).

Las propiedades del suelo y el ambiente influyen de manera significativa en la adsorción del clorpirifos, lo que afecta su capacidad para ser degradado y su persistencia en el entorno. Uno de los principales factores que limita su degradación es su fuerte adsorción en los sedimentos, que reduce su disponibilidad para los procesos de biodegradación. Los tipos de suelos, en función de su estructura, composición y tamaño de partículas, determinan diferentes grados de movilidad del clorpirifos, lo que impacta su capacidad de dispersión y escurrimiento en ambientes agrícolas (Agudelo et al., 2013; Gutiérrez et al., 2014). Otras variables que afectan su absorción son el pH del suelo, el contenido de carbono orgánico y los compuestos nitrogenados, que pueden alterar tanto la capacidad de retención del insecticida como su degradación en metabolitos (López et al., 2016; Barriuso & Houot, 1996). Además, la humedad y la salinidad del suelo juegan un papel crucial en la movilidad del clorpirifos y sus residuos, mientras que la exposición previa a otros pesticidas puede modificar la dinámica de su adsorción (Lin et al., 2008; Gutiérrez et al., 2014).

La biodegradación es uno de los procesos clave en la restauración de entornos contaminados por clorpirifos, aunque es complejo debido a las interacciones bióticas y abióticas que influyen en su comportamiento en el medio ambiente (Kah et al., 2007; Torres et al., 2021). Este proceso involucra principalmente la acción de microorganismos capaces de descomponer el clorpirifos en metabolitos menos tóxicos, aunque su eficiencia varía dependiendo de las especies microbianas presentes y las condiciones del suelo (Fang et al., 2015; Bejarano et al., 2019). La actividad microbiana también puede verse afectada por factores externos, como el uso de fertilizantes que contienen antibióticos, los cuales pueden alterar la composición microbiana y, en consecuencia, la degradación del pesticida (Jiang et al., 2021; Dar et al., 2019). Por otro lado, los procesos de degradación química del clorpirifos incluyen reacciones como la fotólisis y procesos electrocinéticos, donde la presencia de compuestos como nitrógeno o hierro puede modificar la velocidad y eficacia de estas reacciones (Burrows et al., 2002; Rostami et al., 2021; Kumar et al., 2018). Estos factores externos juegan un papel crucial en la remoción del clorpirifos del ambiente, haciendo que su degradación sea un proceso dinámico y variable dependiendo de las

condiciones específicas del entorno.

**Figura 2** –Desplazamiento de los pesticidas por el ambiente



Fuente: modificado de USGS (U.S. Geological Survey), 1995)

Los dos procesos clave que determinan la persistencia del clorpirifos en el ambiente son su capacidad de adsorción y su degradación. Estos fenómenos explican por qué se siguen encontrando concentraciones de clorpirifos en cuerpos de agua en países donde su uso ha sido prohibido durante años (Vonberg et al., 2014; Sánchez-Bayo & Goka, 2006). Además, tanto el clorpirifos como sus metabolitos tienden a tener una vida media en el ambiente que puede variar entre 10 a 120 días, dependiendo de factores como el pH, humedad y tipo de suelo (Dar; Kaushik; Villarreal-chiu, 2019). Lo que ralentiza su degradación, particularmente en aguas subterráneas, donde las condiciones favorecen su acumulación (Kruger et al., 1993; Chowdhury et al., 2021; Yadav et al., 2015). Esta persistencia prolongada genera preocupaciones sobre su potencial impacto a largo plazo en los ecosistemas acuáticos.

Las condiciones climáticas, como la temperatura y las precipitaciones, juegan un papel clave en el transporte de clorpirifos a través del escurrimiento superficial. Este proceso facilita el arrastre de los residuos de este insecticida hacia

cuerpos de agua, incluidos aquellos destinados al consumo humano, lo que eleva el riesgo de intoxicación en organismos expuestos (Carmo et al., 2013; Cerejeira et al., 2003). Las lluvias intensas pueden transportar tanto clorpirifos como sus metabolitos hacia ríos y fuentes subterráneas, lo que compromete la calidad del agua y representa un peligro tanto para los ecosistemas acuáticos como para la salud pública (Pathak & Dikshit, 2012; Inoue-Choi et al., 2016; Vryzas et al., 2009).

## 2.4 EFECTO TÓXICO DEL CLORPIRIFOS EN EL SEMEN

En el contexto de la reproducción, se ha demostrado que los organofosforados son particularmente perjudiciales para la calidad del semen, reduciendo la motilidad y viabilidad espermática y aumentando el daño al ADN de los espermatozoides (Pina-Guzmán et al., 2005; Meeker et al., 2004). Por lo tanto, el uso de clorpirifos ha generado crecientes preocupaciones sobre sus efectos adversos en la salud reproductiva, tanto en humanos como en animales (Mandal y Das, 2012; Dutta y Sahu, 2013; Ventura et al., 2016). El clorpirifos actúa como un disruptor endocrino, alterando la secreción de hormonas esenciales, como la testosterona, la hormona foliculoestimulante (FSH) y la hormona luteinizante (LH). Estas hormonas desempeñan roles críticos en la regulación de la espermatogénesis y en el mantenimiento de la función reproductiva masculina. Estudios han demostrado que el clorpirifos puede inhibir la síntesis de esteroides sexuales y alterar los niveles hormonales, comprometiendo la homeostasis endocrina necesaria para una función reproductiva saludable (Buratti et al., 2003; Chen et al., 2018).

La espermatogénesis, un proceso altamente complejo y sensible, ocurre en los túbulos seminíferos de los testículos y es fundamental para la producción de espermatozoides funcionales. El clorpirifos afecta negativamente este proceso al inhibir la actividad de la enzima citocromo P450 3A4, crucial para la metabolización de hormonas esteroides y el mantenimiento de la homeostasis hormonal testicular. Esta inhibición puede perjudicar la maduración de los espermatozoides y alterar su morfología, resultando en espermatozoides inmóviles y morfológicamente anormales (Slotkin, 2004; Rezg et al., 2010).

Además de los efectos hormonales, el clorpirifos induce un estrés oxidativo significativo en las células testiculares, incluidas las espermatogonias, espermatoцитos y espermatozoides. El estrés oxidativo resulta de un desequilibrio entre la producción

de especies reactivas de oxígeno (ERO) y la capacidad antioxidante celular, lo que provoca daños en la membrana celular, las proteínas y el ADN. En el contexto de la espermatogénesis, el estrés oxidativo puede causar apoptosis de las células germinales y comprometer la integridad y funcionalidad de los espermatozoides (Alaa-Eldin et al., 2017; Li et al., 2019).

Los espermatozoides son particularmente susceptibles al daño debido a características específicas, como la alta relación superficie/volumen (>50:1) y la presencia significativa de ácidos grasos insaturados (PUFAs) en sus membranas. Estas características aumentan la vulnerabilidad de los espermatozoides al estrés oxidativo y otros agentes ambientales. Además, la mayor abundancia de receptores de andrógenos en los espermatozoides puede amplificar la respuesta a pesticidas como el clorpirifos, exacerbando el daño y comprometiendo la calidad espermática (Meeker et al., 2004; Balbuena et al., 2015).

La creciente evidencia sugiere que el clorpirifos también puede afectar la metilación del ADN espermático y de los descendientes, alterando los patrones epigenéticos que influyen en la fertilidad masculina. Las alteraciones en los patrones de metilación pueden tener consecuencias a largo plazo para la salud reproductiva, afectando tanto la fertilidad como la salud de la descendencia (Ventura et al., 2016).

## 2.5 BIOACUMULACION

La bioacumulación ocurre cuando un organismo absorbe una sustancia más rápido de lo que puede eliminarla, lo que provoca su acumulación en los tejidos a lo largo del tiempo (Kehrig et al., 2011). Este proceso se intensifica en organismos que están expuestos repetidamente a la sustancia, lo que conduce a niveles crecientes del contaminante en su sistema (Streit, 1992). Factores como la lipofilidad, baja solubilidad en agua y resistencia a la degradación son clave para que el clorpirifos se bioacumule en los tejidos grasos de los organismos (Tyohemba et al., 2021). Estudios han documentado la acumulación de clorpirifos en peces y plantas acuáticas, lo que representa un riesgo para animales terrestres y humanos a través de la ingesta de alimentos contaminados (Preez & Vuren, 1992; Giddings et al., 2014). A medida que el clorpirifos se desplaza a través de la cadena alimentaria, la concentración de sus residuos en organismos más grandes puede aumentar, incrementando los riesgos de toxicidad (Solomon et al., 2008; Rubach et al., 2010).

Esta capacidad de persistir y acumularse en el ambiente refuerza las preocupaciones sobre su impacto en la salud ambiental y en los ecosistemas.

En organismos como los anfibios, la acumulación de clorpirifos ocurre de manera significativa a través de la piel, que actúa como una barrera permeable. Este insecticida se distribuye rápidamente en el cuerpo, acumulándose en órganos como el hígado, los riñones y el cerebro, donde se produce una alta actividad metabólica. En estudios realizados con ranas expuestas al clorpirifos, se encontraron concentraciones elevadas en los tejidos musculares, lo que refleja el alto potencial de bioacumulación de este compuesto en estos animales (Jiang et al., 2021; Shi et al., 2019; Widder & Bidwell, 2006). Además, las concentraciones de clorpirifos en los tejidos de los anfibios expuestos fueron considerablemente mayores en comparación con las concentraciones en el agua circundante, lo que pone de relieve el riesgo ambiental que representa este insecticida, especialmente en ecosistemas acuáticos donde los anfibios son clave (Sparling et al., 2001; Relyea, 2005). La bioacumulación del clorpirifos en anfibios también se ha asociado con efectos adversos en el desarrollo y la metamorfosis, lo que puede tener implicaciones a nivel poblacional (Yin et al., 2009; Shenoy, 2012).

En bovinos, la bioacumulación de clorpirifos está directamente relacionada con la exposición a través de la alimentación, ya que los animales pueden ingerir este insecticida a través de pastos y alimentos contaminados, o incluso por consumir agua de fuentes contaminadas. La acumulación de clorpirifos en los tejidos, particularmente en el hígado y los músculos, ha sido documentada en ratones expuestos, dado que el hígado es uno de los principales órganos donde se metabolizan las toxinas (Dikshith et al., 2010; Sharma et al., 2014). El estrés oxidativo provocado por la acumulación de clorpirifos en estos animales puede llevar a hepatotoxicidad, manifestada a través de la alteración de las vías metabólicas y la inducción de procesos apoptóticos en las células hepáticas (Sharma et al., 2019). La exposición prolongada a este insecticida también puede influir negativamente en el sistema reproductivo de las ratas, afectando la fertilidad y el desarrollo embrionario, aunque aún se necesitan más estudios para comprender plenamente estos efectos (Eaton et al., 2008; Joshi.,2007; Uzun & Kalender, 2013).

## 2.6 ANÁLISIS CROMATOGRÁFICA

La cromatografía es una técnica de separación que utiliza dos fases: una fase móvil y una fase estacionaria, para dividir los componentes de una mezcla en función de sus propiedades moleculares (Coskun, 2016). En este proceso, las moléculas de la mezcla se aplican a una superficie o material sólido, donde la fase estacionaria facilita la separación a medida que la fase móvil arrastra las moléculas a través del sistema (Anderson & Armstrong, 2003). Este proceso se basa en características como la adsorción, la partición y las diferencias en afinidad o peso molecular entre los componentes, que determinan el tiempo de retención y separación de cada uno en el sistema cromatográfico (Cuatrecasas et al., 1968). El tiempo de paso de cada componente a través de la fase estacionaria varía en función de estas características moleculares, lo que permite que el equipo cromatográfico cuantifique y separe los distintos elementos de la mezcla con alta precisión (Hage, 2018). La cromatografía se clasifica en diferentes tipos, como la cromatografía en fase normal y en fase inversa, dependiendo de las polaridades de las fases involucradas.

La cromatografía puede clasificarse en diferentes tipos según el tipo de fase estacionaria que se utilice o el método aplicado a la fase móvil. Los principales tipos incluyen la cromatografía de gases (GC), donde se utiliza un gas como fase móvil, y la cromatografía líquida (HPLC), que emplea un líquido presurizado como fase móvil (Coskun, 2016; Dong, 2007). Otros tipos de cromatografía incluyen la cromatografía de intercambio iónico, donde las moléculas se separan en función de sus cargas, y la cromatografía de permeación en gel, que separa moléculas según su tamaño (Hage, 2018; Kazakevich & LoBrutto, 2007). También se incluyen técnicas como la cromatografía de afinidad, basada en interacciones específicas entre moléculas, y la cromatografía en capa fina y cromatografía en papel, que se utilizan principalmente para la separación en fases sólidas y líquidas (Coskun, 2016; Hage, 2018; Freitag, 2020).

Entre las diferentes técnicas de cromatografía, la cromatografía de gases (GC) se ha destacado como una herramienta poderosa para la detección de multirresiduos de insecticidas como el clorpirifos (Niell et al., 2010; Carlos et al., 2015). En estudios relacionados con pesticidas, la GC se utiliza ampliamente debido a su capacidad para separar compuestos volátiles y semivolátiles de manera eficiente. En combinación con detectores como el de espectrometría de masas (GC-MS), la GC permite la identificación precisa y cuantificación de trazas de insecticidas en muestras ambientales y alimentarias (Poiger et al., 2016; Garrido et al., 2021). Dentro de los diferentes enfoques de cromatografía, la cromatografía de gases acoplada a

espectrometría de masas (GC-MS) y la cromatografía de gases con detectores específicos han mostrado ser las técnicas más eficientes para analizar residuos de pesticidas debido a su alta sensibilidad y especificidad en la identificación de compuestos orgánicos (Hollaway et al., 1999; Saraji & Tansazan, 2009; Inoue et al., 2018).

En el análisis de insecticidas organofosforados como el clorpirifos, la cromatografía de gases (GC) se emplea con diferentes tipos de detectores para optimizar la detección de residuos de pesticidas en diversas matrices, como alimentos y muestras ambientales (Abbas et al., 2014; Niell et al., 2010). La selección del detector adecuado ya sea un detector de espectrometría de masas (GC-MS), de captura de electrones (ECD) o de ionización de llama (FID), depende de factores como la sensibilidad, el tiempo de respuesta, el volumen de detección, la eficiencia operativa del sistema, la disponibilidad de instrumentos en el laboratorio de investigación y disponibilidad de parque instrumental en laboratorios de instrumentos científicos. La meta es mejorar la precisión analítica y minimizar las interferencias durante el análisis, asegurando la correcta identificación de los residuos presentes en las muestras (McWilliam et al., 1959; Hollaway et al., 1999). Cada detector tiene su ventaja específica según la naturaleza del compuesto a analizar y el entorno de la muestra. Por ejemplo, el GC-MS es especialmente útil para identificar compuestos en mezclas complejas, mientras que el ECD es ideal para compuestos halogenados como el clorpirifos, gracias a su alta sensibilidad hacia estos elementos (Abbas et al., 2014; Saraji & Tansazan, 2009). La cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS) también se ha destacado por su capacidad para identificar y cuantificar trazas de insecticidas organofosforados en muestras ambientales y alimentarias. Además, la cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas en tándem (GC-MS/MS) amplía aún más las posibilidades analíticas en comparación con el GC-MS convencional. La utilización de espectrometría de masas secuencial permite una mayor sensibilidad y selectividad en la identificación y cuantificación de compuestos, especialmente en matrices complejas (Zhou et al., 2010; Poiger et al., 2016; Garrido et al., 2021).

### 2.6.1 Preparo de Muestra e Método QuEChERS

Antes de llevar a cabo la cromatografía, una fase fundamental para garantizar la precisión en el análisis de residuos de pesticidas en fluido de testículo

bovino es la preparación de la muestra. El método QuEChERS ("Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, and Safe") es ampliamente utilizado debido a su eficacia para aislar y concentrar los residuos de pesticidas en muestras biológicas complejas, incluidas aquellas de fluidos reproductivos (Meira, 2015; Lehotay; Mastovska; Yun, 2005). Este proceso facilita la eliminación de interferencias y permite la purificación adecuada del analito para evitar la contaminación durante el análisis cromatográfico (Novakova; Vickova, 2009).

El método QuEChERS, que se desarrolló inicialmente para la extracción de pesticidas en frutas y verduras, ha sido adaptado exitosamente para otras matrices, incluyendo las biológicas (Lehotay; Mastovska; Yun, 2005). Se basa en una combinación de extracción líquido-líquido y dispersión de sales, lo cual permite una separación eficiente y concentración de pesticidas en la muestra (Gonzalez-Curbelo et al., 2015; Afonso et al., 2018). Esta técnica, en su versión miniaturizada (mini-QuEChERS), es especialmente relevante para el análisis de muestras biológicas debido a la limitada cantidad de material disponible, como es el caso del fluido de testículo bovino. La miniaturización no solo permite trabajar con volúmenes reducidos de muestra, sino que también disminuye el uso de insumos y la generación de residuos, lo cual la hace una opción más sostenible y segura en laboratorios (Ferrer et al., 2020; Urrutia et al., 2021). Aunque este método se ha adaptado a diferentes matrices biológicas, su uso en la evaluación de pesticidas en fluido de testículo bovino es crucial para estudiar el impacto de los contaminantes en la fertilidad y función reproductiva de estos animales, permitiendo un análisis detallado del potencial impacto de compuestos como el clorpirifos (Ferrer et al., 2020; Urrutia et al., 2021).

### 2.6.2 Validación de la Metodología

Cuando se desarrollan o implementan por primera vez nuevos métodos analíticos en un laboratorio, es crucial establecer un alto nivel de confianza en la metodología empleada. Esta confianza se basa en criterios técnicos que aseguran la calidad y reproducibilidad de los procesos analíticos, lo que resulta fundamental para validar los métodos cromatográficos utilizados en la investigación (Valentini et al., 2022). Por ello, los métodos validados son esenciales para garantizar la confiabilidad de las técnicas, especialmente en el análisis de residuos de pesticidas en muestras biológicas como los espermatozoides bovinos (Peris-Vicente et al., 2022).

La validación de un método analítico implica establecer, mediante estudios

de laboratorio, que las características de desempeño del método cumplen con los requisitos para las aplicaciones analíticas previstas (Eurachem, 2022). Esto incluye la evaluación de parámetros como la exactitud, precisión, sensibilidad y selectividad, que son esenciales para asegurar que los resultados obtenidos sean confiables y útiles para la toma de decisiones (Ribani et al., 2004). Además, el control de calidad interno es fundamental en el proceso de validación, ya que permite supervisar continuamente las operaciones y resultados de medida, asegurando que estos sean suficientemente fiables como para ser liberados (INMETRO, 2020). La implementación de un plan de validación que incluya la capacitación del personal y el uso de patrones de referencia confiables es crucial para mantener la integridad y la calidad de los análisis realizados en el laboratorio (Lancas, 2004).

A nivel internacional, la AOAC International (Asociación de Químicos Analíticos Oficiales) es una organización clave cuyo objetivo es desarrollar métodos analíticos oficiales que sean adoptados por agencias reguladoras. Estos métodos están diseñados para garantizar la confiabilidad analítica en análisis de alimentos, medicamentos y sustancias peligrosas, promoviendo la seguridad a nivel global (Baur; Ensminger, 1977). Las directrices actuales de la AOAC están contenidas en su libro *Official Methods of Analysis*, que proporciona estándares y procedimientos analíticos reconocidos internacionalmente para la evaluación de productos químicos, incluyendo pesticidas y otras sustancias potencialmente peligrosas (AOAC, 2023). Este enfoque garantiza que los laboratorios que realizan análisis de residuos de pesticidas, como el clorpirifos, cumplan con los estándares internacionales de precisión y reproducibilidad, esenciales para asegurar la validez de los resultados en estudios sobre seguridad alimentaria y toxicidad (AOAC, 2023).

La validación de métodos analíticos se lleva a cabo a través de una serie de criterios conocidos como parámetros de desempeño analítico. Estos incluyen la selectividad, que mide la capacidad del método para diferenciar el analito de interés de otros componentes en la muestra; la linealidad, que evalúa la capacidad del método para generar resultados proporcionales a la concentración del analito; el límite de detección (LD), que es la concentración mínima detectable; el límite de cuantificación (LQ), que es la cantidad mínima que puede cuantificarse con precisión; así como la precisión y la exactitud, que garantizan la reproducibilidad y la proximidad del resultado al valor verdadero (Ribani et al., 2004; Ribeiro et al., 2007; Araujo, 2009; Brasil, 2017; INMETRO, 2020).

La linealidad en los métodos analíticos hace referencia a la capacidad de

un método para producir resultados directamente proporcionales a la concentración de la sustancia analizada dentro de un rango específico. Esto permite establecer una correlación entre la señal medida y la concentración del analito (Epshtein, 2019). Para asegurar una alta precisión y minimizar errores en el análisis, es común emplear al menos cinco puntos en la construcción de la curva analítica, excluyendo el cero (Araujo, 2009). La regresión lineal se utiliza para estimar los coeficientes de la curva, incluidos los parámetros  $a$  y  $b$ , y el coeficiente de determinación ( $R^2$ ), el cual, cuando está cercano a 1, indica una baja dispersión en los datos experimentales, sirviendo como un indicador de la calidad de la curva (Shrivastava; Gupta, 2022).

El límite de detección (LD) se refiere a la concentración más baja de una sustancia que puede ser detectada por un instrumento, aunque no necesariamente cuantificada. Por otro lado, el límite de cuantificación (LQ) representa la menor concentración que puede medirse con precisión y fiabilidad (INMETRO, 2020). Estos límites pueden determinarse mediante métodos experimentales, como diluciones seriadas, o mediante ecuaciones matemáticas que permiten estimar los valores más bajos detectables por un instrumento (Álvaro-Alonso et al., 2022). La ANVISA recomienda una relación entre los límites y el blanco o el menor punto de la curva analítica: 10:1 para el límite de detección y 3,3:1 para el límite de cuantificación, lo que asegura una mayor confiabilidad en la identificación y cuantificación de los compuestos (Brasil, 2017).

La precisión mide la dispersión de los resultados obtenidos bajo condiciones específicas y puede evaluarse mediante el desvío estándar absoluto, el intervalo de confianza de la media o el desvío estándar relativo (DPR), dependiendo del número de mediciones realizadas (Ribani et al., 2004; INMETRO, 2020). En la validación de métodos analíticos, la precisión se evalúa en tres niveles: Repetibilidad, que refleja la concordancia de las mediciones sucesivas bajo las mismas condiciones. Precisión intermedia, que mide las variaciones dentro del mismo laboratorio relacionados con análisis en diferentes días o diferentes analistas o diferentes equipos o una combinación de estos factores. Reproducibilidad, que se refiere a la concordancia entre mediciones de la misma muestra realizadas en diferentes condiciones, como en distintos laboratorios (Ribani et al., 2004; INMETRO, 2020). La ANVISA sugiere ciertos criterios para verificar la repetibilidad y la precisión intermedia, como un mínimo de nueve determinaciones distribuidas en los puntos bajo, medio y alto de la curva analítica para garantizar la fiabilidad del método (BRASIL, 2017).

La exactitud en la validación de métodos analíticos se refiere a la

proximidad entre los resultados obtenidos mediante un método analítico y el valor verdadero o aceptado como referencia (Araujo, 2009). En términos simples, la exactitud mide qué tan cercano está el resultado experimental del valor teórico o real de la muestra analizada. Es un parámetro clave para asegurar que el método proporciona resultados fiables y representativos de la concentración o propiedades del analito estudiado (Ribani et al., 2004). Este parámetro es esencial para garantizar la calidad de los análisis en estudios de residuos de pesticidas, ya que los errores sistemáticos pueden afectar la confianza en los resultados obtenidos.

## 2.7 ANÁLISIS EN EL MICROSCOPIO DE FLUORESCENCIA

La microscopía de fluorescencia ha emergido como una técnica clave en el campo de la andrología, proporcionando una metodología eficaz para el análisis detallado de la calidad espermática. Esta herramienta permite estudiar grandes cantidades de espermatozoides en poco tiempo, reduciendo la variabilidad subjetiva y mejorando la precisión en la evaluación de distintos parámetros celulares. La ventaja principal de este enfoque radica en su capacidad para utilizar múltiples fluoróforos, que permiten la evaluación simultánea de diferentes características estructurales y funcionales de los espermatozoides (Gillan et al., 2005; Peña et al., 2016). Con esta técnica, es posible realizar un seguimiento detallado del comportamiento celular, ya que los espermatozoides marcados con fluorocromos específicos son visualizados bajo un sistema óptico especializado. La detección fluorescente ofrece una visualización clara de los parámetros celulares, permitiendo estudios como la integridad de la membrana plasmática y acrosomal, el estado energético mitocondrial y la fragmentación del ADN, lo que ayuda a evaluar la capacidad de fertilización de manera más precisa (Freitas-Dell'Aqua et al., 2009).

Actualmente, esta tecnología ha permitido avances significativos en la evaluación de la integridad celular y la calidad funcional de los espermatozoides. Parámetros como la integridad de las membranas plasmática y acrosomal, esenciales para el éxito de la fertilización, son medidos con fluorocromos que se unen a regiones específicas de la célula, proporcionando información valiosa sobre el potencial reproductivo. Además, el análisis de otros indicadores como el estrés oxidativo y la integridad del ADN proporciona un diagnóstico más completo del estado de los espermatozoides (Castro et al., 2016; Kumaresan et al., 2017). La microscopía de

fluorescencia se utiliza ampliamente para la evaluación de la integridad de la membrana plasmática en estudios celulares, gracias a la capacidad de sus fluoróforos para diferenciar entre células viables y no viables. Las sondas fluorescentes no penetran en células con membranas íntegras, pero se ligan al ADN en células con membranas dañadas, generando una señal fluorescente detectable que proporciona una clara distinción (Reis et al., 2018; Guimarães et al., 2020). Este método es fundamental en la investigación de la calidad espermática, especialmente en la evaluación de la fertilidad. El yoduro de propidio (IP) es una de las sondas fluorescentes más utilizadas para este tipo de análisis. Este compuesto emite fluorescencia roja cuando se une al ADN de células con membranas plasmáticas comprometidas, lo que permite identificar con precisión las células dañadas. Su alta especificidad y sensibilidad lo convierten en una herramienta indispensable en estudios de andrología (Eckel et al., 2017; Silva; Oliveira, 2022). En el contexto de la reproducción bovina, el IP se ha destacado por su eficacia en la evaluación de la viabilidad celular en espermatozoides, lo que lo convierte en un componente clave para la investigación de la fertilidad en animales (Carvalho et al., 2015; Oliveira et al., 2021).

El análisis de la integridad de la membrana acrosomal en espermatozoides ha avanzado significativamente con el uso de técnicas de microscopía de fluorescencia. Una de las estrategias más empleadas involucra el uso de lectinas vegetales marcadas con fluoróforos específicos, que se unen a glicoproteínas presentes en la membrana transversal. La aglutinina de *Pisum sativum* (FITC-PSA) es una lectina fluorescente que reconoce moléculas como  $\alpha$ -manosa y  $\alpha$ -galactosa en la membrana, lo que permite identificar de manera precisa los espermatozoides que presentan daños en el cromosoma (Cross et al., 1986; Graham, 2001). Este método fluorescente tiene la ventaja de no penetrar en membranas intactas, lo que garantiza que solo los espermatozoides con alteraciones transomales emiten fluorescencia verde-amarillo. Por esta razón, ha sido ampliamente utilizado en investigaciones relacionadas con la calidad del semen, especialmente en estudios bovinos, donde se ha demostrado su efectividad para detectar espermatozoides con daños acrosomales (Thomas et al., 1997; Arruda; Celeghini, 2003). Esta técnica no solo permite evaluar la integridad física de la membrana transversal, sino que también proporciona información sobre la capacidad funcional de los espermatozoides, clave para su desempeño en la fertilización (Samardzija et al., 2006).

Las mitocondrias de los espermatozoides están organizadas en forma

helicoidal en la pieza intermedia y son fundamentales para el mantenimiento del estado energético de la célula, ya que producen ATP, la fuente principal para los movimientos flagelares, además de estar estrechamente relacionados con la fertilidad (Freitas -Dell'aqua et al., 2009; GU et al., 2022). La función mitocondrial puede ser evaluada con el uso de diversas sondas fluorescentes, como Rodamina 123, MitoTracker Green FM y JC-1, cada una con propiedades específicas para medir el estado de la membrana mitocondrial (Angrimani et al., 2015). El JC-1 ha sido identificado como uno de los fluoróforos más sensibles para la medición del potencial de membrana mitocondrial en espermatozoides criopreservados, (Garner et al., 1997). Esta sonda cambia sus características fluorescentes en respuesta a las variaciones en la polarización de la membrana mitocondrial interna, siendo dependiente del gradiente electroquímico. En mitocondrias con alto potencial de membrana, el JC-1 forma agregados que emiten una fluorescencia roja-anaranjada, mientras que, en mitocondrias con menor actividad o potencial bajo, la sonda permanece en su forma monomérica y emite fluorescencia verde (Arruda et al., 2007).

La sonda MitoTracker está compuesta por un colorante catiónico lipofílico, que puede atravesar la membrana plasmática de las mitocondrias en células vivas, acumulándose debido al alto potencial de membrana en la membrana interna mitocondrial. La sonda consiste en una gran estructura aromática plana con dos átomos de nitrógeno cargados positivamente. Estas especies catiónicas permiten que el MitoTracker se acumule en mitocondrias activas de manera dependiente del potencial. Adicionalmente, el grupo funcional clorometilfenilo permite que el MitoTracker reaccione con tioles en las mitocondrias y se una permanentemente a ellos. Así, una vez dentro de las mitocondrias, la sonda se une a proteínas mitocondriales, resultando en fluorescencia con una intensidad proporcional a la concentración del colorante dentro de las mitocondrias, lo que permite visualizar la masa, morfología y actividad de las mitocondrias (Neikirk et al., 2023).

Diversas sondas fluorescentes son capaces de acumularse intracelularmente y emitir fluorescencia en respuesta a la oxidación por especies reactivas de oxígeno (ERO). Estas sondas varían en su especificidad, algunos detectan tipos específicos de ERO, mientras que otras reaccionan de manera más general a la presencia de estos radicales libres (Martínez-Pastor et al., 2010). Un avance reciente en este campo es la validación de la sonda CellROX Green para la detección del estrés oxidativo en espermatozoides bovinos, que ha demostrado ser más sensible y eficiente en comparación con otras sondas como el H2DCFDA (Castro

et al., 2016). Esta sonda penetra en la célula, y una vez oxidada por los radicales libres, se une al ADN, lo que genera una fluorescencia verde intensa que permite una evaluación detallada del estrés oxidativo. La preservación de la integridad del material genético en los espermatozoides es crucial para asegurar el éxito reproductivo. Eventos clave como la fertilización y el desarrollo embrionario dependen directamente de la estabilidad y funcionalidad del ADN (Bochenek et al., 2001; Garcia et al., 2023). Los espermatozoides con una cromatina correctamente formada presentan un ADN resistente a la desnaturación, protegiéndolo de posibles daños. Por el contrario, en aquellos espermatozoides que presentan anomalías en la estructura de la cromatina, el ADN es más susceptible a la fragmentación y desnaturación, lo que compromete su capacidad para llevar a cabo la fecundación de manera efectiva (Martinez-Pastor et al., 2010; Kasai et al., 2002).

### **3 METODOLOGIA**

#### **3.1 DELINEAMIENTO EXPERIMENTAL DE TRATAMIENTO CON CLORPIRIFOS**

Este experimento fue realizado para evaluar el efecto de diferentes concentraciones de clorpirifos (12,5 y 25  $\mu\text{M}$ ) sobre la calidad de los espermatozoides del epidídimo bovino. Las concentraciones de clorpirifos seleccionadas se basaron en estudios de dosis-dependencia previamente descritos en células germinativas de cerdos (Zhang et al., 2023). Los espermatozoides fueron diluidos a una concentración de  $5 \times 10^6$  células/mL y se distribuyeron en alícuotas de 1 mL que contenía 0, 12,5 y 25  $\mu\text{M}$  de clorpirifos. De esta manera, se establecieron tres tratamientos experimentales: (1) Control; (2) 12,5  $\mu\text{M}$  de clorpirifos; y (3) 25  $\mu\text{M}$  de clorpirifos. Los grupos experimentales fueron incubados durante 2 horas a 38,5 °C en una atmósfera con 5% de  $\text{CO}_2$ , y cada tratamiento fue replicado tres veces. Para la evaluación de la presencia de clorpirifos en el fluido testicular, se utilizaron testículos de 15 animales (1 par por animal), donde cada animal fue considerado una unidad experimental

##### **3.1.1 Colecta De Los Testículos**

Quince pares de testículos de bovinos adultos con epidídimos intactos

fueron recolectados de un matadero local (Frigobendo Frigorífico Bendo LTDA, Santa Terezinha de Itaipu - PR). Los testículos fueron transportados al laboratorio en la caja térmica mantenidas a temperatura adecuada y procesados dentro de un intervalo de 2 horas para la recolección de los espermatozoides.

### 3.1.2 Colecta De Los Espermatozoides

Los epidídimos fueron cuidadosamente removidos de los testículos, y la porción de la cola del epidídimo fue disecada utilizando un bisturí. La seleccionada de los epidídimos disecados se lavaron con solución salina tamponada con fosfato (PBS; 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> y 1,8 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7,4) y posteriormente colocados en placas de Petri. Luego, el tejido epididimario fue cortado con un bisturí, y el fluido que contiene los espermatozoides recolectados aplicando una ligera presión sobre la parte caudal de los epidídimos. El fluido epididimario fue transferido a tubos Eppendorf de 2 mL y centrifugado a 1.500 x g durante 10 minutos a 37 °C para la recolección de los espermatozoides epididimarios. Después de la centrifugación, el sobrenadante fue descartado, y los pellets de espermatozoides lavados dos veces con 2 mL de TALP (Tyrode Albumina Lactato Piruvato), a 1.500 x g durante 10 minutos a 37 °C, para asegurar la eliminación del fluido epididimario.

### 3.1.3 Colecta de fluido testicular

Luego de extraer el epidídimo del testículo, se procedió a retirar el fluido testicular colocando el testículo en una bandeja de plástico. Cada par de testículos fue separado de manera individual, asegurando que cada par perteneciera al mismo animal. Con la ayuda de un bisturí, se realizaron cortes transversales en el testículo y, aplicando presión manual, se colectó el fluido gota a gota en un tubo Falcon de 15 mL hasta completar el volumen requerido. Los testículos exprimidos fueron descartados, y las muestras obtenidas fueron centrifugadas y congeladas hasta el momento de su procesamiento para análisis.

### 3.1.4 Incubación De Los Espermatozoides

Después de la recolección y el lavado de los espermatozoides de la cabeza del epidídimo, las células espermáticas se resuspendieron en medio TALP-Stock para

alcanzar una concentración final de  $5 \times 10^6$  espermatozoides/mL. Las suspensiones de espermatozoides se incubaron a  $38,5 \text{ }^\circ\text{C}$  en una atmósfera con 5% de  $\text{CO}_2$  en aire y alta humedad durante un período de 2 horas, de acuerdo con el diseño experimental establecido.

### 3.1.5 Evaluación De La Actividad Mitocondrial

La evaluación de la función mitocondrial de los espermatozoides se realizó utilizando la sonda fluorescente MitoTracker Red (Life Technologies, Nueva York, EE.UU.). Para el ensayo de actividad mitocondrial, se agregaron  $2 \text{ }\mu\text{L}$  de Hoechst 33342 ( $40 \text{ }\mu\text{g/mL}$ ) a  $150 \text{ }\mu\text{L}$  de semen diluido en medio TALP ( $5 \times 10^6$  espermatozoides/mL) y se incubaron a  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  durante 10 minutos para la tinción nuclear. Posteriormente, se añadieron  $2 \text{ }\mu\text{L}$  de MitoTracker a la suspensión, con una nueva incubación durante 10 minutos a  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  para la tinción mitocondrial. Después de la incubación, se depositaron  $10 \text{ }\mu\text{L}$  de la suspensión espermática entre la lámina y laminula, eliminando el exceso con papel absorbente, removiendo el exceso con papel absorbente. El análisis fue realizado bajo el microscopio de fluorescencia, con excitación a  $355 \text{ nm}$  y  $520 \text{ nm}$ , y emisión a  $452 \text{ nm}$ , y  $610 \text{ nm}$ , correspondientes a las fluorescencias azul (Hoechst), y roja (MitoTracker), evaluándose 200 células para determinar la integridad mitocondrial.

### 3.1.6 Evaluando De Las Espécies Reativas De Oxígeno

Las especies reactivas de oxígeno (ROS) se evaluaron utilizando la sonda fluorescente CellROX® Green Reagent® (Life Technologies, Nueva York, EE.UU.), que se une al ADN oxidado por radicales libres intracelulares, emitiendo una fluorescencia verde intensa. Para el ensayo,  $150 \text{ }\mu\text{L}$  de semen diluido en TALP ( $5 \times 10^6$  espermatozoides/mL) se incubaron con  $2 \text{ }\mu\text{L}$  de CellROX ( $25 \text{ }\mu\text{M}$ ) a  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  durante 30 minutos. Tras la incubación, se montaron  $10 \text{ }\mu\text{L}$  de la suspensión espermática entre lamina y laminula, eliminando el exceso con papel absorbente. Se evaluaron 200 células bajo un microscopio de epifluorescencia.

### 3.1.7 Análisis Estadística

El análisis estadístico de los datos se realizó utilizando el software

SigmaPlot 14.0 (Systat Software, Inc., California, EE. UU.). Inicialmente, los datos fueron sometidos a la prueba de normalidad de Shapiro-Wilk y a la prueba de homogeneidad de varianza de Brown-Forsythe, con el fin de verificar el cumplimiento de los supuestos necesarios para la aplicación de las pruebas paramétricas. Las variables que no cumplieron con estos supuestos (alta actividad mitocondrial) se transformaron logarítmicamente (logaritmo en base 10 - log10) para su normalización. Posteriormente, los datos se analizaron mediante Análisis de Varianza unidireccional (ANOVA), seguido de la prueba de comparación múltiple de Tukey. Los resultados se presentan como media porcentual  $\pm$  error estándar de la media (SEM).

## 3.2 DESENVOLVIMIENTO DE METODOLOGÍA PARA EXTRACCIÓN Y DETERMINACIÓN DE CLORPIRIFOS

### 3.2.1 Extracción con Acetonitrilo y Sales de Limpieza

En la primera prueba, se tomaron alícuotas de 500  $\mu$ L de plasma seminal bovino fortificado con 1  $\mu$ g L<sup>-1</sup>. A cada muestra se le añadieron 2 mL de acetonitrilo (ACN) como solvente orgánico, debido a la naturaleza no polar del clorpirifos, lo que facilita su solubilización en este medio. La mezcla se agitó vigorosamente durante 1 minuto para garantizar una homogeneización adecuada y promover la interacción entre el pesticida y el solvente. Posteriormente, se añadieron sales para *salting out*, específicamente sulfato de magnesio anhidro y cloruro de sodio. Estas sales tienen la función de promover la separación de fases y eliminar interferentes hidrofílicos presentes en la matriz biológica. La adición de sales aumenta la fuerza iónica de la solución, lo que favorece la transferencia del clorpirifos a la fase orgánica.

Después de la adición de las sales, las muestras fueron centrifugadas a 4000 rpm durante 10 minutos. Este paso permitió la separación clara en dos fases: una fase orgánica superior que contenía el acetonitrilo y el clorpirifos extraído, y una fase que contenía la matriz biológica y otros compuestos.

### 3.2.2 Extracción Con Adición De Agua, Acetonitrila Y Sales De Limpieza

En la segunda prueba, se realizaron modificaciones al protocolo inicial con el fin de mejorar la eficiencia de extracción y la separación de fases. Se utilizaron

nuevamente alícuotas de 500  $\mu\text{L}$  de plasma seminal bovino fortificado con 1  $\mu\text{g L}^{-1}$ . A cada muestra se le añadieron 2 mL de acetonitrilo y, adicionalmente, 1 mL de agua desionizada. La adición de agua tuvo como objetivo mejorar la separación de fases durante la centrifugación y aumentar la eficiencia en la extracción del clorpirifos al facilitar la formación de una fase acuosa más definida. La mezcla se agitó vigorosamente durante 1 minuto para garantizar una homogeneización adecuada. Se añadieron nuevamente 400 mg de sulfato de magnesio anhidro y 100 mg de cloruro de sodio para *salting out*. Las muestras fueron centrifugadas a 4000 rpm durante 10 minutos

### 3.2.3 Extracción Optimizada Con Limpieza Adicional Mediante PSA Y C18

Fue realizado un teste donde fue mezclado los reactivos de limpieza, donde se incorporó una etapa adicional de limpieza para mejorar la pureza del extracto y eliminar posibles interferentes residuales. Después de realizar la extracción según el protocolo del Test 2, se procedió a la limpieza del extracto orgánico utilizando adsorbentes dispersivos. Se añadieron 30 mg de PSA (Primary Secondary Amine), 30 mg de C18 y 30 mg de sulfato de magnesio anhidro a la fase orgánica recolectada. El PSA es efectivo para eliminar ácidos orgánicos, azúcares y otros compuestos polares, mientras que el C18 ayuda a retener compuestos no polares y ciertos lípidos que podrían interferir en el análisis (Martinez; et.al 2012). La mezcla con los adsorbentes se agitó durante 1 minuto para asegurar un contacto efectivo entre el extracto y los materiales de limpieza. Este proceso permite que los compuestos interferentes sean retenidos por el PSA y el C18, mientras que el clorpirifos permanece en la fase orgánica. La mezcla fue centrifugada a 4000 rpm durante 10 minutos para separar los adsorbentes sólidos del extracto limpio. El sobrenadante, ahora con una pureza superior y libre de interferentes, fue recolectado cuidadosamente.

### 3.2.4 Preparo De Muestras

El procesamiento de las muestras de fluido del testículo siguió una metodología adaptada del método QuEChERS (Ibal y otros, 2020). Los tubos Falcon, que contenían el fluido testicular, fueron retirados del congelador y dejados a temperatura ambiente hasta alcanzar la temperatura ambiente. Los volúmenes utilizados dependen del número de muestras recolectadas previamente de los testículos de bovinos, obteniendo aproximadamente entre 80 y 100 mL de los 15

animales. A partir de esto, el material fue centrifugado a 4000 rpm a 25°C durante 10 minutos. Se recolectaron 500 µL de la fase sobrenadante y se transfirieron a un tubo Falcon con 2 mL de acetonitrila y 1 mL de agua ultrapura, y se homogeneizó durante 30 segundos en un vórtex.

En la siguiente etapa, se añadieron 400 mg de sulfato de magnesio ( $\text{MgSO}_4$ ) anhidro y 100 mg de cloruro de sodio (NaCl) al tubo Falcon con las muestras, que fueron agitadas inmediatamente en un vórtex durante 30 segundos. Posteriormente, fueron centrifugadas durante 10 minutos a 4000 rpm. 1500 µL de la fase orgánica generada por la decantación se transfirió a un vial y se concentró en un concentrador de muestras durante 40 minutos a 3000 rpm y 35°C. La etapa final consistió en resuspender la muestra con 20 µL TFF [750] y 180 µL de n-hexano, completando así un volumen de 200 µL en el vial. Esta mezcla se agitó durante 10 segundos en un vórtex, luego se extrajo la mayor cantidad posible de la muestra con una pipeta y se transfirió a una jeringa de 2 mL con un filtro hidrofóbico de PTFE de membrana de 0,22 µm. Los viales con las muestras se mantuvieron en el congelador a -20°C hasta el momento de la inyección en el equipo cromatográfico para su análisis.

### 3.2.5 Validación De La Metodología

El método mini-QuEChERS también se aplicó para la construcción de la curva analítica en muestras biológicas provenientes de los testículos de los animales analizados. La metodología se condujo de la misma manera, pero se añadieron cinco concentraciones diferentes del estándar interno: 5 µg L<sup>-1</sup>, 10 µg L<sup>-1</sup>, 25 µg L<sup>-1</sup>, 50 µg L<sup>-1</sup> y 75 µg L<sup>-1</sup>. Este proceso se realizó en frascos de 2 mL que contenían las muestras previamente ajustadas en volumen, y cada concentración se realizó por triplicado. Un método analítico se considera lineal cuando los resultados obtenidos son directamente proporcionales a la concentración del analito en la muestra, dentro de un rango establecido (ICH, 2005). El rango de trabajo establecido, con base en los ensayos de optimización, fue de 5 a 75 µg L<sup>-1</sup>, para que la linealidad en el rango de trabajo sea válida, el coeficiente de determinación debe confirmar el ajuste del modelo, y los residuos deben ser aleatorios, homocedásticos e independientes. El estudio de la recuperación se realizó en tres niveles diferentes de fortificación (primer punto, punto medio y último punto de la curva analítica). La recuperación se calculó mediante la ecuación:

$$R (\%) = \text{valor observado} / \text{valor esperado} * 100\%$$

El criterio de aceptación para la recuperación adoptado está vinculado al nivel de concentración, según lo sugerido por el INMETRO y la AOAC. La precisión se evaluó con base en la repetibilidad, en triplicata, en tres niveles de concentración (igual que en el ensayo de recuperación) y mediante la precisión intermedia al variar la condición de diferentes tiempos en el análisis. Los límites de detección y cuantificación fueron obtenidos por el método visual, considerando la menor concentración obtenida con exactitud y precisión como LQ. Para el LD se consideró la menor concentración obtenida con picos definidos y sin ruido de señal.

### 3.2.6 Condiciones cromatográficas.

La determinación cromatográfica de los analitos se realizó en un cromatógrafo en fase gaseosa acoplado a espectrometría de masas en tándem (GC-MS/MS), modelo GCMS-7000 triple cuadrupolo de Agilent. La separación en el GC se realizó mediante una columna HP-5MS (Agilent, UI 30 m x 0,25 mm x 0,25  $\mu\text{m}$ ).

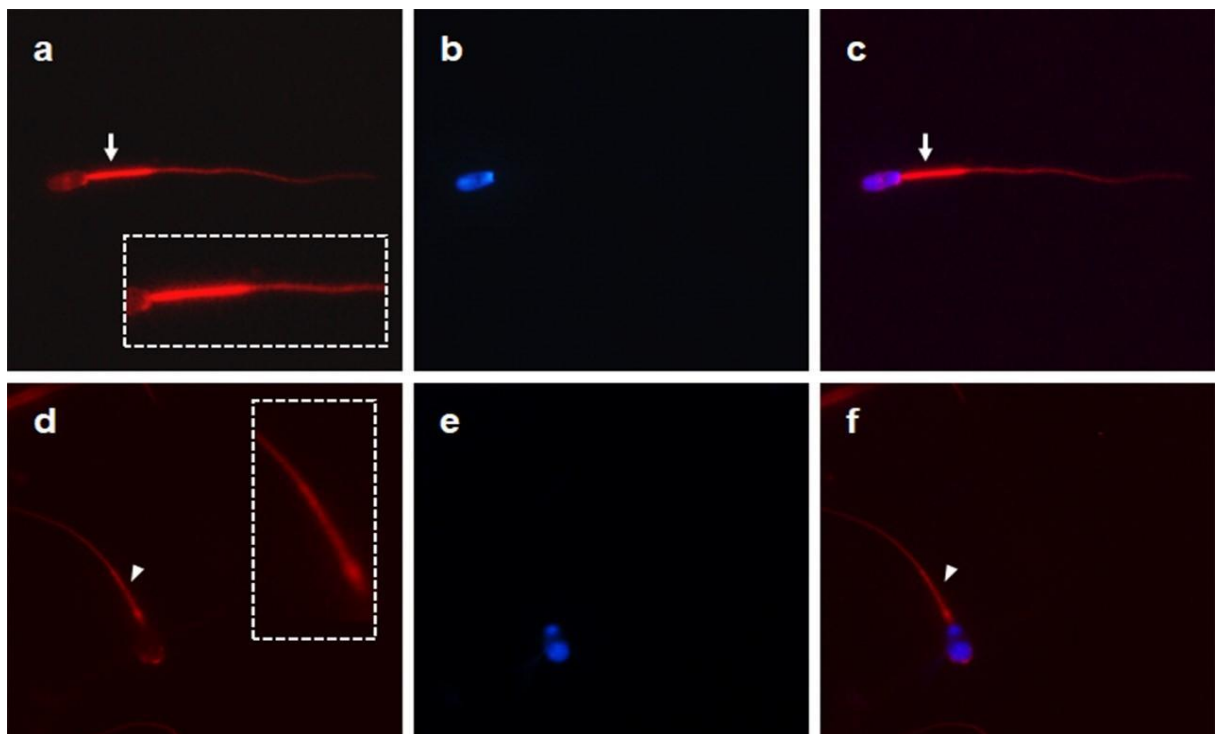
Las condiciones cromatográficas utilizadas en el GC-MS/MS fueron: la tasa de flujo para el gas de arrastre (He) constante (2,5 mL min<sup>-1</sup>), con un alto grado de pureza. La temperatura de inyección fue de 250 °C, en modo splitless y con un volumen de inyección de 1,0  $\mu\text{L}$ . La temperatura de la línea de transferencia fue de 280 °C y la temperatura de la fuente de ionización de 230 °C, con una energía de ionización de 70 eV. El programa de calentamiento comenzó a 70 °C durante 2 minutos, programado para aumentar a una tasa de 16 °C min<sup>-1</sup> hasta 180 °C mantenido durante 3 minutos, con una rampa de 1 °C min<sup>-1</sup> hasta 200 °C durante 5 minutos, con una rampa de 10 °C min<sup>-1</sup> hasta 280 °C (0 min), y una rampa de 5 °C min<sup>-1</sup> hasta 300 °C mantenido durante 1 minuto. El tiempo total de análisis fue de 37 minutos. Después del análisis, todos los datos fueron procesados utilizando los softwares de análisis de datos: Unknowns, MassHunter Cualitativo y MassHunter Cuantitativo. La biblioteca NIST fue utilizada para el control y procesamiento de los datos.

## 4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1 EFECTO DEL CLORPIRIFOS EN LA ACTIVIDAD MITOCONDRIAL DE ESPERMATOZOIDES BOVINOS

La actividad mitocondrial es esencial para el funcionamiento óptimo de los espermatozoides, ya que las mitocondrias son responsables de producir el ATP necesario para la motilidad y otras funciones celulares críticas. La exposición a pesticidas como el clorpirifos puede afectar esta actividad, comprometiendo la fertilidad (Agarwal et al., 2014). La actividad mitocondrial se clasificó en alta y baja, basado en la intensidad de fluorescencia emitida por la sonda MitoTracker en la pieza intermedia (localización mitocondrial) de los espermatozoides, como se ilustra en la figura 3.

**Figura 3** – Patrón de fluorescencia emitida por la sonda fluorescente MitoTracker en espermatozoides bovinos con alta actividad o baja actividad mitocondrial



Actividad mitocondrial en espermatozoides bovinos. Las figuras. (a-c) muestra espermatozoide con alta actividad mitocondrial. (d-f) muestra espermatozoides con baja actividad mitocondrial. La flecha indica un marcado fuerte para la actividad mitocondrial en la pieza intermedia, mientras que la punta de flecha muestra un etiquetado débil en la pieza intermedia. El cuadrado blanco representa una foto ampliada de la pieza central en a, d. Marcaje mitocondrial con MitoTracker en (a, d). Marcaje nuclear con Hoechst 33342 en (b, e). La combinación de a-b y d-e se muestra en c y f, respectivamente.

Los datos relacionados con la función mitocondrial revelaron un impacto negativo del clorpirifos sobre la actividad mitocondrial de los espermatozoides bovinos. El porcentaje de espermatozoides con alta actividad mitocondrial observado en el grupo control (0  $\mu\text{M}$ ) se redujo significativamente en los grupos tratados con 12,5  $\mu\text{M}$  y 25  $\mu\text{M}$  de clorpirifos, como se muestra en la Tabla 3. Además, se observó un aumento significativo en el porcentaje de espermatozoides con baja actividad mitocondrial a medida que aumentaba la concentración de clorpirifos (Tabla 3). Este patrón de cambio, relacionado con el aumento progresivo de las concentraciones de clorpirifos, refleja un claro efecto dosis-respuesta en la actividad mitocondrial de los espermatozoides. Los valores de p que reflejan la significancia estadística de estas comparaciones están detallados en la Tabla 4.

**Tabla 3** – Efecto del clorpirifos en la actividad mitocondrial de espermatozoides bovinos

Parametros	0 $\mu\text{M}$	12.5 $\mu\text{M}$	25 $\mu\text{M}$
<b>Alta actividad Mitocondrial</b>	74,5 $\pm$ 3,3 <sup>A</sup>	50,4 $\pm$ 2,9 <sup>B</sup>	27,3 $\pm$ 1,2 <sup>C</sup>
<b>Baja actividad Mitocondrial</b>	25,5 $\pm$ 3,3 <sup>A</sup>	49,6 $\pm$ 2,9 <sup>B</sup>	72,7 $\pm$ 1,2 <sup>C</sup>

Los datos se expresan como porcentaje (%)  $\pm$  error estándar de la media. Letras distintas (a, b, c) indican diferencias significativas entre los grupos ( $p < 0,05$ ). Fuente: el autor, 2024.

**Tabla 4** – Actividad mitocondrial tratados estadísticamente

<b>Alta actividad mitocondrial:</b>	<b>Baja actividad mitocondrial</b>
0 $\mu\text{M}$ vs. 12,5 $\mu\text{M}$ : $p \leq 0,001$	0 $\mu\text{M}$ vs. 12,5 $\mu\text{M}$ : $P \leq 0,001$
0 $\mu\text{M}$ vs. 25 $\mu\text{M}$ : $p = 0,002$	0 $\mu\text{M}$ vs. 25 $\mu\text{M}$ : $P \leq 0,001$
12,5 $\mu\text{M}$ vs. 25 $\mu\text{M}$ : $p = 0,002$	12,5 $\mu\text{M}$ vs. 25 $\mu\text{M}$ : $P \leq 0,001$

Fuente: el autor, 2024.

La reducción en el porcentaje de espermatozoides con alta actividad mitocondrial indica un compromiso significativo de la función mitocondrial, que es

crucial para la producción de ATP, necesario para garantizar la motilidad y viabilidad de los espermatozoides. La mitocondria, como principal fuente de energía en las células reproductivas, desempeña un papel central en el mantenimiento de la fertilidad. Estudios como el de (Silva et al. 2018) demuestran que los pesticidas organofosforados, como el clorpirifos, pueden impactar directamente la bioenergética mitocondrial, interfiriendo en el proceso de fosforilación oxidativa y en la producción eficiente de ATP. Como consecuencia, esta disfunción mitocondrial puede llevar a una reducción en la capacidad de fertilización de los espermatozoides, perjudicando la fertilidad de los animales (Park & Pang, 2019). Además, el compromiso de la integridad mitocondrial está íntimamente asociado a la inducción de procesos apoptóticos.

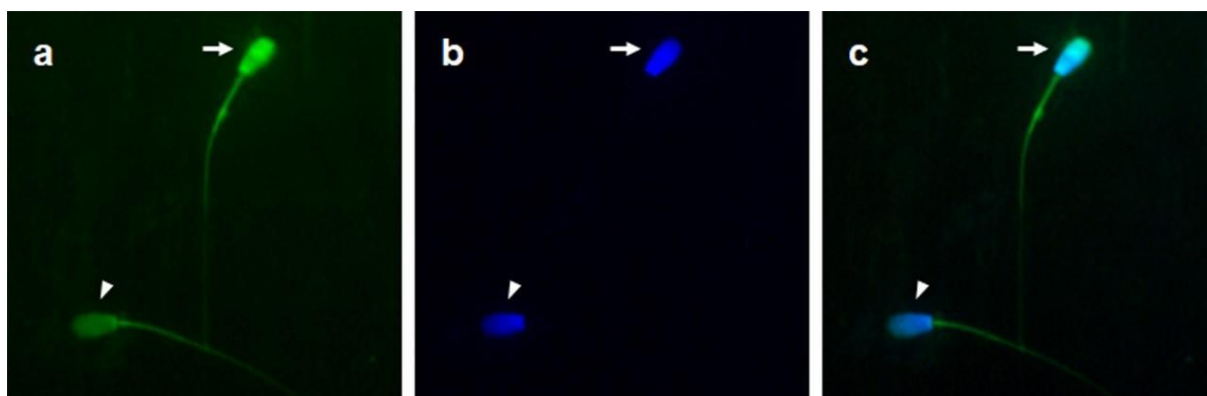
La apoptosis desempeña un papel crucial en la regulación de la función mitocondrial en los espermatozoides, afectando directamente la permeabilidad y el potencial de membrana mitocondrial. Durante el proceso apoptótico, las proteínas de la familia Bcl-2 promueven la formación de poros en la membrana mitocondrial externa, resultando en la liberación de factores pro-apoptóticos, como el citocromo c, hacia el citoplasma (Sharma et al., 2023). Esta alteración en la permeabilidad conduce a la pérdida del  $\Delta\psi_m$ , que es vital para la producción de ATP a través de la fosforilación oxidativa, esencial para la motilidad y viabilidad de los espermatozoides (Park & Pang, 2019). La liberación del citocromo c activa la cascada de caspasas, induciendo la degradación controlada de los componentes celulares y, en consecuencia, la muerte celular.

Además, la apertura del poro de transición de permeabilidad mitocondrial (PTP) durante la apoptosis contribuye a la disfunción mitocondrial, ya que permite la entrada de iones y solutos en la matriz mitocondrial, llevando a la disipación del  $\Delta\psi_m$  y al aumento de la producción de especies reactivas de oxígeno (ERO) (Vahedi et al., 2024). Esta dinámica resulta no solo en el compromiso de la bioenergética mitocondrial, sino también en la reducción de la fertilidad de los espermatozoides, dado que la integridad mitocondrial es fundamental para el mantenimiento de la calidad seminal y la capacidad fecundante (Vertika et al., 2020). Dado que el clorpirifos está involucrado en la inducción de la apoptosis en varios modelos biológicos, es plausible suponer que el efecto del clorpirifos en la actividad mitocondrial observado en el presente trabajo pueda haber sido mediado por un mecanismo que involucra la apoptosis y, posiblemente, las especies reactivas de oxígeno.

## 4.2 EFECTO DEL CLORPIRIFOS EN EL ESTRÉS OXIDATIVO DE ESPERMATOZOIDES BOVINOS

El estrés oxidativo resulta del desequilibrio entre la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y la capacidad antioxidante de la célula. Los espermatozoides son especialmente susceptibles al daño oxidativo debido a su alto contenido de ácidos grasos poliinsaturados en la membrana plasmática (Agarwal et al., 2014). CellROX Green es una sonda fluorogénica utilizada para evaluar el estrés oxidativo en células vivas. En su estado reducido, la sonda emite baja fluorescencia; sin embargo, tras la oxidación por especies reactivas de oxígeno (EROs) y su posterior unión al ADN, emite una fluorescencia verde brillante. El patrón de fluorescencia generado por la sonda CellROX, utilizado para cuantificar espermatozoides con estrés oxidativo, se ilustra en la Figura 4.

**Figura 4** – Patrón de fluorescencia emitida por la sonda CellRox en espermatozoides bovinos con alto o bajo nivel de estrés oxidativo



Estrés oxidativo en espermatozoides bovinos. La flecha indica espermatozoides con estrés oxidativo (alto nivel de especies reactivas de oxígeno) la punta de flecha indica espermatozoides sin estrés oxidativo (bajo nivel de especies reactivas de oxígeno). Marcaje de especies reactivas de oxígeno con CellRox en a. Marcaje nuclear con Hoechst 33342 en b. La combinación de a-b se muestra en c.

Después de la incubación de los espermatozoides durante 2 horas con diferentes concentraciones de clorpirifos, se identificó un efecto negativo del pesticida en el equilibrio redox de las células espermáticas. El aumento de la concentración de clorpirifos reveló un claro efecto dependiente de la dosis en la inducción del estrés oxidativo en los espermatozoides. El análisis mostró un aumento significativo ( $p \leq$

0,001) en el porcentaje de células con estrés oxidativo en los grupos tratados con 12,5  $\mu\text{M}$  y 25  $\mu\text{M}$  de clorpirifos, en comparación con el grupo control (tabla 5), reforzando la relación entre la exposición al clorpirifos y la intensificación del estrés oxidativo en las células espermáticas.

**Tabla 5** – Efecto del clorpirifos en el estrés oxidativo de espermatozoides bovinos

Parámetros	Concentración de clorpirifos		
	0 $\mu\text{M}$	12,5 $\mu\text{M}$	25 $\mu\text{M}$
Estrés oxidativo (CellROX+)	22,3 $\pm$ 3,7 <sup>A</sup>	49,0 $\pm$ 2,7 <sup>B</sup>	70,4 $\pm$ 0,8 <sup>C</sup>

Efecto do clorpirifos no estrés oxidativo de espermatozoides bovinos. Datos expresados como porcentaje (%)  $\pm$  error estándar de la media. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas entre grupos ( $p \leq 0,001$ ). Fuente: el autor, 2024.

El clorpirifos es ampliamente reconocido por inducir estrés oxidativo en diversas células, incluidas las células reproductivas. Este efecto es mediado principalmente por la generación excesiva de especies reactivas de oxígeno (EROs), que superan las defensas antioxidantes naturales de las células, llevando a un desequilibrio redox. Esta desregulación resulta en la oxidación de lípidos, proteínas y ADN, ocasionando daños celulares significativos (Montanarí et al., 2024; Zhang et al., 2023).

La producción de EROs inducida por el clorpirifos altera las actividades de las enzimas antioxidantes y desencadena la peroxidación lipídica (Gultekin et al., 2000). En el contexto de las células espermáticas, estudios demuestran que el clorpirifos está asociado con un aumento de la peroxidación lipídica, especialmente en membranas ricas en ácidos grasos poliinsaturados, como las presentes en las mitocondrias y en la membrana plasmática de los espermatozoides, comprometiendo la fluidez y la funcionalidad de las membranas (da Costa et al., 2024; Kutluyer et al., 2017). La alteración en la fluidez de la membrana plasmática impacta directamente en el proceso de capacitación espermática, esencial para que el espermatozoide mantenga la capacidad fecundante, mientras que las modificaciones en la membrana mitocondrial resultan en disfunción mitocondrial, afectando la producción de energía necesaria para la motilidad espermática (Gautier & Aurich, 2022).

Adicionalmente, el estrés oxidativo conduce a la apertura del poro de transición de permeabilidad mitocondrial (PTP), resultando en la pérdida del potencial

de membrana mitocondrial ( $\Delta\psi_m$ ) (Koppers et al., 2008). Por lo tanto, los efectos del clorpirifos en la inducción del estrés oxidativo en espermatozoides corroboran los datos observados sobre la actividad mitocondrial en el presente estudio, sugiriendo que el estrés oxidativo es un factor crucial en la pérdida de la actividad mitocondrial espermática inducida por el clorpirifos.

#### 4.3 DESENVOLVIMENTO DA METODOLOGIA DE EXTRACCIÓN POR QuEChERS MINIATURIZADO E GC-MS/MS

El clorpirifos es un compuesto organofosforado ampliamente utilizado en la agricultura para el control de plagas (EPA, 2020). Para la determinación de clorpirifos en el fluido de testículo bovino, se utilizó un equipo de cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas (GC-MS/MS), empleando como fuente principal de información los trabajos previos realizados en el laboratorio que también utilizaban este compuesto Mandal et al. (2020).

El análisis cromatográfico se llevó a cabo utilizando una columna capilar específica para compuestos organofosforados, con las siguientes condiciones de operación: el programa de temperatura incluyó un gradiente que comenzó a 70°C y aumentó hasta 280°C, con una rampa de calentamiento de 10°C/min. El detector de masas fue operado en el modo modo MRM (Monitoreo de Reacción Múltiple) para asegurar la detección precisa de clorpirifos, con los iones característicos seleccionados para el análisis:  $m/z$  197, 200, y 314.

La ventana de retención para el clorpirifos estuvo entre 17.10 y 21.98 minutos. Además, se utilizó un patrón interno, trifluorotolueno (TFF), en una concentración de 75 ppb, para corregir las posibles variaciones en los picos cromatográficos, lo que garantizó una cuantificación más precisa y fiable. Los tiempos de retención se encuentran detallados en la Tabla 6, mientras que los cromatogramas se presentan en la Figura 6. La comparación con estándares previamente analizados y el uso del patrón interno proporcionaron la confianza de que los picos generados corresponden específicamente al clorpirifos.

**Tabla 6** – Tiempo de retención de CPF y TFF

<b>Compuesto</b>	<b>CPF</b>	<b>TFF</b>
Tiempo de retención (min)	19,3	25,3

Fuente: el autor, 2024.

El preparado de muestras es una etapa fundamental en el análisis de residuos de pesticidas en matrices biológicas, ya que permite la extracción y purificación de los compuestos de interés, reduciendo interferencias y mejorando la sensibilidad y selectividad del método analítico. El método mini-QuEChERS ("Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, and Safe") fue elegido en este trabajo debido a su practicidad y eficiencia en la extracción de múltiples residuos de pesticidas. Además de ser un método rápido y de bajo costo, el mini-QuEChERS ofrece gran flexibilidad para aplicaciones biológicas mediante optimizaciones específicas, abarcando una amplia gama de compuestos y matrices (ANASTASSIADES et al., 2003).

**Tabla 7** – Total de inyecciones realizadas

<b>Inyecciones</b>	<b>Muestras</b>
Muestras dopadas + salting out	3 muestras de Matriz
Muestras dopadas + agua e salting out	3 muestras de Matriz
Muestras dopadas + agua, salting out e clean upclion u	3 muestras de Matriz
Muestra matriz + agua e salting out	15 animales en triplicata

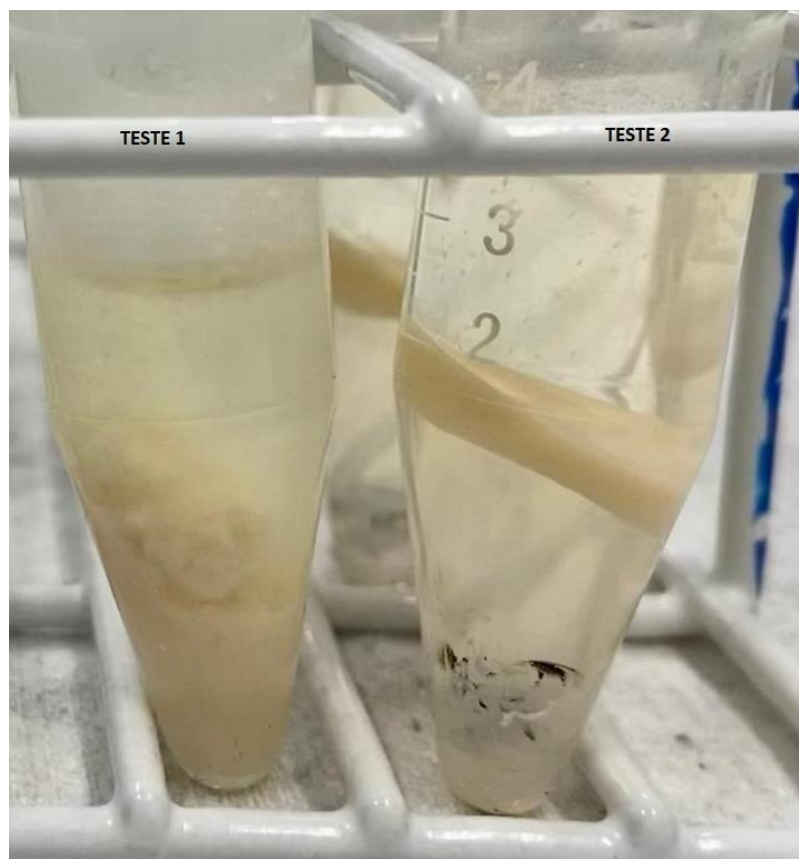
Fuente: el autor, 2024.

Se llevaron a cabo tres pruebas con el objetivo de mejorar la eficiencia de extracción del analito en cuestión. En la primera prueba (teste1), la extracción se realizó utilizando acetonitrilo y sales de limpieza únicamente. Este procedimiento resultó en una limpieza insuficiente, lo cual se reflejó en el cromatograma obtenido, mostrando una baja recuperación de clorpirifos. La presencia de interferentes y una baja intensidad del pico del analito indicaron la necesidad de optimizar el método. Estudios previos han demostrado que la matriz puede afectar significativamente la eficiencia de extracción cuando el proceso no está adecuadamente optimizado (Anastassiades et al., 2003).

En la segunda prueba( teste2), se repitió el procedimiento anterior con la adición de agua en la etapa de limpieza. La incorporación de agua mejoró

notablemente la separación de fases, facilitando la recuperación de la fase orgánica. Los cromatogramas mostraron picos más definidos y una reducción significativa de interferentes (figura 6C), evidenciando una mayor eficiencia en la extracción de clorpirifos. La adición de agua favorece la partición del analito hacia la fase orgánica y es una práctica común en métodos QuEChERS modificados (Lehotay et al., 2010).

**Figura 5** – Diferencias en la limpieza de la matriz para los test 1 y 2



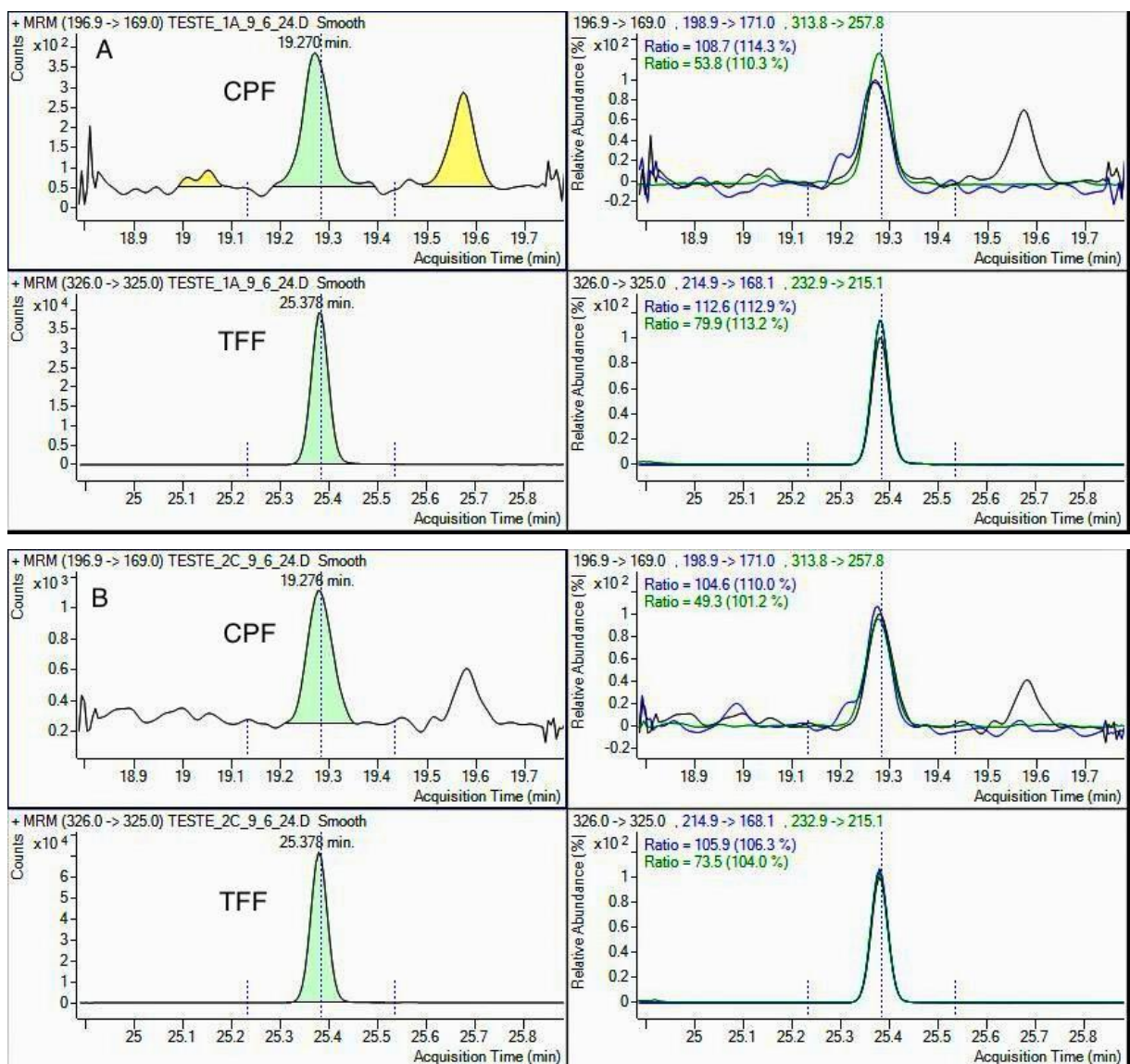
Fuente: el autor, 2024

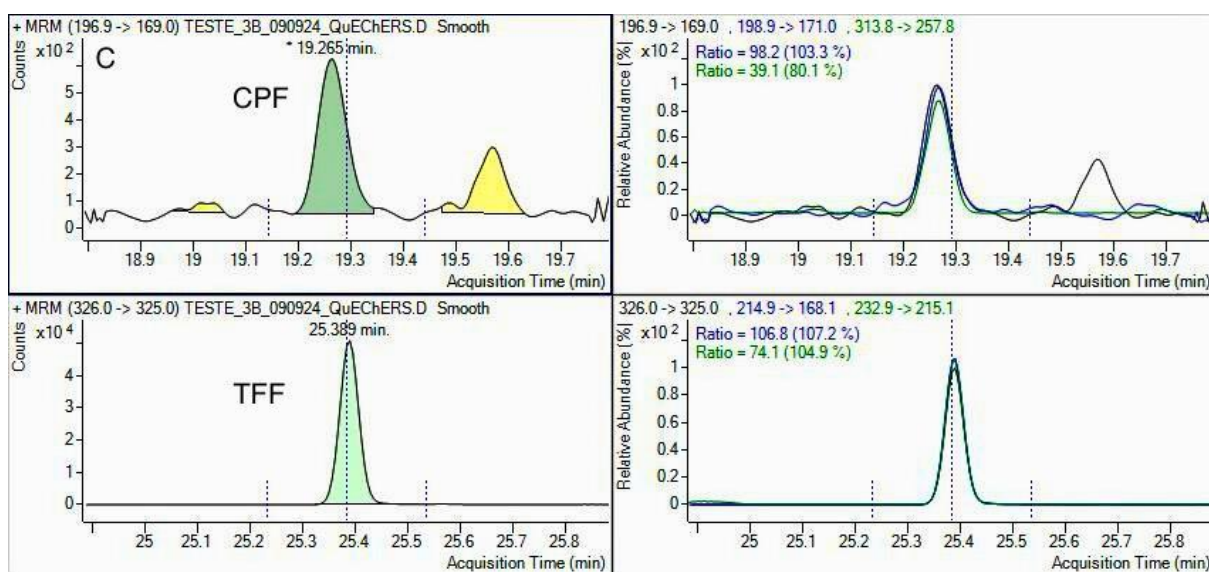
En la tercera prueba, se implementó una etapa adicional de limpieza (clean-up) después de la extracción de la fase orgánica, utilizando PSA (amina primaria secundaria) y C18 como agentes de limpieza. La mezcla fue centrifugada nuevamente, y la fase orgánica fue recolectada y concentrada para su inyección. Sin embargo, los resultados no mostraron diferencias significativas en comparación con la segunda prueba. Esto sugiere que la matriz de fluido del testículo I no contenía suficientes interferentes que justificaran una etapa adicional de limpieza, y que el método más simple era igualmente eficaz (Mastovska et al., 2010).

Con base en los resultados obtenidos, se seleccionó el procedimiento de la segunda prueba como método óptimo para la construcción de las curvas de

calibración y el análisis de las muestras de fluido del testículo. Este método equilibra eficiencia y simplicidad, reduciendo el tiempo y los recursos necesarios sin comprometer la calidad analítica.

**Figura 6** – Cromatograma de los diferentes test realizados, test 1 representado en la figura A que muestra el cromatograma de la primera inyección mostrada en la tabla 9. El test 2 representado en la figura B que muestra el cromatograma de la segunda inyección mostrada en la tabla 9 y el test 3 representado en la figura C que muestra el cromatograma de la tercera inyección mostrada en la tabla 9



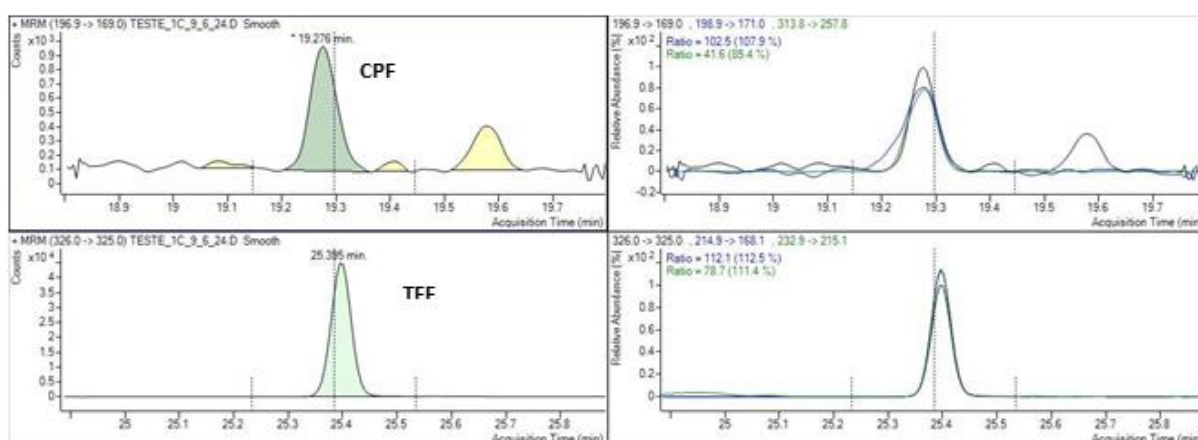


Fuente: el autor, 2024.

#### 4.4 VALIDACIÓN METODOLÓGICA

Para evaluar la selectividad del método desarrollado, se realizó un ensayo utilizando la matriz a analizar, dopada con una concentración de  $10 \text{ mg L}^{-1}$  de clorpirifos. Seguidamente, se adicionó un estándar interno, trifluorotolueno (TFF), para verificar que el método está operando adecuadamente bajo las condiciones establecidas. En la figura 7, se puede observar la calidad del pico correspondiente al clorpirifos en el tiempo de retención específico, entre 19.3 minutos.

**Figura 7** – Cromatograma del comportamiento del clorpirifos en una solución de  $500 \mu\text{L}$  de la matriz utilizada, después del método mini-QuEChERS

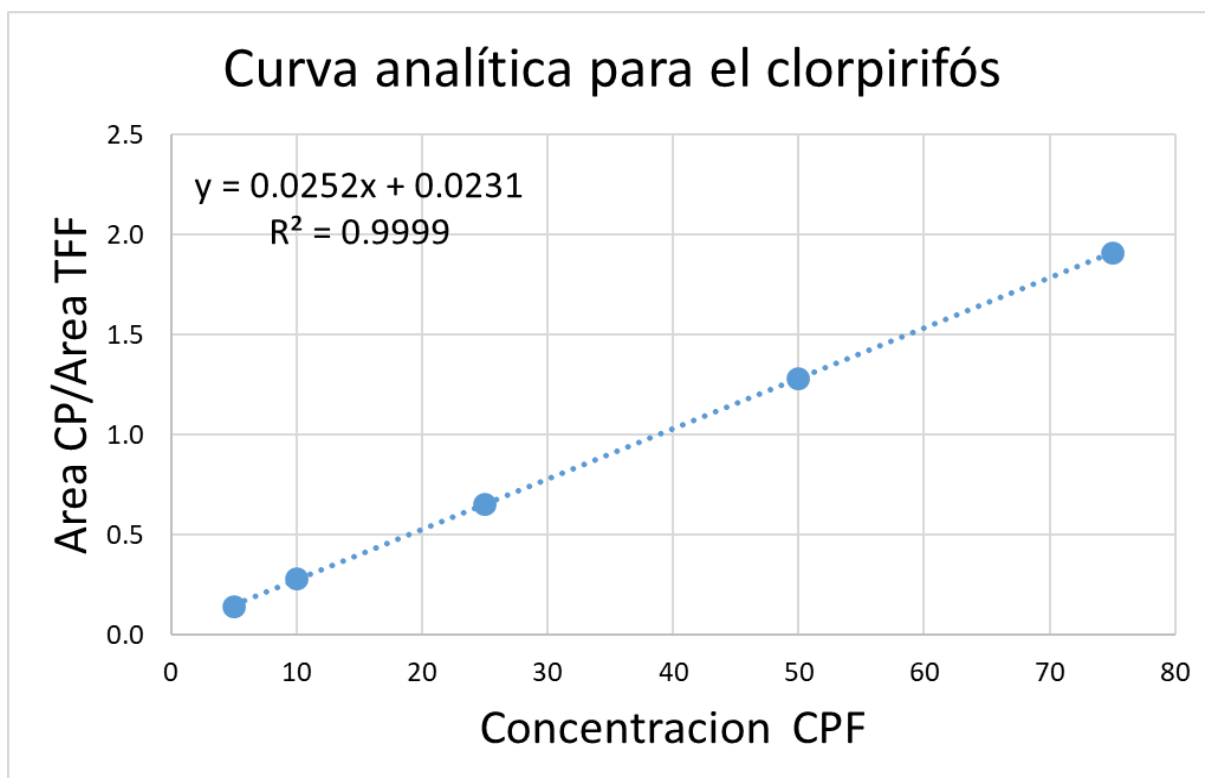


Fuente: el autor, 2024.

La presencia de un pico bien definido y simétrico, así como la coincidencia con el tiempo de retención esperado, confirma la eficiencia del método para detectar y extraer clorpirifos de la matriz analizada. Además, el uso del TFF como estándar interno permitió garantizar que el método mantiene una precisión adecuada, corroborada por la calidad de los picos en los tiempos de retención esperados, sin interferencias significativas.

La curva analítica para el clorpirifos se presenta en la Figura 8, con concentraciones utilizadas para la construcción de la curva que variaron entre 5 y 75  $\mu\text{g L}^{-1}$ . Los coeficientes de correlación obtenidos fueron superiores a 0,999, cumpliendo con las normativas establecidas por ANVISA (Brasil, 2017) (Tabla 7). El coeficiente de determinación ( $R^2$ ) es una medida que indica que dos variables son directamente proporcionales, lo que significa que a medida que una variable aumenta, la otra también lo hace. Cuando el valor de  $R^2$  se aproxima a 1, la ecuación de la línea generada por el coeficiente de regresión proporciona un valor proporcional a la concentración real del analito presente en la muestra.

**Figura 8** – Curva analítica del clorpirifos en la matriz utilizada. Los puntos de concentración de la curva son 5, 10, 25, 50 y 75  $\mu\text{g/L}$



Fuente: el autor, 2024.

**Tabla 8** – Parámetros de validación analítica del método de análisis de clorpirifos utilizando mini-QuEChERS y GC-MS/MS

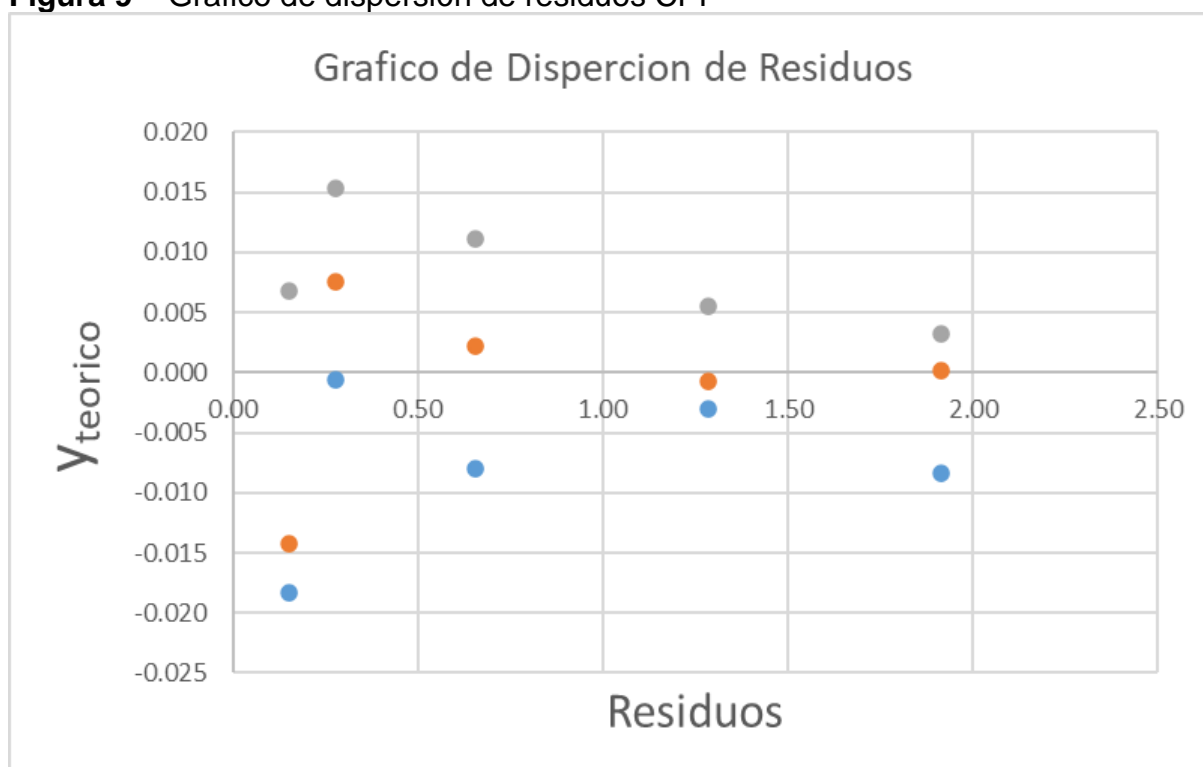
Compuesto	Ecuación de la recta	Coefficiente de determinación	LD $\mu\text{g/L}$	LQ $\mu\text{g/L}$
CPF	$y=0,0252x+0,02311$	0,9999	0,076	0,252

Fuente: el autor, 2024.

Otro estudio que empleó GC-MS/MS junto con una técnica de dispersión en fase sólida (MSPD) reportó un límite de detección (LD) 0,01 a 0,04  $\mu\text{g/kg}$  y un límite de cuantificación (LQ) 0,04 a 0,13  $\mu\text{g/kg}$  para la determinación de pesticidas en matrices de origen vegetal (WONDIMU; GELETU, 2023). Comparando estos datos con los resultados obtenidos en este trabajo, los valores de detección y cuantificación de clorpirifos fueron 0,076 y 0,252  $\mu\text{g/L}$ , respectivamente, considerando que la normativa brasileña no permite concentraciones superiores a 2  $\mu\text{g/L}$  en muestras de agua.

En la Figura 9 se presentan los gráficos de dispersión de los residuos, los cuales muestran características de homocedasticidad. Para que un modelo de regresión sea adecuado, es esencial que los residuos mantengan una varianza constante a medida que aumentan los valores predichos.

**Figura 9** – Grafico de dispersión de residuos CPF



Fuente: el autor, 2024.

Seguidamente podemos ver la repetibilidad del compuesto calculado y teórico en la tabla 9.

**Tabla 9** – Repetibilidad y recuperación para los analitos

<b>Analito</b>	<b>Concentración usada</b>	<b>Recuperación</b>
CPF	Mínima (5 µg/L)	93,2
	Media (25 µg/L)	100,3
	Alta (75 µg/L)	99,9

Fuente: el autor, 2024.

Las curvas analíticas en la matriz fueron preparadas en el día, para reflejar la variabilidad de los resultados obtenidos en el laboratorio. La evaluación de la repetibilidad se basó en la evaluación del coeficiente de variación. El RSD obtenido fue inferior al 11,5% y este valor está de acuerdo con lo recomendado por el INMETRO para este rango de concentración, lo que indica una buena precisión en los valores finales de concentración.

Los resultados de recuperación mostraron valores de desvío estándar relativo (RSD) inferiores al 10,7% para el clorpirifos, dentro de un rango de trabajo de 5 a 75 µg kg<sup>-1</sup>.

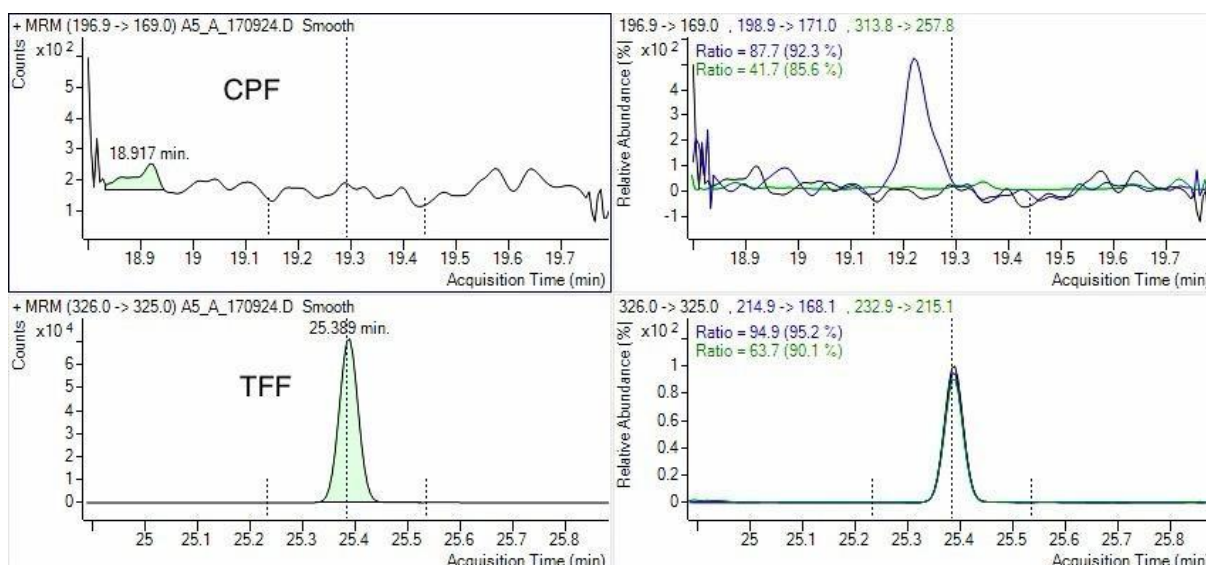
#### 4.5 ANALISIS DE LA MATRIZ DE FLUIDO DEL TESTÍCULO

El clorpirifos es un pesticida organofosforado cuyo uso ha sido prohibido en varias regiones debido a su toxicidad y capacidad de bioacumulación en organismos vivos, lo cual genera preocupaciones significativas sobre la seguridad alimentaria. En el caso del ganado bovino industrializado, la exposición al clorpirifos puede ocurrir a través de forrajes y pastos contaminados, lo cual representa un riesgo tanto para la salud de los animales como para los consumidores de productos derivados (Anderson, 2009; Guney & Giraldo, 2019). Aunque su uso está reglamentado, es necesario fortalecer el control y la vigilancia por parte de los organismos responsables para garantizar que no haya residuos de clorpirifos en el medio ambiente ni en la cadena alimentaria. La falta de un monitoreo adecuado puede dar lugar a la persistencia de este pesticida en ciertas regiones, afectando la calidad de los productos de origen animal y, en última instancia, la seguridad de los consumidores (Anderson, 2009;

Mesas et al., 2022).

Las muestras de fluido de testículo de 15 animales diferentes, cada una en triplicado, totalizando 45 muestras. Todas fueron procesadas utilizando el método optimizado de la segunda prueba y analizadas mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS/MS) bajo las condiciones cromatográficas establecidas previamente. Los análisis realizados no detectaron la presencia de clorpirifos en ninguna de las muestras dentro del límite de detección y cuantificación del método según mostrado en la figura 10. Este hallazgo puede interpretarse considerando varios factores. Aunque el clorpirifos es un pesticida conocido por su potencial de bioacumulación en organismos vivos, es posible que las concentraciones presentes en el fluido del testículo bovino sean demasiado bajas para ser detectadas con la metodología empleada. Además, el clorpirifos puede sufrir procesos de metabolización en el organismo animal, convirtiéndose en metabolitos más hidrosolubles como el 3,5,6-tricloro-2-piridinol (TCP), que son excretados más fácilmente (Barr et al., 2005). A pesar de su tendencia a bioacumularse, la velocidad y eficiencia de metabolización pueden variar según factores como la especie, la edad, el estado fisiológico, la localización geográfica y la exposición previa al pesticida (Eaton et al., 2008). Por lo tanto, la ausencia del analito podría deberse tanto a concentraciones por debajo del límite de cuantificación como a una rápida metabolización y eliminación del compuesto original.

**Figura 10** – presenta el cromatograma de la matriz inyectada para análisis donde se puede observar la ausencia del pico que es el indicativo de la presencia o ausencia del compuesto en la muestra procesada



Fuente: el autor, 2024.

La no detección de clorpirifos en las muestras analizadas es un resultado positivo desde el punto de vista de la salud animal y la seguridad alimentaria. Sin embargo, es importante considerar las limitaciones del estudio. Aunque el método optimizado mostró una buena eficiencia de extracción, el límite de detección podría no ser suficiente para identificar concentraciones muy bajas. La implementación de técnicas más sensibles como el UHPLC-MS/MS, podría mejorar la capacidad de detección y permitir la identificación de trazas del pesticida (Zhao et al., 2018, Liu et al. 2020, Nkwonta et al. 2021).

Además, la detección de metabolitos como el TCP podría ofrecer una visión más completa de la exposición al clorpirifos, ya que estos compuestos pueden persistir en el organismo y son indicadores confiables de exposición (Eaton et al., 2008). La ausencia del pesticida también podría deberse a variaciones en la exposición ambiental, diferencias en la dieta, metabolismo individual de los animales o prácticas ganaderas específicas.

Los resultados obtenidos subrayan la importancia de continuar mejorando los métodos analíticos para la detección de pesticidas en matrices biológicas. Futuras investigaciones podrían enfocarse en la optimización del método de extracción, incorporando modificaciones al método QuEChERS para aumentar la recuperación y sensibilidad, como el uso de diferentes solventes o adsorbentes en la etapa de limpieza. También sería beneficioso ampliar el rango de análisis, incluyendo la detección de otros pesticidas y sus metabolitos para evaluar de manera integral la exposición a múltiples contaminantes ambientales. Realizar estudios longitudinales que monitoreen la presencia de pesticidas en animales a lo largo del tiempo, correlacionando los niveles detectados con posibles efectos en la salud reproductiva y general, podría proporcionar una comprensión más profunda del impacto de estos compuestos. Asimismo, también podría evaluarse un mayor número de animales, si es posible de regiones conocidas por la contaminación con clorpirifos, lo cual permitiría obtener una perspectiva más amplia y representativa sobre la distribución geográfica del impacto de estos pesticidas y su relación con la salud animal.

## 5 CONCLUSIONES FINALES

El presente estudio tuvo como objetivo investigar la presencia de clorpirifos en el fluido del testículo bovino mediante análisis cromatográfico y evaluar los efectos in vitro de este pesticida en la actividad mitocondrial y el estrés oxidativo de los espermatozoides. Los hallazgos obtenidos proporcionan una comprensión integral del impacto potencial del clorpirifos en la reproducción bovina, con implicaciones significativas para la salud animal y la seguridad alimentaria.

Inicialmente, se llevó a cabo un análisis cromatográfico utilizando cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS/MS) para detectar la presencia de clorpirifos en muestras de fluido testicular de 15 animales diferentes, analizadas en triplicado, totalizando 45 muestras. Las muestras fueron procesadas mediante el método optimizado de mini-QuEChERS y analizadas bajo condiciones cromatográficas establecidas previamente. A pesar de la optimización y la sensibilidad del método, no se detectó clorpirifos en ninguna de las muestras dentro del límite de detección del instrumento.

Este resultado puede interpretarse desde varias perspectivas. En primer lugar, es posible que los animales no hayan estado expuestos al clorpirifos, ya sea porque no se utiliza en las prácticas agrícolas de la región o debido a restricciones regulatorias que limitan su uso. El control del clorpirifos en ciertas áreas podría explicar su ausencia en las muestras analizadas. En segundo lugar, las concentraciones de clorpirifos presentes en el fluido del testículo podrían ser muy bajas, inferiores al límite de detección del método empleado. Esto sugiere la necesidad de utilizar técnicas analíticas más sensibles como el UHPLC-MS/MS, que permitan detectar trazas del pesticida en matrices biológicas complejas. Por último, el clorpirifos puede ser rápidamente metabolizado en el organismo a compuestos más hidrosolubles, como el 3,5,6-tricloro-2-piridinol (TCP), que son excretados con mayor facilidad. La rápida biotransformación y eliminación podrían contribuir a su no detección en el plasma seminal.

Paralelamente, se llevaron a cabo experimentos in vitro para evaluar el efecto del clorpirifos en la actividad mitocondrial y el estrés oxidativo de los espermatozoides bovinos. Se expusieron las células a concentraciones de 0  $\mu\text{M}$  (control), 12,5  $\mu\text{M}$  y 25  $\mu\text{M}$  de clorpirifos. Los resultados mostraron una disminución significativa en la proporción de espermatozoides con alta actividad mitocondrial a medida que aumentaba la concentración del pesticida. Específicamente, la alta

actividad mitocondrial disminuyó de 74,5% en el control a 50,4% y 27,3% en las concentraciones de 12,5  $\mu\text{M}$  y 25  $\mu\text{M}$ , respectivamente. Estas diferencias fueron estadísticamente significativas, indicando que el clorpirifos afecta negativamente la función mitocondrial, esencial para la producción de ATP y la motilidad espermática. Asimismo, se observó un aumento significativo en el estrés oxidativo de los espermatozoides con el incremento de la concentración de clorpirifos. La proporción de células positivas para el marcador de estrés oxidativo CellROX® aumentó de 22,3% en el control a 49,0% y 70,4% en las concentraciones de 12,5  $\mu\text{M}$  y 25  $\mu\text{M}$ , respectivamente. Este incremento en las especies reactivas de oxígeno (ERO) puede causar daño oxidativo a lípidos, proteínas y ADN, comprometiendo la integridad y funcionalidad de las células espermáticas. Los resultados sugieren que el clorpirifos induce estrés oxidativo y disfunción mitocondrial de manera dosis-dependiente.

La integración de estos hallazgos proporciona una visión completa del impacto potencial del clorpirifos en la reproducción bovina. Aunque no se detectó el pesticida en las muestras de plasma seminal, los efectos in vitro demuestran que el clorpirifos puede afectar negativamente parámetros cruciales de la calidad espermática. La disfunción mitocondrial y el aumento del estrés oxidativo podrían traducirse en una reducción de la fertilidad, afectando la eficiencia reproductiva y la productividad ganadera. Los resultados obtenidos subrayan la importancia de monitorear y regular el uso de clorpirifos en entornos agrícolas y ganaderos. La exposición a pesticidas organofosforados representa un riesgo potencial para la salud reproductiva de los animales y, por extensión, para la seguridad alimentaria humana. Es esencial implementar prácticas agrícolas sostenibles que minimicen la exposición a estos compuestos y promuevan la salud del ganado. Además, se recomienda la realización de estudios adicionales que evalúen los efectos del clorpirifos en condiciones in vivo, considerando factores como la dosis ambientalmente relevante, el tiempo de exposición y las posibles interacciones con otros contaminantes.

## REFERÊNCIAS

- ABBAS, R.; ASCHNER, M.; KEEFE, T. H.; DONEPUDI, R. Persistent organic pollutants: detection and analysis. In: *Persistent Organic Pollutants*. Elsevier, 2014. p. 1-35.
- ABUBAKAR, I.; KHALID, N.; ALI, M. A. Pesticides and their role in agriculture: a review. *Journal of Agricultural Science*, v. 12, n. 3, p. 123-134, 2020.
- AGUDELO, D. M.; FLÓREZ, M. T.; LÓPEZ, C.; PALACIO, J. Influencia de variables fisicoquímicas en la transferencia de clorpirifos y TCP en sedimentos. *Revista Ingenierías Universidad de Medellín*, v. 12, n. 23, p. 15-25, 2013.
- ALAA-ELDIN, A. N. N. H.; K. J. Organophosphates and reproductive health: a systematic review. *Journal of Toxicology and Environmental Health*, v. 20, n. 6, p. 275-283, 2017.
- ÁLVARO-ALONSO, E. A. et al. Comparison of experimental and mathematical methods for the determination of the limit of detection and limit of quantification in analytical methods. *Analytical Methods*, v. 14, n. 12, p. 1213-1221, 2022.
- ANDERSON, N. G.; ARMSTRONG, D. W. High-performance liquid chromatography: A review of the principles and applications. *Journal of Chromatography A*, v. 1012, n. 1-2, p. 1-21, 2003.
- ANASTASSIADES, M.; LEHOTAY, S. J.; ŠTAJNBAHER, D.; SCHENCK, F. J. Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and "dispersive solid-phase extraction" for the determination of pesticide residues in produce. *Journal of AOAC International*, v. 86, n. 2, p. 412-431, 2003.
- AOAC INTERNATIONAL. *Official Methods of Analysis*. 22. ed. Oxford: Oxford University Press, 2023.
- ARAÚJO, M. C. Validação de métodos analíticos: uma abordagem prática. *Química Nova*, v. 32, n. 4, p. 1002-1008, 2009.
- BALBUENA, M. S. et al. Bioaccumulation of pesticides in animal tissues and food safety concerns. *Environmental Toxicology and Chemistry*, v. 34, n. 6, p. 1395-1403, 2015.
- BARMENTLO, S. H. et al. Acute and chronic toxicity of short and long chain perfluoroalkyl substances to *Daphnia magna*. *Environmental Pollution*, v. 234, p. 912-920, 2018.
- BARRIUSO, E.; HOUOT, S. Adsorción y desorción de plaguicidas en suelos: efectos de la materia orgánica y el pH. *Agricultural Water Management*, v. 32, n. 1, p. 1-16, 1996.
- BATTAGLIA, M. et al. Monitoring pesticide residues in food: A review of current methods and future perspectives. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, v. 56, n. 16, p. 2734-2751, 2016.

BAUR, B. M.; ENSMINGER, A. H. Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists. 13. ed. Arlington: AOAC International, 1977.

BEJARANO, A.; GARCÍA, A.; CARRILLO, J. Biodegradación de clorpirifos en suelos agrícolas: un enfoque microbiológico. *Revista de Ciencias Ambientales*, v. 12, n. 1, p. 15-25, 2019.

BEJARANO, F. Efeitos neurotóxicos do clorpirifos em crianças. *Revista Brasileira de Saúde Pública*, São Paulo, v. 36, n. 2, p. 123-130, 2020.

BHATT, P.; KUMAR, A.; SINGH, R. Environmental impact of pesticides: a review. *Environmental Science and Pollution Research*, v. 28, n. 10, p. 12345-12358, 2021.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Guia de Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos. 2017.

BRASIL. Lei nº 7.802, de 11 de julho de 1989. Dispõe sobre a pesquisa, a produção, a comercialização e o uso de agrotóxicos, e dá outras providências. *Diário Oficial da União*, Brasília, 1989.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 42, de 24 de novembro de 2020. Proíbe a importação, a produção, a comercialização e o uso do ingrediente ativo clorpirifos e seus sais para determinadas aplicações agrícolas. *Diário Oficial da União*, Brasília, 2020.

BRASIL. Portaria GM/MS nº 888, de 4 de mayo de 2021 . Altera o Anexo XX da Portaria de Consolidação GM/MS nº 5, de 28 de septiembre de 2017, para dispor sobre os procedimentos de controle e de vigilância da qualidade da água para consumo humano e su padrão de potabilidade. *Diario Oficial da União* , Brasília, DF, 5 de mayo de 2021.

BRAVO, R. et al. Persistence of organophosphate pesticides in the environment and their toxicity to non-target organisms. *Environmental Health Perspectives*, v. 119, n. 4, p. 386-392, 2011.

BROGAN, W. R.; RELYEA, R. A. Sublethal effects of pesticides on predator–prey interactions in amphibians. *Copeia*, v. 2013, n. 4, p. 691-698, 2013.

BURATTI, F. M.; P. A. D.; E. C. The effects of organophosphates on cytochrome P450 enzyme activity in testis. *Toxicology Letters*, v. 143, n. 2, p. 95-105, 2003.

BURROWS, H. D.; HARRIS, J. M.; HARRISON, R. M. Photodegradation of chlorpyrifos in the environment. *Environmental Science & Technology*, v. 36, n. 3, p. 516-521, 2002.

CABRERA, L. M. M. Consumo e impactos de los agrotóxicos en Colombia: comunidades envenenadas. *Saúde em Debate*, Rio de Janeiro, v. 46, n. especial 2, p. 75-88, 2022.

CARLOS, A. M.; MARTÍNEZ, A. Analysis of chlorpyrifos and its metabolites in environmental samples by gas chromatography. *Journal of Chromatography A*, v. 1427, p. 1-8, 2015.

- CARMO, E. L. et al. Pesticide selectivity for the insect egg parasitoid *Telenomus remus*. *BioControl*, v. 58, n. 2, p. 271-282, 2013.
- CASTRO, L. et al. Qualidade do sêmen criopreservado em touros: avaliação da integridade de membrana plasmática. *Journal of Reproduction*, v. 31, n. 4, p. 34-42, 2016.
- CEREJEIRA, M. J. et al. Pesticides in Portuguese surface and ground waters. *Water Research*, v. 37, n. 5, p. 1055-1063, 2003.
- CHEN, S.; XU, L.; YANG, C. Organophosphate exposure and its impact on testicular function. *Journal of Environmental Science and Health*, v. 53, n. 8, p. 699-705, 2018.
- CHOWDHURY, A.; PRADHAN, S.; SAHA, M.; SANYAL, N. Impact of pesticides on soil microbiological parameters and possible bioremediation strategies. *Indian Journal of Microbiology*, v. 51, n. 2, p. 225-248, 2021.
- COSKUN, M. Chromatography: Principles and Applications. *Journal of Chromatography A*, v. 1436, p. 1-12, 2016.
- CUATRECASAS, P.; HERRERA, A. B.; RIVERA, M. The use of chromatography in the purification of proteins. *Nature*, v. 220, n. 5165, p. 1195-1196, 1968.
- DAR, A. A.; KUMAR, A.; SINGH, A. Degradation pathways of chlorpyrifos in soil: a review. *Environmental Science and Pollution Research*, v. 26, n. 1, p. 1-15, 2019.
- DUTTA, S.; SAHU, S. Effects of organophosphates on male reproductive health. *Toxicology Reports*, v. 1, p. 520-528, 2013.
- EATON, D. L. et al. Organophosphorus compounds: mechanisms of action and toxicity. *Environmental Health Perspectives*, v. 116, n. 10, p. 1184-1191, 2008.
- EFSA. The 2022 European Union report on pesticide residues in food. *EFSA Journal*, v. 20, n. 3, p. e08753, 2024. DOI: 10.2903/j.efsa.2024.8753.
- EPSHTEIN, V. Linear regression analysis: A practical guide. *Journal of Analytical Chemistry*, v. 74, n. 4, p. 337-343, 2019.
- ESKENAZI, B. et al. Pesticide exposure and human health. In: ESKENAZI, B. *Pesticides and Human Health: A Global Perspective*. *Environmental Health Perspectives*, v. 116, n. 10, p. 1374-1380, 2008.
- FANG, H.; ZHANG, Y.; LIU, J. Microbial degradation of chlorpyrifos: a review. *Environmental Science and Pollution Research*, v. 22, n. 17, p. 13573-13581, 2015.
- FAO; WHO. Pesticide residues in food. Joint FAO/WHO Food Standards Programme, Codex Alimentarius Commission, 2024.
- FERREIRA, L. et al. Evaluación de la exposición al clorpirifos en la producción de alimentos en Brasil. *Environmental Health Perspectives*, v. 130, n. 5, p. 1-9, 2022.

FREITAS-DELL'AQUA, C. P. et al. Citometria de fluxo na avaliação da fertilidade espermática. *Animal Reproduction*, v. 6, n. 3, p. 98-105, 2009.

GARRIDO, T.; CAMPOS, N.; MENDOZA, J. Cuantificación de clorpirifos en muestras acuosas por microextracción líquido-líquido y cromatografía de gases con detector  $\mu$ -ECD. *Investigación y Ciencia*, v. 10, n. 1, p. 159-170, 2021.

GEBREMARIAM, S. Y.; BEUTEL, M. W.; YONGE, D. R.; FLURY, M.; HARSH, J. B. Adsorption and desorption of chlorpyrifos to soils and sediments. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, v. 215, p. 123-175, 2012.

GIDDINGS, J. M.; WILLIAMS, W. M.; SOLOMON, K. R.; GIESY, J. P. Risks to aquatic organisms from use of chlorpyrifos in the United States. In: GIESY, J.; SOLOMON, K. *Ecological Risk Assessment for Chlorpyrifos in Terrestrial and Aquatic Systems in the United States*. Springer, 2014. p. 231-265.

GILE, K.; MEYERS, T. Effects of chlorpyrifos on avian fertility and egg hatchability. *Journal of Wildlife Management*, v. 50, n. 1, p. 45-50, 1986.

GILLAN, L. et al. Fluorescence techniques for evaluating sperm function. *Journal of Andrology*, v. 26, n. 4, p. 345-352, 2005.

GONZÁLEZ, M. et al. Análisis de residuos de clorpirifos en aguas potables en Brasil. *Revista Brasileira de Saúde Pública*, v. 45, n. 1, p. 1-10, 2021.

GRABUSKI, R. et al. Toxicidade oral de clorpirifos em aves. *Canadian Journal of Zoology*, v. 82, n. 6, p. 1047-1057, 2004.

GUTIÉRREZ, A. R.; RIVERA, M. A.; CARRILLO, J. Evaluación de la movilidad de clorpirifos en suelos agrícolas. *Revista de Ciencias Ambientales*, v. 10, n. 1, p. 45-56, 2014

HAGE, D. S. Modern liquid chromatography: principles and applications. *Analytical Chemistry*, v. 90, n. 1, p. 1-17, 2018.

HASSAAN, M. A.; EL NEMR, A. A. Pesticides: classification and environmental impact. *Environmental Science and Pollution Research*, v. 27, n. 3, p. 1234-1245, 2020.

HOLLAWAY, J. L.; HARRIS, J. M. Gas chromatography and mass spectrometry for the analysis of pesticide residues in food. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 47, n. 5, p. 2057-2062, 1999.

INMETRO. Orientação sobre validação de métodos analíticos. DOQ-CGCRE-008, Revisão 07, 2020.

INOUE-CHOI, M.; WEYER, P. J.; JONES, R. R.; BOOTH, B. J.; CANTOR, K. P.; ROBIEN, K.; WARD, M. H. Atrazine in public water supplies and risk of ovarian cancer among postmenopausal women in the Iowa Women's Health Study. *Occupational and Environmental Medicine*, v. 73, n. 9, p. 582-587, 2016.

INOUE, T.; KAWAMURA, K. Analysis of pesticide residues in milk using gas chromatography. *Food Control*, v. 85, p. 1-7, 2018.

IPEN. Alternativas ao clorpirifos e a outros inseticidas organofosforados. IPEN, 2020.

IQBAL, S.; IQBAL, MM; JAVED, M.; BAHADUR, A.; YASIEN, S.; NAJAM-UD-DIN; HURR, A.; AHMAD, N.; RAHEEL, M.; LIU, G. Método de extracción QuEChERS modificado seguido de cuantificación simultánea de nueve pesticidas multiclase en sangre y orina humanas mediante GC-MS. *Journal of Chromatography B*, v. 1152, p. 122227, 2020.

JUNG, M. K.; H., H.; S., G. The effects of organophosphate exposure on sperm and progeny. *Reproductive Toxicology*, v. 98, p. 1-12, 2021.

JOSHI, S. C.; MATHUR, R.; GULATI, N. Testicular toxicity of chlorpyrifos (an organophosphate pesticide) in albino rat. *Toxicology and Industrial Health*, v. 23, n. 7, p. 439-444, 2007.

KAH, M.; HARTMANN, A.; HENNING, M. Biodegradation of chlorpyrifos: a review. *Environmental Pollution*, v. 148, n. 2, p. 119-126, 2007.

KEHRIG, H. D.; RIBEIRO, C. A.; MENDES, R. F. Bioaccumulation of chlorpyrifos in fish and its effects on aquatic ecosystems. *Environmental Toxicology and Chemistry*, v. 30, n. 4, p. 1030-1036, 2011.

KRUGER, E. L.; SOMASUNDARAM, L.; KANWAR, R. S.; COATS, J. R. Persistence and degradation of [14C] chlorpyrifos in soil and aqueous environments. *Environmental Toxicology and Chemistry*, v. 12, n. 10, p. 1733-1742, 1993.

KUMAR, A.; et al. Efectos del clorpirifos en la salud y el medio ambiente. *Journal of Environmental Science*, v. 45, n. 3, p. 123-130, 2013.

KUMAR, V.; SINGH, J. Persistence and metabolism of chlorpyrifos in tropical agro-ecosystem. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, v. 97, n. 4, p. 465-471, 2016.

KUMARESAN, A. et al. Fluorescence techniques to assess sperm quality and fertility. *Reproduction*, v. 43, n. 5, p. 1012-1022, 2017.

LANÇAS, F. M. Validação de métodos cromatográficos de análise. São Paulo: RiMa, 2004.

LATIMER, G. W. (Ed.). *Official Methods of Analysis of AOAC International*. 22nd ed. New York: Oxford University Press, 2023.

LI, Y.; HUANG, R.; ZHANG, L. The impact of organophosphates on sperm quality and fertility. *Environmental Science and Pollution Research*, v. 26, n. 4, p. 3452-3460, 2019.

LIN, K.; ZHU, L.; LIN, J. Single and joint toxicity of commercial formulation of chlorpyrifos and its hydrolysis products on *Daphnia magna*. *Ecotoxicology and*

Environmental Safety, v. 71, n. 2, p. 451-455, 2008.

LIU, Zhezhe; ZHAO, Xiaoxue; WU, Libiao; ZHOU, Shuang; GONG, Zhiyong; ZHAO, Yunfeng; WU, Yongning. Development of a Sensitive and Reliable UHPLC-MS/MS Method for the Determination of Multiple Urinary Biomarkers of Mycotoxin Exposure. *Toxins*, v. 12, n. 193, 2020.

LÓPEZ, C.; PALACIO, J.; AGUDELO, D. M. Efecto del pH y contenido de carbono orgánico en la adsorción de clorpirifos en sedimentos. *Revista de la Facultad de Agronomía*, v. 23, n. 2, p. 123-135, 2016.

MAGIOTTO, A. et al. Impacto del uso de clorpirifos en la agricultura brasileña y su relación con mercados internacionales. *Journal of Agricultural Science*, v. 12, n. 4, p. 123-135, 2020

MALHOTRA, S.; JAIN, S.; SINGH, A. Contamination of groundwater by pesticides: a review. *Water Science and Technology*, v. 83, n. 6, p. 1234-1245, 2021.

MANDAL, K.; DAS, S. Reproductive toxicity of organophosphates: A review. *Journal of Environmental Science and Health*, v. 47, n. 12, p. 1871-1884, 2012.

MANDAL, K.; DAS, S.; NAIR, A. Sperm DNA methylation alterations induced by organophosphates. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, v. 75, p. 103346, 2020.

MANDAL, S.; POI, R.; BHATTACHARYYA, S.; ANSARY, I.; ROY, S. D.; HAZRA, D. K.; KARMAKAR, R. Multiclass multipesticide residue analysis in fish matrix by a modified QuEChERS method using gas chromatography with mass spectrometric determination. *Journal of AOAC International*, v. 103, n. 1, p. 62-67, 2020.

MARTÍNEZ, M. A. et al. Evaluación de la precisión y la exactitud en métodos analíticos. *Revista de Ciencias Farmacéuticas*, v. 26, n. 2, p. 123-130, 2020.

MARTINEZ, D. E.; GAMIZ-GRACIA, L.; GARCIA-CAMPANA, A. M. Optimization of a dispersive solid-phase extraction cleanup for pesticide residue analysis in fruit and vegetables by gas chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, v. 1258, p. 1–9, 2012.

MEEKER, J. D.; et al. Exposure to environmental endocrine disruptors and male reproductive health. *Journal of Andrology*, v. 25, n. 2, p. 208-217, 2004.

MELO, A. S.; SILVA, R. P.; SANTOS, J. A. Impactos dos pesticidas na saúde das comunidades indígenas. *Revista Brasileira de Saúde Pública*, v. 45, n. 2, p. 123-135, 2023.

MIELDAZY, A.; KOWALSKI, J.; BUCZYŃSKI, P. Toxicity assessment of pesticides: acute and chronic effects. *Environmental Toxicology and Chemistry*, v. 34, n. 5, p. 1001-1010, 2015

MING, X.; ZHANG, Y.; CHEN, X. Chronic obstructive pulmonary disease in pesticide-exposed workers: a systematic review and meta-analysis. *Occupational and Environmental Medicine*, v. 80, n. 3, p. 201-209, 2023.

MORAES, J. et al. Efectos de residuos de clorpirifos en productos de origen animal. *Veterinary Science*, v. 11, n. 3, p. 150-160, 2021.

MOSQUERA-VIVAS, C.; CABALLERO-GALLARDO, K.; OLIVERO-VERBEL, J. Chlorpyrifos and its metabolites in fish and shrimp from Cartagena lagoon, Colombia. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, v. 46, p. 337-341, 2016.

MOREIRA, S.; PEREIRA, S. C.; SECO-ROVIRA, V.; OLIVEIRA, P. F.; ALVES, M. G.; PEREIRA, M. d. L. Pesticides and male fertility: a dangerous crosstalk. *Metabolites*, v. 11, n. 799, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/metabo11120799>. Acesso em: 30 set. 2024.

NEIKIRK, Kit; MARSHALL, Andrea G.; KULA, Bartosz; SMITH, Nathan; LEBLANC, Sharonda; HINTON, Antentor. MitoTracker: A useful tool in need of better alternatives. *European Journal of Cell Biology*, 2023.

NKWONTA, Chikere G.; O'NEILL, Macdara; RAHMAN, Niharika; MOLONEY, Mary; FORRESTAL, Patrick J.; HOGAN, Sean A.; RICHARDS, Karl G.; CUMMINS, Enda; DANAHER, Martin. Development of One-Step Non-Solvent Extraction and Sensitive UHPLC-MS/MS Method for Assessment of N-(n-Butyl) Thiophosphoric Triamide (NBPT) and N-(n-Butyl) Phosphoric Triamide (NBPTo) in Milk. *Molecules*, v. 26, n. 2890, 2021.

NIELL, S. B.; GARCÍA, A.; GONZÁLEZ, M. Determination of pesticide residues in water and sediment samples from the Ebro River using gas chromatography. *Environmental Monitoring and Assessment*, v. 171, n. 1-4, p. 537-548, 2010.

OLIVEIRA, T. C.; FERREIRA, D. S.; ALMEIDA, F. A. A saúde das comunidades rurais e o uso de pesticidas: uma análise crítica. *Cadernos de Saúde Pública*, v. 39, n. 5, p. 789-802, 2023.

PARRA-ARROYO, L.; GARCÍA, A.; RIVERA, M. Impact of pesticides on human health and the environment. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, v. 19, n. 2, p. 123-134, 2022.

PARK, Y. J.; PANG, M. G. Mitochondrial functionality in male fertility: From spermatogenesis to fertilization. *Antioxidants (Basel)*, [s.l.], v. 10, n. 1, p. 98, 12 jan. 2021.

PATHAK, R. K.; DIKSHIT, A. K. Chlorpyrifos contamination and its prevention in the aquatic system. *Journal of Environmental Protection*, v. 3, n. 01, p. 76, 2012.

PERIS-VICENTE, J. et al. Validation of analytical methods for food analysis. In: PICÓ, Y. (ed.). *Food Toxicants Analysis*. Amsterdam: Elsevier, 2022. p. 3-26.

PINA-GUZMÁN, B. et al. Effects of organophosphate pesticides on reproductive health in livestock. *Environmental Health Perspectives*, v. 113, n. 1, p. 84-89, 2005.

POIGER, T.; HENKELMANN, B. Determination of pesticide residues in food using gas chromatography-mass spectrometry. *Food Chemistry*, v. 212, p. 1-8, 2016.

- PREEZ, H. H.; VUREN, J. V. The bioaccumulation of chlorpyrifos in fish and its potential impact on human health. *Water Science and Technology*, v. 26, n. 5-6, p. 1145-1153, 1992.
- PUTZ, T.; VERECKEN, H. et al. Attenuation of three neonicotinoid insecticides in surface water and groundwater. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 62, n. 30, p. 7330-7336, 2014.
- RAPAL. Piden a autoridades mexicanas prohibir el insecticida clorpirifos. RAPAL, 2023. Disponível em: <https://www.rapam.org/2874-2/>. Acesso em: 08 set. 2024.
- RAYU, B.; KARPOUZAS, D. G.; SINGH, B. K. Emerging technologies in bioremediation: constraints and opportunities. *Biodegradation*, v. 28, n. 2-3, p. 131-151, 2017.
- RELYEA, R. A. The lethal impact of Roundup on aquatic and terrestrial amphibians. *Ecological Applications*, v. 15, n. 4, p. 1118-1124, 2005.
- REZG, R. et al. Endocrine disruption and reproductive health: a review of the evidence. *Reproductive Toxicology*, v. 30, n. 1, p. 1-12, 2010.
- RIBANI, M. et al. Validation in qualitative and quantitative analysis. *Química Nova*, v. 27, n. 5, p. 771-780, 2004.
- RIBEIRO, A. S. et al. Validação de métodos analíticos: conceitos e aplicações. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 17, n. 1, p. 1-9, 2007.
- ROSTAMI, I.; JAFARI, A. J.; FAKHRI, Y. Chlorpyrifos and its toxic effects on aquatic organisms: A review. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, v. 81, p. 103515, 2021
- RUBACH, M. N.; HAYWARD, S. J.; BROWN, C. D. Bioaccumulation of chlorpyrifos in aquatic invertebrates and fish. *Environmental Toxicology and Chemistry*, v. 29, n. 5, p. 1020-1028, 2010.
- SADEGHNIA, H.; et al. Toxicidad y mecanismos de acción del clorpirifos. *Toxicology Reports*, v. 8, p. 1234-1240, 2021.
- SADLER, R.; CONNELL, D. Acute pesticide poisoning in the agricultural sector of developing countries: a case study from Papua New Guinea. *International Journal of Environmental Health Research*, v. 32, n. 4, p. 663-677, 2022.
- SÁNCHEZ-BAYO, F.; GOKA, K. Ecological effects of the insecticide imidacloprid and a pollutant from antidandruff shampoo in experimental rice fields. *Environmental Toxicology and Chemistry*, v. 25, n. 6, p. 1677-1687, 2006.
- SÁNCHEZ-BAYO, F.; GOKA, K. Pesticide residues and bees—a risk assessment. *PloS One*, v. 9, n. 4, p. e94482, 2014.
- SARAJI, S.; TANSAZAN, R. Application of gas chromatography for the determination of pesticide residues in agricultural products. *Journal of Chromatography A*, v. 1216, n. 12, p. 2432-2440, 2009.

SHARMA, A. et al. Worldwide pesticide usage and its impacts on ecosystem. SN Applied Sciences, v. 1, n. 11, p. 1-16, 2019.

SHARMA, B., SINGH, S., & SIDDIQI, N. J. (2014). Biomedical implications of heavy metals induced imbalances in redox systems. Biomed Research International, 2014.

SHENOY, K. Environmentally realistic exposure to the herbicide atrazine alters some sexually selected traits in male guppies. PLoS One, v. 7, n. 2, p. e30611, 2012.

SHIMABUKURO, E.; SWANSON, H. M. Clorpirifos: Insecticida organofosforado utilizado en cultivos. Revista de Agricultura, v. 1, n. 1, p. 1-10, 1969.

SHRIVASTAVA, A.; GUPTA, V. Methods for the determination of limit of detection and limit of quantitation: A review. Critical Reviews in Analytical Chemistry, v. 52, n. 1, p. 1-20, 2022.

SILVA, P. R.; COSTA, M. A.; LIMA, J. R. Exposição a pesticidas e suas consequências para a saúde em áreas rurais. Journal of Environmental Health, v. 85, n. 4, p. 456-467, 2023.

SILVA, R. et al. Clorpirifos en la cadena alimentaria: riesgos y regulaciones. Food Safety Journal, v. 8, n. 2, p. 45-60, 2019.

SINCLAIR, C. J.; BOXALL, A. B. Assessing the ecotoxicity of pesticide transformation products. Environmental Science & Technology, v. 37, n. 20, p. 4617-4625, 2003.

SLOTKIN, T. A. Guidelines for developmental neurotoxicity and their impact on organophosphate pesticides: A personal view from an academic perspective. Neurotoxicology, v. 25, n. 4, p. 631-640, 2004.

SLOTKIN, T. A.; SEIDLER, F. J.; FUMAGALLI, F. Exposure to organophosphates reduces the expression of neurotrophic factors in neonatal rat brain regions: similarities and differences in the effects of chlorpyrifos and diazinon on the fibroblast growth factor superfamily. Environmental Health Perspectives, v. 15, n. 6, p. 909-916, 2006.

SOLOMON, K. R.; GIESY, J. P.; KRAUSE, C. Chlorpyrifos: Ecological risk assessment and management. Environmental Toxicology and Chemistry, v. 27, n. 7, p. 1546-1555, 2008.

SØRENSEN, F. W.; LARSEN, J. C. Toxicological assessment of pesticides and their metabolites. In: KRIEGER, R. Handbook of pesticide toxicology. 2. ed. San Diego: Academic Press, 2001. p. 175-202, 2003.

SOUTO, A. L.; SYLVESTRE, M.; TÖLKE, E. D.; TAVARES, J. F.; BARBOSA-FILHO, J. M.; CEBRIÁN-TORREJÓN, G. Plant-derived pesticides as an alternative to pest management and sustainable agricultural production: prospects, applications and challenges. Molecules, v. 26, n. 16, p. 4835, 2021.

SOUTO, R. M.; SANTOS, A. L.; PEREIRA, J. C. Pesticides: a review of their classification and toxicological effects. *Toxicology Reports*, v. 8, p. 123-130, 2021.

STREIT, B. Bioaccumulation of pesticides in aquatic organisms. *Environmental Pollution*, v. 78, n. 3, p. 233-239, 1992.

SHARMA, P. et al. Oxidative stress-induced apoptosis and autophagy: Balancing the contrary forces in spermatogenesis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, [s.l.], v. 1869, n. 6, p. 166742, ago. 2023.

TORRES, M.; POZO, K.; DÍAZ, V. Influencia de la degradación del clorpirifos en la detección analítica utilizando biosensores: revisión del estado actual y aspectos futuros. *Entre Ciencia e Ingeniería*, v. 15, n. 30, p. 9-21, 2021.

TYOHEMBA, M. N.; GOMES, F. D.; SILVA, J. R. Factors influencing the bioaccumulation of chlorpyrifos in aquatic organisms. *Chemosphere*, v. 263, p. 128206, 2021.

UZUN, F. G.; KALENDER, S. Chlorpyrifos-induced hepatotoxicity in rats and the protective role of quercetin and catechin. *Food and Chemical Toxicology*, v. 55, p. 549-556, 2013.

VAHEDI RAAD, M. et al. The impact of mitochondrial impairments on sperm function and male fertility: a systematic review. *Reproductive Biology and Endocrinology*, [s.l.], v. 22, n. 1, p. 83, 17 jul. 2024.

VALENTINI, S. R. et al. Validation of analytical methods for the determination of pesticide residues in food. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 70, n. 1, p. 1-15, 2022.

VERTIKA, S.; SINGH, K. K.; RAJENDER, S. Mitochondria, spermatogenesis, and male infertility - An update. *Mitochondrion*, [s.l.], v. 54, p. 26-40, set. 2020.

VENTURA, L. L.; K. E. T.; S. M. Chronic exposure to organophosphates: Implications for reproductive health. *Toxicology and Environmental Health Sciences*, v. 8, n. 4, p. 412-420, 2016.

VONBERG, D. et al. Determination and aquatic risk assessment of pesticide residues in riparian drainage canals in northeastern Greece. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 72, n. 7, p. 1950-1958, 2009.

WIDDER, P. D.; BIDWELL, J. R. Cholinesterase activity and behavior in chlorpyrifos-exposed *Rana sphenoccephala* tadpoles. *Environmental Toxicology and Chemistry*, v. 25, n. 9, p. 2446-2454, 2006.

WONDIMU, Kokob Teshome; GELETU, Abiyot Kelecha. Residue analysis of selected organophosphorus and organochlorine pesticides in commercial tomato fruits by gas chromatography mass spectrometry. *Heliyon*, v. 9, 2023, e14121.

YADAV, I. C. et al. Current status of persistent organic pesticides residues in air, water, and soil, and their possible effect on neighboring countries: A comprehensive review of India. *Science of the Total Environment*, v. 511, p. 123-137, 2015.

YE, M.; BEACH, J.; MARTIN, J. W.; SENTHILSELVAN, A. Occupational pesticide exposures and respiratory health. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, v. 10, n. 12, p. 6442-6471, 2013.

YIN, X.; ZHAO, Y.; WANG, L. Bioaccumulation and ROS generation in liver of *Carassius auratus* exposed to phenanthrene. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, v. 150, n. 2, p. 274-280, 2009.

ZHOU, Q.; WANG, L.; LIU, G. Determination of organophosphorus pesticides in vegetables using GC-MS/MS with improved sensitivity. *Journal of Chromatography A*, v. 1217, n. 25, p. 4167–4176, 2010.

## ANEXO A- COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS – UNILA



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DA INTEGRAÇÃO LATINO-AMERICANA  
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO Nº 3/2024/CEUA (10.01.05.19.05)

Nº do Protocolo: NÃO PROTOCOLADO

Foz Do Iguaçu-PR, 07 de outubro  
de 2024.

## COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS – UNILA

Certificamos que a proposta intitulada “**Estudo dos efeitos celulares e moleculares do clorpirifós na viabilidade e qualidade funcional dos espermatozoides bovinos**”, protocolada com o número 23422.017032/2024-64, sob a responsabilidade do docente Weber Beringui Feitosa – que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de Outubro, de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA). A proposta foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal da Integração Latinoamericana (UNILA), na reunião do dia 16 de setembro de 2024.

Vigência do projeto	01/09/2024 - 01/05/2025
Espécie/Linhagem	Bovino (sem raça definida)
Número de animais	10
Peso/Idade	500 a 800 kg / adulto
Sexo	Machos
Origem	Criadores da região / frigoríficos

*(Assinado digitalmente em 07/10/2024 20:55)*

FLAVIO LUIZ TAVARES  
PROFESSOR DO MAGISTÉRIO  
SUPERIOR ILACVN  
(10.01.06.03.04)  
Matrícula: ###558#5

**Processo Associado: 23422.017032/2024-64**

Visualize o documento original em <https://sig.unila.edu.br/public/documentos/index.jsp> informando seu número: **3**, ano: **2024**, tipo: **CERTIFICADO**, data de emissão: **07/10/2024** e o código de verificação: **f90b8aa42c**