



UNIVERSIDAD DE CHILE



FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS

DETERMINACIÓN DE RESIDUOS DE PLAGUICIDAS
ORGANOCORADOS EN LECHE FRESCA PROVENIENTE
DE REBAÑOS DE CABRAS DE LA COMUNA DE CATEMU

CONSTANZA ALEJANDRA RUIZ REYES

Memoria para optar al Título
Profesional de Médico Veterinario
Departamento De Ciencias Clínicas

PROFESOR GUÍA: JUAN LAZO QUEZADA M.V.

SANTIAGO, CHILE
2007

CALIFICACIONES



UNIVERSIDAD DE CHILE



FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS

DETERMINACIÓN DE RESIDUOS DE PLAGUICIDAS ORGANOCORADOS EN LECHE FRESCA PROVENIENTE DE REBAÑOS DE CABRAS DE LA COMUNA DE CATEMU

CONSTANZA ALEJANDRA RUIZ REYES

Memoria para optar al Título
Profesional de Médico Veterinario
Departamento De Ciencias Clínicas

NOTA FINAL:

	NOTA	FIRMA
PROFESOR GUÍA : JUAN LAZO QUEZADA
PROFESOR CONSEJERO: BETTY SAN MARTIN NUÑEZ
PROFESOR CONSEJERO: PILAR OVIEDO HANNIG

SANTIAGO, CHILE
2007

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo no podría haberse llevado a cabo sin la generosa colaboración de muchas personas a quienes expreso mis agradecimientos.

Quisiera extender un especial reconocimiento al Doctor Juan Lazo Quezada, quién confió en mi para iniciar este trabajo y me brindó siempre todo su apoyo en lo que necesitase.

También agradezco sinceramente a la Doctora Betty San Martín y a todo el equipo del laboratorio de Farmacología de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile por el financiamiento prestado para el desarrollo de este estudio y por ayudarme en el trabajo y desempeño en el laboratorio.

Mis sinceros agradecimientos a los productores de queso de cabra de la comuna de Catemu, por permitirme la recolección de las muestras de leche, sin su ayuda este trabajo no podría haberse llevado a cabo.

Finalmente, quisiera agradecer a todos mis seres queridos, padres, hermana, tíos, amigas y amigos, que siempre me apoyaron y animaron para seguir adelante en todos mis proyectos.

INDICE

RESUMEN.....	1
SUMMARY.....	3
INTRODUCCIÓN.....	5
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	8
Historia de los plaguicidas.....	8
Efecto de los plaguicidas en el medio ambiente y en la salud animal.....	11
Plaguicidas organoclorados.....	13
Excreción de residuos de plaguicidas organoclorados presentes en la leche... 	16
Factores que determinan la contaminación de la leche con residuos de plaguicidas	
Organoclorados.....	18
Legislación sobre plaguicidas.....	21
Metodologías analíticas.....	24
OBJETIVOS.....	29
MATERIAL Y MÉTODOS.....	30
RESULTADOS.....	39
DISCUSIÓN.....	57
CONCLUSIONES.....	64
BIBLIOGRAFÍA.....	66

RESUMEN

Se evaluaron los niveles de residuos de siete plaguicidas organoclorados (Heptacloro, Aldrin, Clordano iso a, Clordano iso b, DDD, DDE y Mirex) presentes en noventa muestras de leche proveniente de rebaños de cabras de la Comuna de Catemu, Provincia de San Felipe, Quinta Región. Las muestras de leche fueron recolectadas en los meses de Noviembre y Diciembre del año 2006, refrigeradas y trasladadas al Laboratorio de Farmacología de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile donde fueron analizadas.

Para realizar el análisis de los residuos de los siete plaguicidas fue necesario en primer lugar validar la metodología analítica de detección de plaguicidas organoclorados en leche. Esta validación consistió en demostrar que los resultados obtenidos fueron confiables y comparables a través de una serie de parámetros que son medibles. La validación fue realizada por el laboratorio de Farmacología de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile.

La técnica de aislamiento de residuos conocida como dispersión en matriz de fase sólida fue utilizada para la extracción y posterior detección por cromatografía gaseosa con detector de captura electrónica de los siete plaguicidas presentes en la leche. La muestra se mezcló con 4 gramos de octadecilsilica y el polvo homogeneizado resultante se colocó sobre una columna de adsorción con 2 gramos de Florisil®. La extracción de los plaguicidas se realizó con 15 ml de hexano grado pesticida.

La metodología analítica cumplió satisfactoriamente con los parámetros de especificidad, sensibilidad, recuperación, repetitividad, precisión, linealidad de las curvas, límite de decisión, capacidad de detección y robustez para poder ser validada según lo exigido por la directiva 2002/657/CE.

Todos los plaguicidas analizados mostraron límites máximos residuales menores a los límites permitidos por el *Codex Alimentarius* para plaguicidas organoclorados en leche. Aunque este resultado es positivo no se puede descartar la necesidad de llevar a cabo medidas para mejorar las prácticas agrícolas y así asegurar alimentos confiables y saludables para la población.

SUMMARY

The levels of seven organochlorine pesticide residues (Heptachlor, Aldrin, Chlordane iso a, Chlordane iso b, DDD, DDE and Mirex) found in ninety milk samples from goat flocks in the Town of Catemu, Province of San Felipe, Fifth Region, were tested. The milk samples were collected during November and December, 2006; refrigerated and moved to the Pharmacology Laboratory of the Faculty of Livestock and Veterinary Sciences at the University of Chile for being analyzed.

For assessing the seven-analyzed-pesticide residues it was necessary first to validate the analytical methods for the detection of organochlorine pesticides in milk. For this validation the Pharmacology Laboratory of the Faculty of Livestock and Veterinary Sciences at the University of Chile had to prove that the results found were reliable and able to be compared through a number of measurable parameters.

The residue isolation technique known as matrix solid-phase dispersion was used for the extraction and subsequent detection through gas chromatography with an electron capture detector of the seven pesticides found in the milk. The sample was mixed with 4 grams of octadecilsilica and the resulting homogenized powder was placed on an adsorption column with 2 grams of Florisil®. The pesticide extraction was carried out with 15 ml of pesticide grade hexane.

The analytical methods successfully fulfilled with the specificity, sensitivity, recovery, repeatability, accuracy, curve linearity, decision limit, detection capability and ruggedness parameters as to be validated according to the provisions in Decision 2002/657/EC.

All the pesticides analyzed showed maximum residue limits below the limits permitted by the *Codex Alimentarius* for organochlorine pesticides in milk, which does

not rule out the need for taking measures to improve farming practices in order to guarantee reliable and healthy food for the town.

INTRODUCCIÓN

En las últimas décadas, las cosechas de productos alimenticios han experimentado un aumento considerable. Ello ha sido posible, en gran parte, por el resultado obtenido en la lucha contra las plagas que los deterioraban, siendo un hecho innegable que los plaguicidas han desempeñado en la misma un papel muy importante. Sin embargo, la aplicación de estos compuestos en forma masiva, trajo como consecuencia que una parte de ellos persistiera en el medio ambiente, conservando sus propiedades activas y, más aún, que pasara a organismos superiores.

La protección de las plantas con productos químicos naturales o sintéticos, que componen el conjunto de sustancias denominadas plaguicidas, ha sido de gran importancia en la actividad agrícola mundial, como un medio para aumentar la producción de alimentos (Díaz y García, 2003).

Según la Organización Mundial de la Salud (O.M.S.), un pesticida o plaguicida es “cualquier compuesto o mezcla de compuestos, de carácter orgánico o inorgánico, que están destinados a combatir insectos, ácaros, roedores y otras especies indeseables de plantas y animales que son perjudiciales para el hombre o que interfieren de cualquier otra forma en la producción, elaboración, almacenamiento, transporte o comercialización de alimentos, productos agrícolas, madera y productos de madera o alimento para animales, incluso aquellos que pueden administrarse a los animales para combatir insectos arácnidos u otras plagas en o sobre sus cuerpos” (O.M.S., 1992).

Los plaguicidas organoclorados son compuestos muy estables y persistentes en el ambiente y por su característica de ser compuestos liposolubles, se acumulan en el tejido adiposo, incluyendo la grasa de la leche materna.

Estos plaguicidas organoclorados han sido usados en muchos países tropicales en programas para el control de malaria y también se han utilizado para combatir

ectoparásitos del ganado y controlar pestes agrícolas. Los animales productores de leche, como las vacas y cabras, acumulan residuos de estos plaguicidas a través del consumo de alimento contaminado y la inhalación del aire. Debido a sus propiedades lipofílicas, los plaguicidas organoclorados son primariamente almacenados por los tejidos ricos en grasa y subsecuentemente traslocados y excretados a través de la grasa láctea (Bentabol y Jodral, 1995).

Es conocido que estos plaguicidas organoclorados son contaminantes persistentes del medio ambiente. Estos contaminantes producen importantes efectos tóxicos, así diversas investigaciones han relacionado la exposición a estos plaguicidas con incrementos en el riesgo de contraer cáncer en humanos (Wolf y Toniolo, 1995; Mansour, 2004).

Investigaciones hechas por Mallatou *et al*, en 1996 en Grecia, demostraron que de 38 muestras de leche bovina analizadas, el 28.9 % contenía residuos de uno o más plaguicidas organoclorados. Similarmente, en México, en el año 1998, los investigadores Prado *et al*, observaron en 96 muestras de leche que el 47,9 % excedían el límite máximo de residuos de Hexaclorociclohexano permitido para ese país. En China, el análisis de dieciocho muestras de yogurt comerciales, mostró que el 100 % de ellas se encontraban contaminadas con residuos de DDT (Zhang *et al.*, 2006).

Todos los países deben poseer la capacidad tecnológica y humana para detectar los diversos residuos químicos en los alimentos de origen animal, además de desarrollar y validar técnicas analíticas que permitan llevar programas adecuados para el control de residuos químicos en relación con la realidad económica y de infraestructura del país. Por ello, es necesario implementar en Chile métodos analíticos para la detección de plaguicidas organoclorados de interés en la actividad pecuaria.

La implementación de una metodología analítica que busca la determinación de compuestos químicos presentes en diversos alimentos, está relacionada con las normas de calidad que sigue un laboratorio analítico. Organismos como la Unión Europea entregan pautas a los laboratorios para la validación de los métodos, con el fin de asegurar la calidad de los resultados. Dicha institución señala que cada laboratorio puede implementar sus propios métodos siempre que sean validados.

Considerando el lugar especial que tiene la leche y los productos lácteos en la dieta de los consumidores, el incremento en el consumo y conocimiento de las propiedades de la leche de cabra, es muy importante que se conozca si existen residuos de estos compuestos en ella y, de ser así, los niveles que éstos presentan.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

Historia de los plaguicidas

Los plaguicidas se definen como sustancias capaces de prevenir o controlar las plagas de animales y vegetales. Pueden ser de tipos tan diversos como bacterias, virus, extractos vegetales como de productos químicos, orgánicos e inorgánicos. Los Residuos de plaguicidas son sustancias presentes en alimentos, productos agrícolas o alimentos para animales como consecuencia del uso de un plaguicida. El término incluye cualquier derivado de un plaguicida, como productos de conversión, metabolitos y productos de reacción y las impurezas consideradas de importancia toxicológica (FAO/OMS, 2003).

Según su estructura química, los plaguicidas se clasifican en: Organoclorados, Organofosforados, Piretroides, Carbamatos, Ditiocarbamatos y otros (Díaz y García, 2003).

El uso de plaguicidas químicos ha generado un gran número de beneficios a la salud, incluyendo el control de enfermedades transmitidas por insectos vectores, ayudando así a limitar la extensión de ciertas enfermedades, y además han contribuido a los increíbles aumentos en la calidad y variedad de la dieta. Sin embargo, el uso de estos compuestos en forma inadecuada, ha creado riesgos potenciales los que tienen un gran impacto en la salud pública. El rango de los efectos adversos por plaguicidas en la salud incluyen alteraciones agudas y crónicas al sistema nervioso, lesiones al pulmón y a los órganos reproductivos, disfunciones en el sistema inmunológico y endocrino, defectos al nacimiento y cáncer (Mansour, 2004).

La eliminación de insectos se remonta posiblemente a los tiempos de Grecia y Roma clásicas. En el siglo XVI, los chinos empleaban pequeñas cantidades de compuestos arsenicales como insecticidas. A mediados del siglo XIX, en 1876, los trabajos realizados con estos compuestos se plasmaron en la introducción del Verde de París, forma impura del arsénico de cobre, que en Estados Unidos sirvió para el control del escarabajo de la papa (OMS,1992).

En 1874, Zeilder dio a conocer la síntesis del compuesto organoclorado diclorodifenil-tricloro-etano, mejor conocido como DDT. Sin embargo, éste no se utilizó como insecticida propiamente tal sino hasta 1939, durante la Segunda Guerra Mundial, para proteger a los soldados de graves enfermedades como el paludismo y tifus exantemático y también para combatir moscas, roedores y otras plagas (Carrasco y Primo, 1980).

Según estudios hechos por Arata en 1984, unos pocos años después de la síntesis del DDT, fue introducido el arseniato de plomo (1882) utilizándose para el control de una mariposa, mientras los arseniatos de sodio y calcio se aplicaron para el control de las pestes de algodón, siendo los más importantes hasta los años 1940. La introducción del cal-azufre y ácido cianhídrico en 1886, en California, fue exitosa para combatir y controlar a los pulgones en huertos frutales; sin embargo, luego en 1916 (30 años después), se pudo ver que los insectos habían desarrollado resistencia a estos venenos, prediciendo lo que pasaría con muchos otros plaguicidas en el futuro.

Entre 1950 y 1955 empezaron a utilizarse en los Estados Unidos herbicidas derivados de la urea (aparece el malatión). Durante los años 1955 y 1960 aparecen los herbicidas triazínicos y los derivados del amonio cuaternario. Luego, entre 1960 y 1965 fueron descritos el diclobenil, el trifluralín y el bromoxilino, mientras que en 1968 se introdujo el benomilo como fungicida sistémico. Durante los dos decenios siguientes a

1970 aparecieron muchos plaguicidas nuevos, a base de los conocimientos obtenidos. Los ejemplos más representativos de esta nueva generación de agroquímicos son los herbicidas sulfonilureas y los nuevos fungicidas sistémicos, tales como el metalaxilo y el triadimefon. Un nuevo e importante grupo de insecticidas comprende a los piretroides sintéticos fotoestables, obtenidos a partir de piretinas naturales (OMS, 1992).

Los plaguicidas se clasifican según la plaga que necesitan controlar, en los siguientes grupos:

Acaricidas: Su acción está destinada al control de ácaros.

Fungicidas: Son utilizados en el combate de hongos.

Insecticidas: Se utilizan en el control de distintas especies de insectos.

Nematicidas: Se aplican en el control de nemátodos.

Rodenticidas: Conocidos también como raticidas, se usan en el control de ratas y ratones.

Molusquicidas: Son utilizados en el control de ciertas especies de moluscos que afectan algunos cultivos (Díaz y García, 2003).

De acuerdo al tiempo de persistencia de la acción del plaguicida se ha propuesto la siguiente clasificación (Basualto, 1991):

a) No persistentes: (1 – 12 semanas), ej: organofosforados y carbamatos.

b) Moderadamente persistentes: (1 – 18 meses), ej: la mayoría de los herbicidas.

c) Persistentes: (2 – 5 años), ej: hidrocarburos clorados.

d) Permanentes: No tienen degradación, por lo tanto su duración real es indefinida, estos incluyen tóxicos metálicos tales como el mercurio, el arsénico y el plomo.

Efecto de los plaguicidas en el medio ambiente y en la salud animal.

A nivel mundial se ha probado que el uso de plaguicidas ayuda a resolver muchos de los problemas relacionados con la salud humana y la producción de alimentos. Sin embargo, tales usos ocasionalmente pueden ir acompañados con efectos adversos en la salud del hombre y el medio ambiente (Mansour, 2004).

Ya en 1971, Durham confirmaba los beneficios y riesgos del uso de plaguicidas a través de una serie de estudios. Determinó que dentro de los beneficios del uso de plaguicidas se encontraba el control de enfermedades transmitidas por insectos vectores, como la malaria, y que las medidas de control llevadas a cabo para eliminar este mosquito reducían gradualmente la enfermedad, pero que no fue hasta la aparición del DDT que la enfermedad estuvo virtualmente erradicada de los Estados Unidos. Este investigador pudo determinar además el rol de los plaguicidas en el incremento de la producción de alimentos como otro efecto beneficioso de estos agroquímicos. Por otra parte, dentro de los efectos tóxicos de los plaguicidas, Durham cita la inducción de la actividad enzimática mediante radicales libres, la alteración de la respuesta inmunológica, además de afectar los procesos reproductivos, alterar el metabolismo lipídico, el transporte de vitaminas y de glucosa. Por otro lado, algunos plaguicidas como el DDT y sus metabolitos son considerados mutagénicos, teratogénicos o carcinogénicos. También demostró que la raza, la localización geográfica y la edad serían factores importantes en determinar los niveles de almacenamiento de plaguicidas, y que el factor más importante en determinar la toxicidad del compuesto, incluyendo el cáncer y los efectos teratogénicos, sería la dosificación.

Existen suficientes evidencias que muestran la interacción de los plaguicidas organoclorados con el sistema endocrino, resultando en numerosos efectos biológicos como estrogénicos, antiestrogénicos y antiandrogénicos (Colborn *et al.*, 1996). Muchos

de estos compuestos organoclorados son utilizados como plaguicidas agrícolas o como compuestos industriales que también actúan como contaminantes ambientales. Al ser compuestos químicamente estables y fuertemente lipofílicos, los compuestos organoclorados tiene una lenta degradación y tienden a bioacumularse en los tejidos ricos en lípidos (Muñoz de Toro *et al.*, 2005).

Debido a que son capaces de atravesar la barrera placentaria, los plaguicidas organoclorados y particularmente el DDT, pueden ser responsables de daño teratogénico y malformaciones congénitas. La sospecha de estos efectos, ha surgido de los casos descritos en embarazadas que cumplen faenas agrícolas de temporada, en las que se aplican este tipo de plaguicidas, los que una vez en el organismo materno, alcanzan la circulación fetal pudiendo ocasionar los efectos señalados (Díaz y García, 2003).

La exposición a los plaguicidas también puede interferir con los parámetros reproductivos como fue descrito en trabajadores expuestos a dibromocloropropano (DBCP) cerca de veinte años atrás (Whorton *et al.*, 1977). En los años siguientes, muchos estudios investigaron la exposición de mujeres y hombres trabajadores de granjas agrícolas expuestos a otros tipos de plaguicidas. En general, los estudios hechos en trabajadores de sexo masculino confirman los efectos negativos de la exposición a los plaguicidas en diferentes parámetros de salud reproductiva, incluidos daño espermático, baja fecundidad e incluso abortos espontáneos en las mujeres de los trabajadores expuestos (Lauria *et al.*, 2006).

Las investigaciones relacionadas con los parámetros reproductivos en mujeres con alta exposición a plaguicidas no son numerosas, pero los efectos negativos, como abortos espontáneos, defectos congénitos y nacimientos prematuros se han sugerido en algunos estudios (Nurminen, 1995; Longnecker *et al.*, 2001).

Investigaciones hechas por Lauria *et al*, en el año 2006, evaluaron el efecto de la exposición a plaguicidas en mujeres trabajadoras de granjas, sobre el tiempo de concepción. Las mujeres que trabajaban en esas granjas esperaban en promedio cerca de 1.4 meses más para concebir que mujeres que desempeñaban otros trabajos.

En Pakistán en el año 2006, Azmi *et al* estudiaron el efecto de los residuos de plaguicidas en la salud y en los niveles de diferentes enzimas en la sangre de trabajadores de granjas expuestas a plaguicidas de un área rural de la Ciudad de Gadap, encontrando que el nivel de las enzimas GOT (Transaminasa glutámico oxalacética), GPT (Transaminasa glutámico piruvica) y AP (Fosfatasa alcalina), en personas expuestas a plaguicidas estaban por encima de los niveles encontrados en personas no expuestas. Esto sería posible debido a que la prolongada exposición a los plaguicidas haría que los niveles de enzimas se incrementaran para detoxificar los residuos de éstos. Este aumento podría deberse a una mutación en los genes responsables de la síntesis de esas enzimas.

Plaguicidas Organoclorados

Los organoclorados conforman un grupo de plaguicidas artificiales desarrollados principalmente para controlar las poblaciones de insectos plaga. Su origen se remonta a la fabricación del DDT (diclorodifenitricloroetano) en 1874. De ahí en adelante y por muchas décadas, dicho compuesto fue un arma importante en la lucha química y en el control del mosquito *Anopheles* transmisor de la malaria. Los organoclorados son, en esencia, hidrocarburos con alto contenido de átomos de cloro.

Para Fernicola (1985), los plaguicidas organoclorados comprenden a los derivados del etano, como el DDT, los derivados clorados de los ciclodienos, entre los

que están el Clordano, Aldrín, Dieldrín, Heptacloro, Endrín y Toxafeno, y los compuestos relacionados con el Hexaclorociclohexano (HCH), entre los cuales destaca el Lindano.

Entre los plaguicidas organoclorados considerados como los más persistentes se encuentran el DDT y sus metabolitos y los derivados del HCH. Estos son compuestos sintéticos que están constituidos por uno o más anillos bencénicos en ocasiones enlazados además a una molécula de etano, como es el caso de DDT y los compuestos resultantes del metabolismo de éste que dan origen al DDD y DDE (Barral *et al.*, 2005). Se caracterizan por ser compuestos poco solubles en agua, ser estables a la luz solar, a la humedad, al aire y al calor, transformándose así en sustancias persistentes en el medio ambiente a lo largo del tiempo (IFCS, 2003).

En 1948 se descubrió que el DDT se acumulaba por períodos indefinidos en tejidos humanos y en 1970 varios estudios revelaron que se encontraba presente en diversos tejidos de la población estadounidense. Posteriormente se comprobó que esto también sucedía con otros insecticidas clorados como el Hexaclorobenceno, Heptacloro, Aldrín y Dieldrín (Sherma, 1999).

Las principales vías de ingreso de estos compuestos al organismo, las constituyen el tracto digestivo, la vía respiratoria y la cutánea. Su absorción, en grandes cantidades, se facilita cuando estos plaguicidas se hayan disuelto en grasa animal o vegetal, siendo la penetración dérmica muy variable de acuerdo a la especie animal. Este es uno de los fundamentos de por qué, en el caso particular de los seres humanos, el uso del Lindano para el tratamiento de sarna y pediculosis esté contraindicado en niños menores, debido a que en ellos se produce mayor absorción a través de la piel, con evidente riesgo de provocar compromiso neurológico como manifestación de intoxicación aguda (París y Ríos, 2001).

Los plaguicidas organoclorados en el hígado sufren un lento proceso de biotransformación, por acción de enzimas microsomales las cuales actúan sobre los compuestos clorados a través de mecanismos de oxidación y conjugación, transformando así las moléculas liposolubles en hidrosolubles, las que sí pueden ser eliminadas lentamente del organismo, preferentemente a través de los riñones (Díaz y García, 2003).

La principal acción tóxica la ejercen sobre el sistema nervioso central, interfiriendo con el flujo de cationes a través de las membranas de las células nerviosas, aumentando de esta forma la irritabilidad de las neuronas. Actúan por interferencia o inhibición de la enzima ATPasa que regula los iones de Calcio de la membrana celular, impidiendo así el rápido retorno al estado de equilibrio eléctrico de la neurona. La enzima ATPasa, produce la hidrólisis del ATP que pasa a ADP, el que es capaz de capturar iones calcio y fijarlos a las proteínas transportadoras de calcio existentes en la membrana. Si se interfiere la acción de esta ATPasa, no se forma el complejo ADP-Calcio y no se transporta el mismo a la membrana. Esta disminución de calcio en la membrana produce síntomas de hiperestimulación, los que se agravan al disminuir la concentración de iones calcio, en tanto que se aminoran si aumenta su concentración (Ramírez, 2006).

Excreción de residuos de plaguicidas organoclorados presentes en la leche.

Existen evidencias de que los residuos de plaguicidas organoclorados son eliminados a través de la leche, transformándose de esta manera en una fuente potencial de compuestos nocivos para la población.

Estudios realizados por Campos en 1990, midiendo residuos de plaguicidas organoclorados en leche materna, en la provincia de Cautín, demostraron la presencia de éstos compuestos en el 100 % de las muestras, siendo el DDT y el grupo del Heptacloro los residuos más frecuentemente encontrados; detectándose además Lindano y Aldrín.

Investigaciones realizadas en España por diversos autores han estudiado la presencia de residuos de estos plaguicidas en leches bovinas, determinado la presencia de residuos de HCH, Lindano, Heptacloro, Aldrin, Dieldrin, Endrin, isómeros del Clordano, DDT y sus metabolitos. A pesar de esto todos los plaguicidas analizados presentaron límites máximos residuales por debajo de los permitidos para esos plaguicidas en ese país (Losada *et al.*, 1996; Martínez *et al.*, 1997).

En relación a los efectos en la Salud Pública, el Instituto de Salud Pública de Chile, ha realizado numerosos estudios en busca de residuos de plaguicidas en los alimentos. Así, en 1982, se inició un programa para la detección de residuos de plaguicidas organoclorados en leche, productos lácteos y grasa del bovino. Los resultados entre los años 1982 y 1985, permitieron analizar dos mil cien muestras de alimentos, superando los límites máximos establecidos por el Ministerio de Salud en quinientas dieciocho de ellas, lo que representa un 25% de no conformidad (Triviño, 1982).

Con respecto al Endosulfán, éste es un plaguicida del grupo de los insecticidas organoclorados, que generalmente es usado en la agricultura para el control de varias plagas de cultivos en India y se ha reportado su presencia como residuo en diferentes

alimentos concentrados y forrajes verdes en concentraciones superiores a 6 ppm (Kang *et al*, 2002). Sin embargo, se ha comunicado que, a diferencia de otros insecticidas organoclorados, el endosulfan aparentemente no es traspasado a la leche del ganado cuando es ingerido con el alimento de los animales, aunque sea consumido en altas concentraciones y por largos periodos de tiempo (Surendra *et al*, 2000).

Kathpal *et al*, en el año 2001, reportó que en cien muestras de leche bovina obtenidas de diferentes lugares de India, quince de ellas contenían residuos de endosulfan sobre los límites máximos residuales.

En otra investigación realizada con Endosulfan (isómeros α , β y endosulfan sulfato) doce cabras lactantes de segundo y tercer parto fueron divididas en tres grupos de tratamiento y se les suministró alimentos adicionados con Endosulfan por un periodo de veinticinco días consecutivos, tiempo luego del que se analizó el efecto de residuos de Endosulfan en la producción de leche de las cabras. En este estudio se determinó que cuando el Endosulfan se administra en altas dosis puede pasar a la leche en cierto grado y que la excreción de sus residuos en la leche de cabra incrementaría en la medida que se incrementa la dosis del plaguicida en el alimento ofrecido al animal y los días que el animal consume dicho alimento. Además en este estudio no se observaron cambios en la utilización de nutrientes, ingesta de alimentos y rendimiento lácteo como resultado de la ingesta de alimentos contaminados con el plaguicida en las cabras, pero serían necesarios otros estudios para determinar los efectos del endosulfan en los animales cuando es administrado en bajas dosis y por largos periodos de tiempo. (Nag *et al*, 2005). Sin embargo, investigaciones hechas por Girdhar y Singhal en el año 1989, determinaron que la utilización de nutrientes y la ingesta de alimento en los animales que consumían alimentos contaminados con plaguicidas era variable y dependía del tipo

y dosificación del plaguicida, la especie, el estado de madurez fisiológica del animal, el modo y la duración de la suplementación, el estado nutricional del animal, etc.

Cuando se les suministró Endosulfan a un grupo de cabras lactantes, en razón de 1 mg/Kg. de peso corporal por día, por veintiocho días consecutivos, los residuos de α y β Endosulfan fueron detectados principalmente en riñones, tracto gastrointestinal, hígado, cerebro, músculo, bazo y leche, lo que indicaría que el plaguicida traspasa la leche de las cabras y afecta a diferentes órganos. Estos órganos podrían ser utilizados como monitores de la presencia de Endosulfan en animales destinados al consumo humano. (Indraningsih *et al*, 1993).

Factores que determinan la contaminación de la leche con residuos de plaguicidas organoclorados.

Los factores que determinan la ocurrencia y concentración de los plaguicidas en la leche de los animales pueden ser clasificados en características químicas y maternas. Las características químicas incluyen el grado de ionización de la leche, la solubilidad lipídica de ella, la masa molecular más el grado y naturaleza de la asociación del plaguicida con otros constituyentes de la sangre. Las características maternas incluyen la exposición de las madres al compuesto, el contenido de grasa en la leche, la edad de la madre al momento del parto y su cantidad de tejido adiposo (Gallenberg y Vodcnik, 1989).

Estudios mas recientes realizados por Harris *et al* (2001), concluyen que la edad, el periodo de gestación, la movilización grasa y el tiempo de muestreo serían los factores que más afectan la transferencia de residuos de plaguicidas organoclorados a la leche.

Las causas fundamentales de la presencia de residuos por uso de plaguicidas organoclorados en la leche son sus propiedades fisicoquímicas de persistencia, liposolubilidad y bioacumulación, así como el uso excesivo de éstos compuestos en las prácticas agropecuarias y el uso en el control de enfermedades transmitidas por insectos vectores (Pinto *et al*, 1990a).

Entre los factores que pueden incidir en la llegada y posterior acumulación de estos residuos de plaguicidas en el tejido animal se encuentra la presencia de ellos en empastadas y alimentos concentrados para animales. En tal sentido, estudios realizados en la Provincia de Valdivia por Pinto *et al*, (1990b) demostraron la presencia de residuos de Lindano, Heptacloro epóxido, Dieldrín, Aldrín, Endrín, DDT y metabolitos de éstos, en pradera, heno y concentrado para animales, a excepción del Dieldrín y Aldrín, los que no se detectaron en muestras de heno y concentrado respectivamente. En el mismo estudio, estos autores determinaron que las principales causales de contaminación del ganado con residuos de plaguicidas organoclorados eran: alimentos para uso animal contaminados (pradera, heno, concentrado, ensilaje, otros), control de parásitos en el animal, control de insectos en los establos, contaminación ambiental (agua, aire, suelo), entre otras. En la figura 1, se muestran las principales vías de contaminación de la leche por los pesticidas organoclorados.

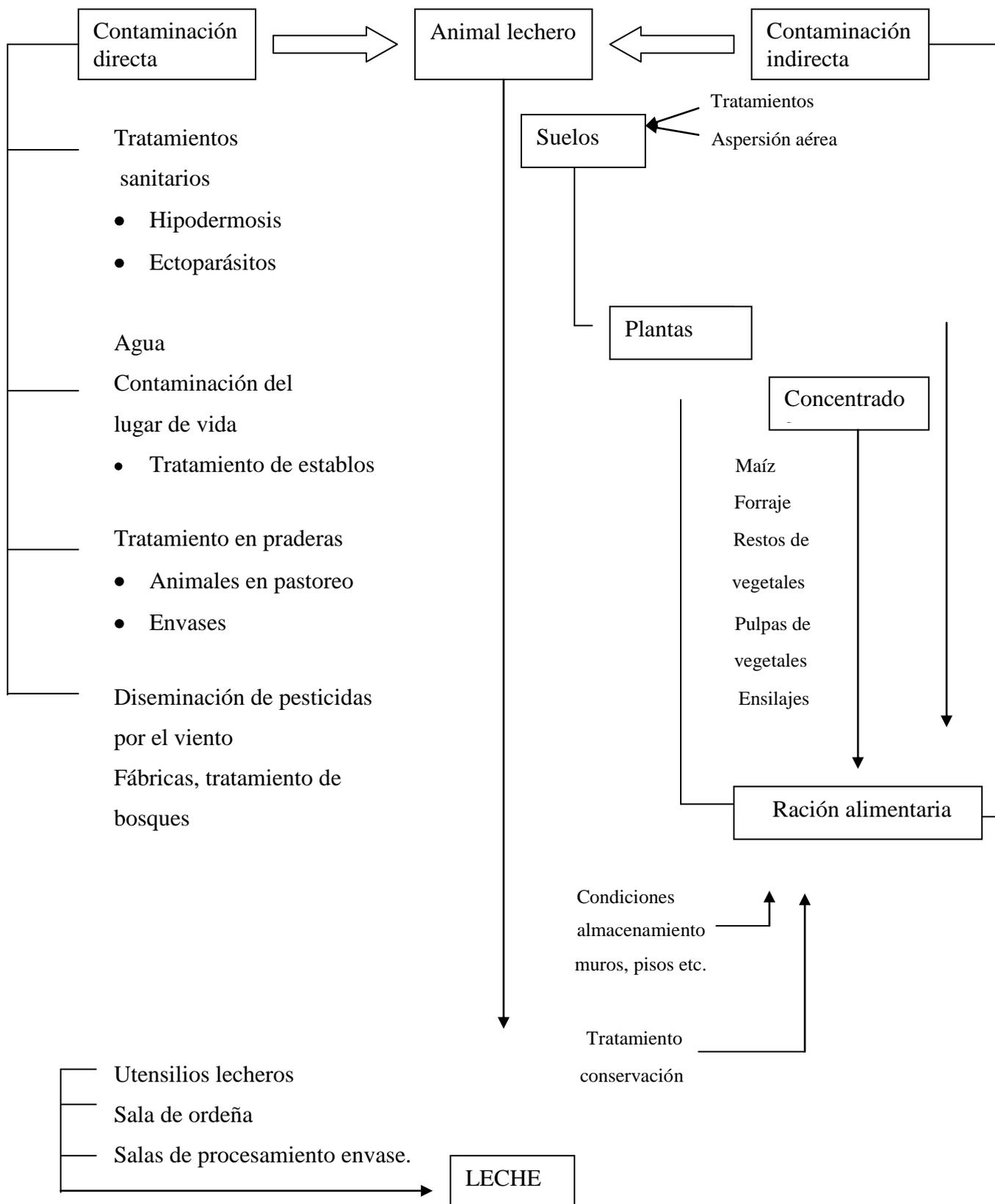


Figura 1: Vías principales de contaminación de la leche por residuos de plaguicidas organoclorados (Pinto *et al*, 1990b).

Legislación sobre plaguicidas.

Los plaguicidas se utilizan en muchos aspectos de la producción agrícola y pecuaria. Sin embargo, debido a los efectos tóxicos anteriormente descritos en animales y en la población humana y considerando su capacidad de acumularse en los alimentos de origen animal, ha sido necesario legislar y restringir su uso. Diversas organizaciones a nivel nacional e internacional han establecido normas y límites en el uso de plaguicidas, dentro de los que se encuentran los del tipo organoclorados.

Legislación Internacional.

Actualmente el control de la presencia de residuos resultante del uso de plaguicidas o de accidentes en que estén estos implicados es un aspecto importante a considerar para asegurar la inocuidad de alimentos como la leche y sus derivados.

Dentro de las organizaciones internacionales que regulan la presencia de plaguicidas organoclorados en los alimentos se pueden señalar el *Codex Alimentarius*, FAO/OMS, Unión Europea y Departamento de Agricultura estadounidense (USDA) (US Department of Agriculture, 1990; Long *et al.*, 1991; FAO/OMS, 1998).

El peligro potencial para la salud humana es la principal razón para que ciertos plaguicidas fueran excluidos o severamente restringidos en su uso (Long *et al.*, 1991). Al respecto, el programa conjunto de la FAO/OMS sobre normas alimentarias, a través de la Comisión del *Codex Alimentarius*, publicó en 1998 los Límites Máximos Residuales para residuos de plaguicidas en alimentos de origen animal, con el objetivo de proteger la salud del consumidor y asegurar la aplicación de prácticas equitativas en el comercio de alimentos (FAO/OMS, 1998).

Por otro lado, la organización Mundial de Comercio (OMC), estableció un acuerdo entre los países miembros sobre la aplicación de medidas Sanitarias y Fitosanitarias, que se refiere a la aplicación de reglamentaciones en materia de inocuidad de los alimentos y control sanitario de los animales y vegetales. En este acuerdo, si bien es cierto la OMC autoriza a los países a establecer sus propias reglamentaciones, alienta a los gobiernos a que armonicen sus medidas, recomendando que se utilicen normas y directrices internacionales elaboradas por la Comisión mixta FAO/OMS y *Codex Alimentarius* cuando existan.

Para definir un producto libre de residuos químicos los países y organizaciones internacionales establecieron los Límites Máximos Residuales (LMRs) para la mayoría de los plaguicidas. El *Codex alimentarius* define los LMR como la concentración máxima de un residuo de plaguicida que se permite o reconoce legalmente como aceptable en o sobre un alimento, producto agrícola o alimento para animales (FAO/OMS, 2003).

Legislación Nacional.

El Servicio Agrícola y Ganadero (SAG) organismo dependiente del Ministerio de Agricultura (MINAGRI) es la entidad encargada por ley de reglamentar y controlar los diversos aspectos que tienen relación con la fabricación y/o formulación, importación, distribución, venta y aplicación de los plaguicidas de uso agrícola. Esta legislación se encuentra en el Decreto Ley N° 3.557, publicado en el Diario Oficial con fecha 09/02/81 (Chile, 1980). Su objetivo es evaluar la información entregada por los fabricantes y decidir qué productos se autorizan para ser usados y vendidos en nuestro país, previa evaluación de datos científicos que demuestren que el producto es eficaz

para el fin a que se destina y no presenta riesgos indebidos para la salud humana o el medio ambiente. Cabe destacar, que los plaguicidas de uso doméstico los autoriza el Instituto de Salud Pública (ISP), Organismo dependiente del Ministerio de Salud.

El SAG ha dictado diversas disposiciones dirigidas a establecer regulaciones, restricciones y prohibiciones que se han considerado necesarias para propender al empleo correcto y eficiente de estos productos en la protección de los cultivos, con riesgo mínimo para la salud humana, la fauna, la flora y el medio ambiente.

La legislación que regula el uso de plaguicidas tiene como objetivo proteger tanto a los usuarios de estos productos como a la población en general, los consumidores, los animales domésticos y al medio ambiente, además, de asegurar al usuario la eficacia en el control de la (s) plaga (s) de acuerdo a los antecedentes que presentó el fabricante o importador, al momento de solicitar la evaluación y autorización del plaguicida al SAG.

En nuestro país, estas regulaciones se encuentran en varios Ministerios y ellas van desde leyes que rigen para todo el país, así como algunos decretos y resoluciones que rigen a nivel nacional o regional (Chile, 2006).

El SAG puede prohibir la importación, fabricación, venta y uso de los plaguicidas autorizados si existe información que indique que estos productos presentan un riesgo para la salud de las personas, animales y medio ambiente. También, si la presencia de residuos de estos plaguicidas constituye una limitación para las exportaciones de origen animal o vegetal.

En Chile, las tolerancias máximas de residuos de plaguicidas en los alimentos de consumo interno, son fijadas por el Ministerio de Salud a través de su División de Salud Ambiental. Estas tolerancias fueron fijadas utilizando como referencia las recomendaciones del programa conjunto FAO/OMS sobre normas alimentarias y el

Codex Alimentarius. Los valores establecidos para leche y productos lácteos son: Aldrín 0.006 mg/Kg., Dieldrín 0.006 mg/Kg., DDT 0.02 mg/Kg., DDD 0,02 mg/Kg., DDE 0,02 mg/Kg., Heptacloro 0.006 mg/Kg, Lindano 0,01 mg/Kg. (CHILE, 1999)

A pesar de que en nuestro país existe un Plan Nacional de Control de Residuos, todavía es necesario realizar esfuerzos orientados a regular la adquisición y aplicación de plaguicidas clorados. Los usuarios de estos plaguicidas deben usar solo productos autorizados y que no se encuentren prohibidos; emplearlos de acuerdo a las normas técnicas señaladas en las etiquetas, es decir, usar el producto en las dosis y para los cultivos indicados, adoptar las medidas de seguridad indicadas; cumplir el periodo de carencia (plazo que debe transcurrir entre la última aplicación y la cosecha) y respetar el periodo de reentrada, para así evitar la presencia de residuos de estos plaguicidas en alimentos para el consumo humano y animal.

Metodologías Analíticas.

Desde el hallazgo de los efectos tóxicos y letales de los plaguicidas organoclorados para la salud humana y animal, se ha hecho necesario perfeccionar las metodologías analíticas e implementar nuevas, con el fin de determinar y cuantificar la menor cantidad posible de estas sustancias en diversas matrices, tanto animales y vegetales como ambientales (Ault *et al.*, 1985; Brock *et al.*, 1996; El-Kabbany *et al.*, 2000).

La definición de los límites máximos residuales a nivel de $\mu\text{g/ml}$ (partes por millón) e incluso ng/ml (partes por billón), hace necesario contar con metodologías analíticas muy sensibles y altamente específicas (Long *et al.*, 1991).

Debido a los bajos niveles usualmente encontrados, la cromatografía de gases con detector de captura electrónica ha sido la técnica de elección para la separación y posterior detección de plaguicidas organoclorados. Sin embargo previo al análisis cromatográfico, las muestras deben ser preparadas para el aislamiento y la concentración de los analitos (Hoffmann *et al.*, 2007). Otro factor a considerar son las columnas que se utilizan en este tipo de cromatografía, al respecto, la tendencia actual es utilizar columnas capilares o semicapilares, ya que incrementan la resolución y permiten una mejor cuantificación (Sherma, 1999).

Los métodos tradicionales de análisis incluyen un paso inicial con una fuerte extracción con solventes, entre las que se describen la partición líquido-líquido, columnas de adsorción líquido-sólido como en el caso de columnas de Florisil, con o sin cromatografía de permeación gel (Armishaw y Millar, 1993; Holstege *et al.*, 1994). Las tecnologías más modernas incluyen el uso de nuevas fuentes de energía que reducen los pasos del proceso como la extracción supercrítica de fluidos, la extracción con líquidos presurizados y la extracción subcrítica con agua (Chen *et al.*, 2007).

En la mayoría de las muestras de leche, los pesticidas extraídos son isómeros de HCH, Aldrín, Oxyclordano, Clordano, Endrín, Dieldrín, isómeros del DDT, Heptacloro y sus epóxidos y Mirex. Los solventes usados deben ser lo bastante polares como para extraer la mayoría de los plaguicidas organoclorados presentes en la leche y en los productos lácteos (Mukherjee y Gopal, 1996).

Recientemente, la técnica de extracción multiresidual denominada dispersión en matriz de fase sólida, ha eliminado muchas de las dificultades asociadas con la extracción de varios residuos presentes en tejidos animales. En este proceso, una pequeña cantidad de tejido es homogenizado y dispersado en un solo paso en un soporte

sólido y luego los plaguicidas (u otros compuestos) son eluidos de una sola vez (Lott y Barker, 1993).

La validación de un método analítico es un procedimiento en el que el laboratorio debe demostrar que la metodología utilizada es confiable y comprobable a través de una serie de parámetros medibles. El laboratorio debe validar los métodos no normalizados, los métodos diseñados y/o desarrollados por el laboratorio, los métodos normalizados pero utilizados más allá de su alcance y las ampliaciones y modificaciones de métodos normalizados; para confirmar que los métodos son adecuados para el uso previsto. Según la evaluación para el uso previsto, el rango y exactitud de los parámetros que se pueden obtener por medio de los métodos validados, deben corresponder a las necesidades del cliente. La validación es siempre un equilibrio entre costos, riesgos y posibilidades técnicas. En muchos casos, debido a la falta de información, el rango e incertidumbre de los parámetros pueden entregarse sólo en forma simplificada.

Estos parámetros han sido señalados por diversos organismos e instituciones como son el FDA, *Codex Alimentarius* y la Comisión de las Comunidades Europeas y son: (Diario oficial de las Comunidades Europeas, 2002).

a.- Especificidad:

La especificidad es la capacidad de un método para distinguir entre el analito de interés y otras sustancias que puedan estar presentes en una muestra objeto de ensayo. El método debe ser capaz de identificar inequívocamente el compuesto que se mide.

b.- Sensibilidad:

La sensibilidad de un método es su capacidad para detectar la mínima concentración de un analito y discernir pequeñas diferencias en la concentración de éste.

c.- Linealidad de las muestras fortificadas:

La linealidad se establece a través de un análisis de regresión lineal entre las diferentes concentraciones y las áreas cromatográficas obtenidas, esto permite definir si el método seleccionado es o no cuantitativo.

d.- Límite de decisión ($CC\alpha$) y Capacidad de detección ($CC\beta$) de los analitos:

El límite de decisión corresponde a la mínima cantidad identificable de un analito.

La capacidad de detección corresponde a la mínima concentración cuantificable de un analito.

e.- Recuperación:

La recuperación es una medida para definir la capacidad de un método de recuperar el analito desde una matriz de trabajo.

f.- Precisión:

La precisión de un método es el grado de coincidencia entre los resultados obtenidos en ensayos interdependientes, a partir de un material de ensayo homogéneo, en las condiciones de empleo estipuladas.

g.- Repetitividad:

La repetitividad es la precisión de los resultados obtenidos por un mismo operador, utilizando el mismo método analítico e idénticas muestras de análisis.

h.- Robustez.

La robustez es la susceptibilidad del método a los cambios en las condiciones experimentales, que pueden expresarse en forma de lista de los materiales de la muestra, los analitos, las condiciones de almacenamiento, las condiciones ambientales o de preparación de las muestras.

La presencia de residuos de plaguicidas organoclorados en leches Bovinas en Chile ha sido descrita por varios autores. Así en el año 2005, Barrientos detectó residuos de plaguicidas organoclorados en leche cruda de plantas lecheras de la IX y X Regiones, determinando la presencia de residuos de (α y β) HCH, Lindano, Heptacloro, Aldrin y Dieldrin en el 100 % de las muestras analizadas, sin embargo ninguna de ellas superó los límites máximos residuales permitidos en Chile para estos plaguicidas. El mismo año y en las mismas Regiones, Moraleda estudió también la presencia de residuos de estos plaguicidas en leche pasteurizada UHT, detectando también residuos de todos los plaguicidas analizados pero bajo los límites máximos residuales.

Dado que en Chile no existen estudios acerca de la contaminación en la leche de cabra por residuos de plaguicidas organoclorados, el presente trabajo es una contribución para conocer si existe dicha contaminación y cuáles serían los niveles encontrados.

OBJETIVOS.

OBJETIVO GENERAL:

Estudiar la presencia de residuos de plaguicidas organoclorados en leche de rebaños de cabras de la Comuna de Catemu.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

1.- Implementar y validar una técnica cromatográfica para la detección de los plaguicidas: Heptacloro, Aldrin, Clordano iso a, Clordano iso b, DDE, DDD y Mirex en leche de cabra.

2.- Conocer la frecuencia de leche de cabra contaminada para cada plaguicida organoclorado y para los diferentes niveles de contaminación.

MATERIAL Y MÉTODOS

A. Materiales:

1. Animales:

Los animales que se utilizaron fueron cabras mestizas, Anglo Nubian-Criolla, Toggenburg-Criolla y Saanen-Criolla, pertenecientes a pequeños productores ubicados en la comuna de Catemu, provincia de San Felipe, Quinta Región.

Estos rebaños se encuentran bajo sistema de manejo alimentario similar, basado en el pastoreo directo, sobre empastadas de riego a base de alfalfa y mixtas compuestas de lotera, trébol blanco, ballica y pasto ovillo. Además se alimentan de rastrojos que quedan del cultivo de hortalizas tales como zanahorias, tomates, alcachofas, ajo y cebolla. Otra fuente de alimentación común para estas cabras son las malezas que crecen en los potreros, una vez que han finalizado los ciclos de cultivo para estas hortalizas. El agua de bebida para los animales es obtenida directamente desde los canales de riego, que son efluentes del río Aconcagua.

2. Equipos de laboratorio:

a) Equipos cromatográficos:

- Cromatógrafo de gases marca Hewlett Packard modelo 5890 serie II, equipado con una columna capilar DB-5 de 30 m x 0,25 mm x 0,25 µg y acoplado a un Detector de Captura de Electrones. El gas transportador corresponde a nitrógeno gaseoso con un grado de pureza de 99,999%.
- Integrador Hewlett Packard modelo HP 3395 acoplado a la salida paralela del cromatógrafo.

b) Otros equipos:

- Para la preparación de las muestras se utilizó: Tubos de polipropileno de 50 ml, jeringas de 20 ml (TERUMO), tubos de ensayo de 10 ml, balanza marca Santorius, pipetas volumétricas de $3\text{ml} \pm 0.1$, micropipetas Genes Beta de 10 - 100 μl , campana de extracción marca Cimarec, sonicador marca Branson modelo 3510.

3. Reactivos y soluciones:

- Florisil® activado marca JT Baker.
- Octadecilsilica (Waters o similar).
- Papel filtro Wathman N° 1.
- Acetonitrilo PR (J.T. Baker).
- Acetona HPLC (J.T.Baker).
- Hexano PR (J.T. Baker).
- Metanol HPLC (J.T.Baker o similar).

4. Estándares de plaguicidas: Los estándares que se utilizaron para la calibración del cromatógrafo y para la preparación de las muestras fortificadas fueron:

- Aldrin: Riedel de Haën®.
- DDD: Riedel de Haën®.
- DDE: Riedel de Haën®.
- Mirex: Riedel de Haën®.
- Clordano: Riedel de Haën®.
- Heptacloro: Riedel de Haën®.

A partir de soluciones concentradas de 1000 $\mu\text{g/ml}$ de cada organoclorado, se realizaron diluciones para obtener concentraciones de 3, 6, 9, 12 y 15 ng/ml de plaguicidas puros.

5. Material fungible: Corresponde a todo material de uso habitual en el Laboratorio de Farmacología de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile.

B. Método:

1. Muestras:

Se utilizaron muestras de leche de cabra fresca recolectada en los meses de Noviembre-Diciembre del año 2006. El tamaño muestral fue de 90 muestras de leche con una desviación estándar de 0.015, un error de 0.0031 y una confianza de 95%, las cuales se extrajeron de nueve rebaños formados por 110 cabras cada uno escogidas aleatoriamente al momento de la ordeña. Las muestras se recolectaron en tubos de polipropileno con tapa rosca y con capacidad de 50 ml, luego se refrigeraron y trasladaron al Laboratorio de Farmacología de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile, donde fueron analizadas.

2. Metodología Analítica:

Tanto para el análisis de las muestras utilizadas para la validación del método como para el análisis de las muestras utilizadas para la detección de los plaguicidas se utilizó como referencia la metodología analítica descrita por Lott y Barker en 1993 para

ostras. Se utilizaron 3 ml de leche por análisis. No se describe previo desgrasado de la muestra (Lott y Barker, 1993).

La muestra se fortificó de ser necesario y se mezcló con 4 gramos de octadecilsilica, logrando así la dispersión de la matriz en una fase sólida. El polvo homogeneizado resultante se colocó sobre una columna de adsorción con 2 gramos de Florisil®, formándose así una doble columna, es decir de dos compuestos de soporte diferentes. La extracción de los plaguicidas se realizó con 15 ml de hexano grado pesticida. Posteriormente se recolectó el eluido en un tubo de ensayo de vidrio y éste fue secado en campanas de nitrógeno a una temperatura máxima de 50 °C. Luego las muestras fueron sonicadas y 2 µl del extracto fueron inyectados en el Cromatógrafo de Gases con Detector de Captura Electrónica.

3. Implementación y validación del método analítico:

La validación del método analítico se realizó según la directiva 2002/657/CE, y se aplicó bajo los siguientes parámetros:

Tiempo de retención del analito: Se analizó en conjunto la magnitud de la respuesta de cada uno de los analitos puros, con el objeto de definir su tiempo de retención.

Especificidad: La especificidad es la capacidad del método analítico para identificar inequívocamente el analito de interés. La especificidad se corroboró al analizar 20 muestras blancos (matrices libres de plaguicidas). En ellas se buscó si existía interferencia con los tiempos de retención de los analitos en estudio.

Sensibilidad: La sensibilidad se determinó fortificando las matrices blanco a diferentes concentraciones a fin de detectar la mínima concentración posible, dada las condiciones existentes.

Recuperación: La recuperación es el porcentaje de la concentración real del analito que puede ser recuperada durante el procedimiento analítico. La recuperación se calculó relacionando la concentración obtenida de las muestras fortificadas (obtenidas con las curvas de regresión) y la concentración real de fortificación para cada analito (valor teórico). Para ello, se eligieron 18 muestras blanco y se enriquecieron con el analito siguiendo los siguientes pasos:

- a) Se eligió la concentración de trabajo (CT). La CT corresponde al límite máximo residual mas bajo permitido para los plaguicidas organoclorados.
- b) Se enriquecieron 6 muestras con 0.5 veces la CT, 6 muestras con 1.0 vez la CT y 6 muestras con 1.5 veces la CT.

La recuperación se calculó según la siguiente fórmula:

Cálculo de recuperación:

$$\text{Porcentaje de recuperación para cada valor medido: } 100 * \frac{\text{Contenido medido}}{\text{Nivel de enriquecimiento}}$$

Los valores de recuperación obtenidos fueron aceptados cuando estos se encontraron entre los intervalos señalados en la directiva 2002/657/CE.

Repetitividad: La repetitividad es la precisión en condiciones que un mismo operador obtiene resultados de ensayos independientes utilizando el mismo procedimiento analítico, las mismas muestras, el mismo equipo, en un mismo laboratorio. La repetitividad se calculó analizando 18 muestras blanco las cuales se enriquecieron con el

analito siguiendo los mismos pasos que para la recuperación. La repetitividad cumplió con su condición aceptada cuando el coeficiente de variación porcentual (CV %) se encontró en el rango de valores correspondientes a la mitad o igual al CV % de la precisión.

Precisión (Reproducibilidad intralaboratorio): La precisión es el grado de concordancia en los resultados de análisis de ensayos interdependientes. La precisión se calculó realizando 6 curvas enriquecidas a los mismos niveles que en el caso de la Recuperación y Repetitividad, pero realizadas en diferentes días. La precisión fue aceptada cuando se obtuvieron los valores de CV % los más bajos posibles.

Curva de calibración: La curva de calibración es un mecanismo de medición que permite predecir la concentración del analito de interés. Se aceptó la curva cuando el coeficiente de correlación (r^2) fue mayor a 0,9. La curva de calibración se elaboró empleando 5 niveles de fortificación, se describió el intervalo de trabajo de la curva, la ecuación de la recta, la bondad de ajuste de los datos de ésta y se describieron los márgenes de aceptabilidad de los parámetros de la curva.

Límite de decisión $CC\alpha$ (límite de detección): El límite de decisión es la mínima cantidad identificable del analito. Se realizó con 6 curvas de calibración, las cuales se elaboraron empleando 5 puntos de fortificación o enriquecimiento (INN, 1997). El límite de decisión en el caso de los compuestos, para los que se ha establecido un límite permitido, se calcula según la siguiente fórmula:

Calculo de $CC\alpha$:

- Cada curva fue analizada por separado calculando la ecuación de regresión (se aceptó la curva cuando $r^2 > 0,9$). Se calculó la pendiente para cada curva y se sacó el promedio de las pendientes (de todas las curvas).

- Para cada curva se extrapolo el intercepto en el eje y (en área), y luego se calcularon los promedios y desviaciones estándar de los interceptos (en áreas).

- Se calculó el cca (en área) aplicando la siguiente fórmula:

$CC\alpha$ área = Promedio de los interceptos + 1.64 veces la desviación estándar de los interceptos.

- El resultado de $CC\alpha$ obtenido en área fue transformado a concentración por medio de la siguiente fórmula:

$$CC\alpha \text{ concentración} = \frac{CC\alpha \text{ área} - (\text{promedio de los interceptos})}{\text{Promedio de las pendientes}}$$

El valor obtenido para el $CC\alpha$ es el límite en el cual y a partir del cual se pudo concluir con una probabilidad de error α (1%) que una muestra no es conforme.

Capacidad de detección $CC\beta$ (Limite de cuantificación): El límite de detección es la mínima cantidad cuantificable del analito. Se trabajó con 20 muestras blancos, enriquecidas con una concentración equivalente a $CC\alpha$, y se realizó además una curva de calibración (que se aceptó cuando $r^2 > 0,9$). El límite de cuantificación de los compuestos, para los cuales se ha establecido un límite permitido, se calcula con la siguiente fórmula:

Calculo $CC\beta$:

- Se calcularon los promedios y la desviación estándar de las áreas obtenidas en las muestras.

- Posteriormente se calculó el $CC\beta$ (en área) aplicando la siguiente formula:

$CC\beta$ área = Limite de detección $CC\alpha$ + 1.64 veces la desviación estándar de las áreas obtenidas.

- El resultado obtenido para la capacidad de detección $CC\beta$ en área, fue transformado a concentración por medio de la siguiente fórmula:

$$CC\beta \text{ concentración: } CC\beta \text{ área} - \frac{(\text{intercepto curva de calibración})}{\text{Pendiente curva de calibración}}$$

El valor obtenido para el $CC\beta$ es el contenido mínimo de la sustancia que pudo ser detectado, identificado o cuantificado con una posibilidad de error β (5%).

Robustez: La robustez es la susceptibilidad del método analítico a los cambios en las condiciones experimentales del laboratorio. Se seleccionaron 3 factores que influían en el resultado final y mediante el método de Youden se detectaron las interacciones entre los factores seleccionados. El experimento fue realizado a nivel del límite mas bajo de la curva de calibración. Junto con el experimento se realizó una curva de calibración para cuantificar los experimentos. Para el cálculo de la robustez se compararon los promedios de los valores cuantificados, se calculó la diferencia entre estos promedios, se elevaron al cuadrado y posteriormente se calculó la desviación estándar de los valores obtenidos. Mediante la comparación de los promedios de los valores obtenidos, se identificó el factor que más afectó la robustez del método. Cuando la desviación estándar de la robustez fue significativamente menor que la desviación estándar de la

precisión, en el punto más bajo de la curva, se pudo interpretar como que el método fue lo suficientemente robusto.

4. Muestras de leche de rebaños de cabras de la Comuna de Catemu.

Las muestras de leche de cabra fueron analizadas para la detección de plaguicidas organoclorados y, en caso de encontrarse muestras positivas, fueron cuantificadas.

Se confeccionaron las siguientes distribuciones de frecuencias relativas:

- Número muestras positivas/total de muestras.
- Número de muestras positivas por cada organoclorado/total de muestras positivas.

RESULTADOS

1.- Validación:

El análisis de las matrices de trabajo (leche), libres de plaguicidas organoclorados señaló que no existen picos de interferencias en los tiempos de retención de los analitos. En las figuras 1, 2 y 3 se muestran los cromatogramas correspondientes. Ellos muestran que los siete pesticidas analizados fueron satisfactoriamente recuperados desde las muestras de leche.

Figura1: Cromatograma droga pura

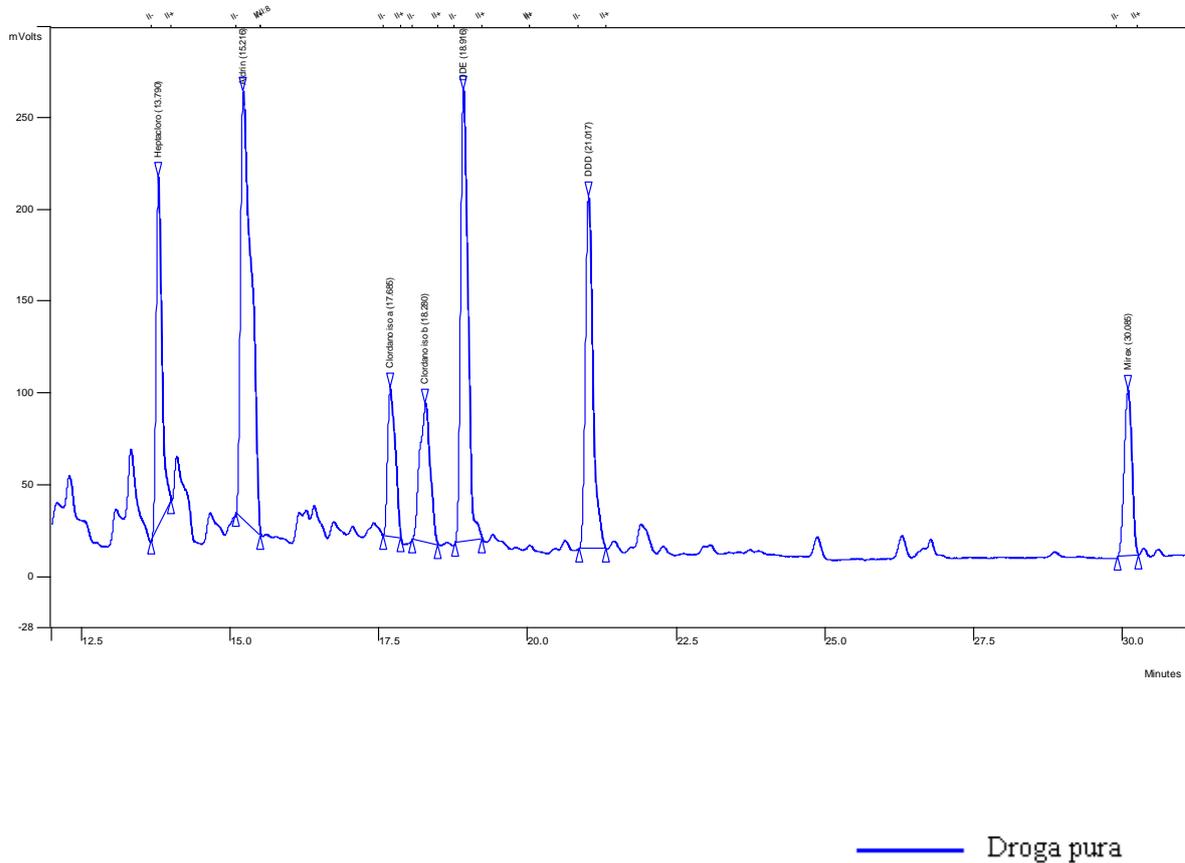


Figura2: Cromatograma muestra blanco.

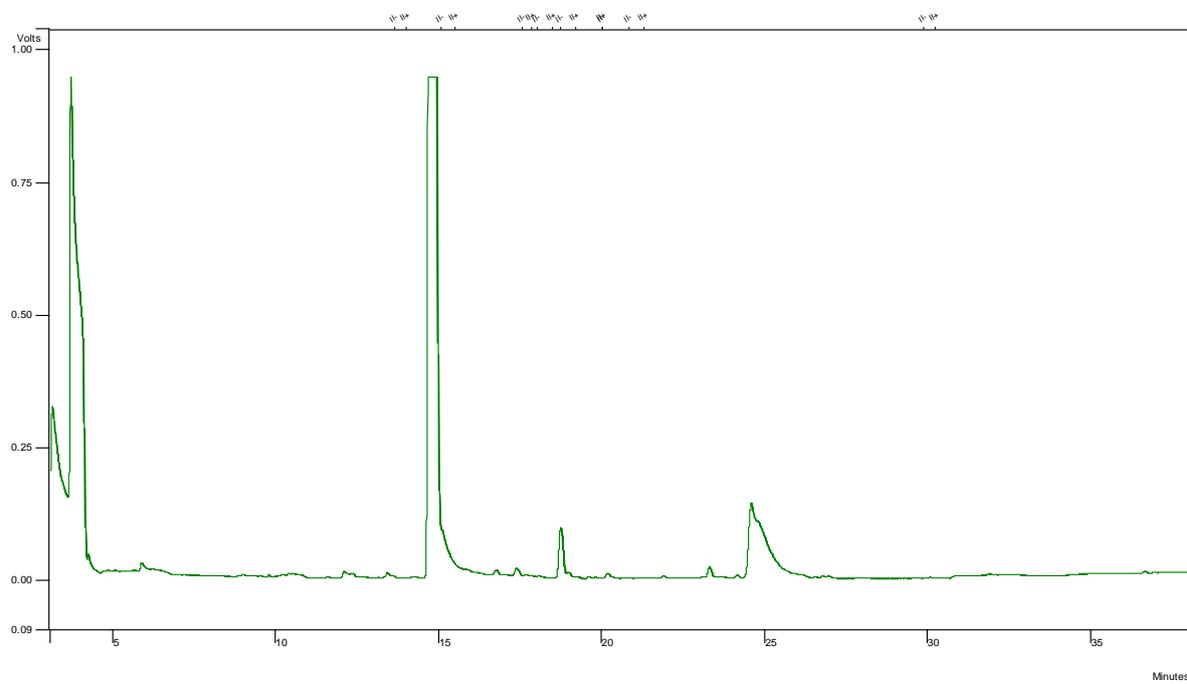
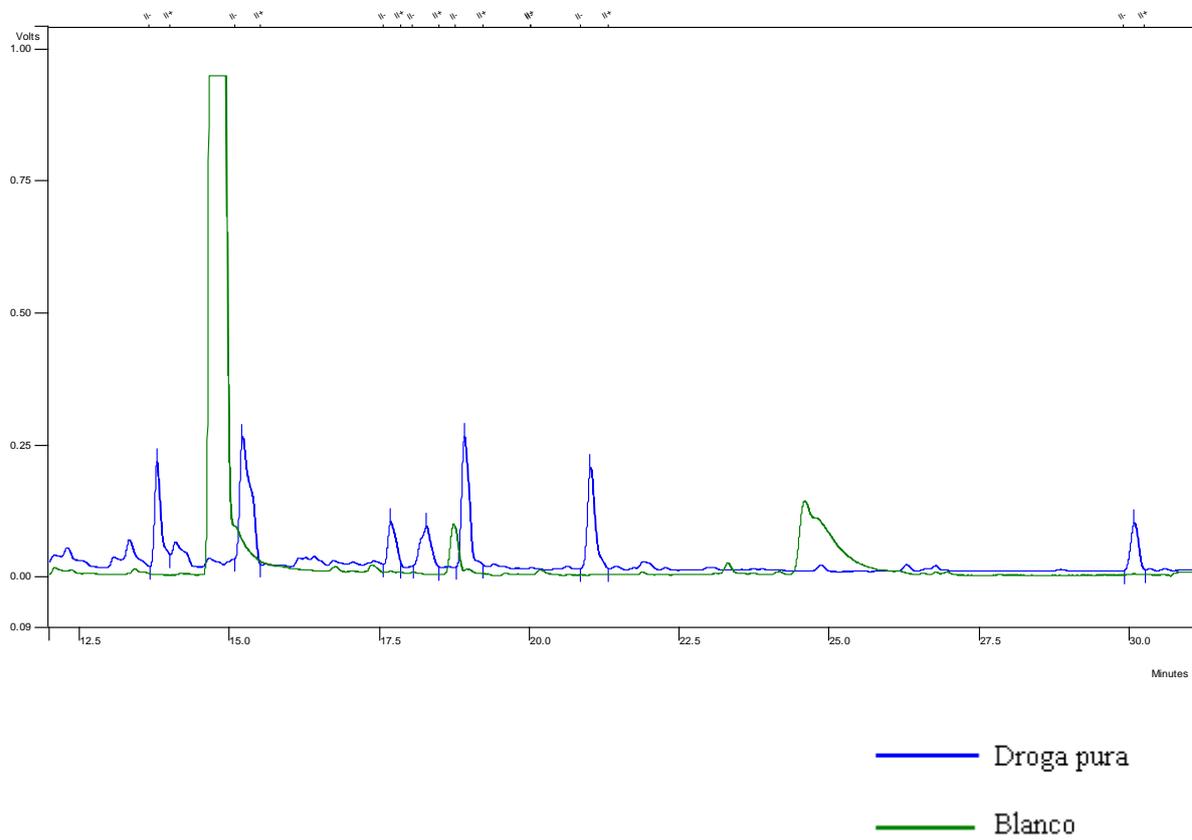


Figura3: Cromatograma droga pura mas muestra blanco.



Los tiempos de retención de los plaguicidas organoclorados analizados en conjunto se muestran en el cuadro 1 donde se muestra el promedio de los tiempos de retención, desviación estándar y coeficiente de variación para cada uno de ellos.

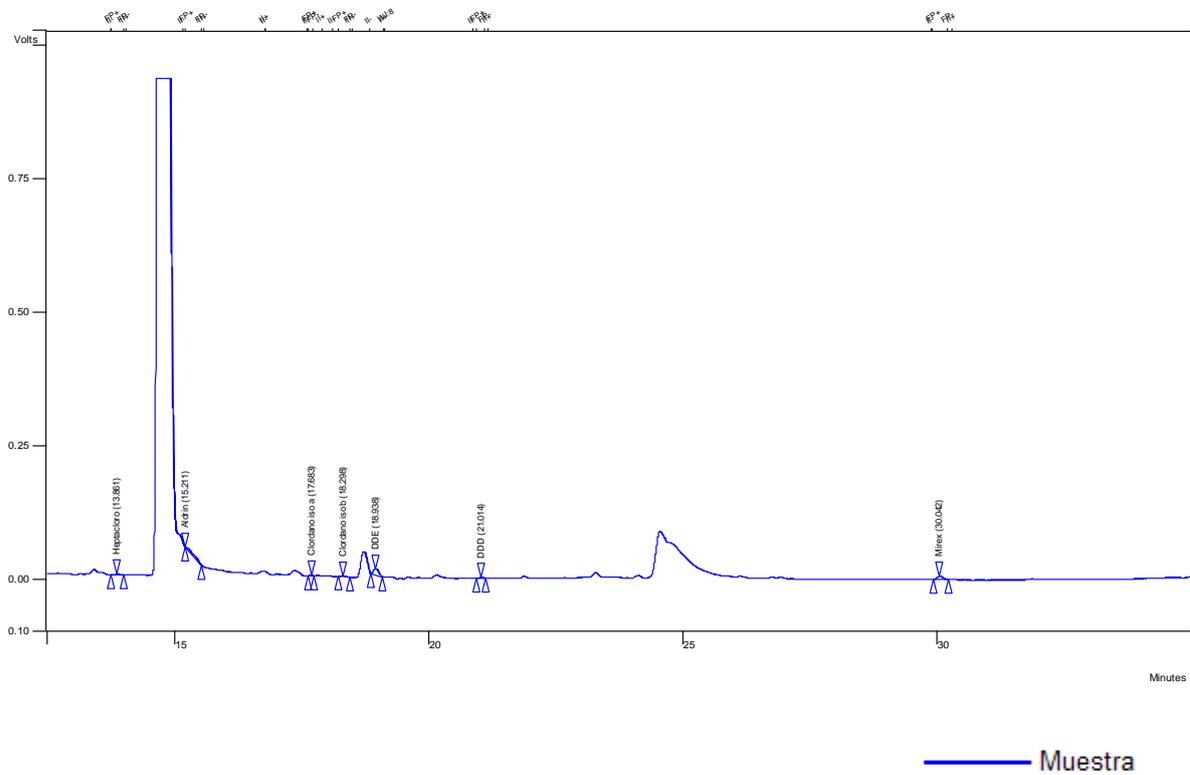
Cuadro 1: Tiempos de retención de plaguicidas organoclorados analizados en diferentes concentraciones, y su descripción estadística

Organoclorados	Concentración ng/ml	Promedio min	Desviación estándar	Coefficiente de Variación
Heptacloro	3	13.859	28,91136	0,00209
Aldrin	3	15.234	38,67816	0,00254
Clordano iso a	3	17.699	63,03861	0,00356
Clordano iso b	3	18.285	39,29207	0,00215
DDE	3	18.928	38,83298	0,00205
DDD	3	21.003	61,35145	0,00292
Mirex	3	30.041	65,63155	0,00218
Heptacloro	6	13.853	43,28356	0,00312
Aldrin	6	15.258	42,84585	0,00281
Clordano iso a	6	17.686	49,36294	0,00279
Clordano iso b	6	18.289	50,86616	0,00278
DDE	6	18.920	51,40298	0,00272
DDD	6	20.990	66,94973	0,00319
Mirex	6	30.043	67,83731	0,00226
Heptacloro	9	13.843	45,59569	0,00329
Aldrin	9	15.247	42,24532	0,00277
Clordano iso a	9	17.693	65,68612	0,00371
Clordano iso b	9	18.284	47,52578	0,00260
DDE	9	18.912	49,15452	0,00260
DDD	9	20.981	62,08274	0,00296
Mirex	9	30.035	62,42249	0,00208
Heptacloro	12	13.846	31,85593	0,00230
Aldrin	12	15.252	34,97237	0,00229
Clordano iso a	12	17.680	47,12289	0,00267
Clordano iso b	12	18.279	45,53241	0,00249
DDE	12	18.910	47,33991	0,00250
DDD	12	20.976	63,20364	0,00301
Mirex	12	30.030	62,07334	0,00207
Heptacloro	15	13.847	33,96272	0,00245
Aldrin	15	15.254	36,49109	0,00239
Clordano iso a	15	17.679	43,72032	0,00247
Clordano iso b	15	18.277	44,67848	0,00244
DDE	15	18.907	49,67763	0,00263
DDD	15	20.970	63,41819	0,00302
Mirex	15	30.024	58,18161	0,00194

Los tiempos de retención para el Heptacloro se encontraron en el rango de 13.843 a 13.859 minutos; 15.234 a 15.258 minutos para el Aldrin; 17.679 a 17.699 minutos para el Clordano iso a; 18.277 a 18.289 minutos para el Clordano iso b; 18.907 a 18.928 minutos para el DDE; 20.970 a 21.003 minutos para el DDD y 30.024 a 30.043 minutos para el Mirex.

Con respecto a la sensibilidad alcanzada por el método desarrollado, esta fue de 3 ng/ml para cada uno de los plaguicidas analizados. En la figura 4 se muestra un cromatograma de una muestra fortificada con 3 ppb de cada uno de los plaguicidas analizados.

Figura 4: Cromatograma muestra fortificada con 3 ppb.



El siguiente paso para la validación de la metodología fue determinar el nivel de recuperación de cada organoclorado contenido en la muestra. Los valores promedio de recuperación obtenidos para cada plaguicida se muestran en los cuadros 2, 3, 4, 5 y 6 para seis muestras diferentes.

Cuadro 2: Recuperación (%) de organoclorados en muestras fortificadas con 3 ppb.

(n=6)

Organoclorado	Concentración(ng/ml) cuantificada	Concentración(ng/ml) de enriquecimiento	Recuperación según CE (%)
Heptacloro	2,983	3	99,44
Aldrin	2,867	3	95,56
Clordano iso a	3,533	3	117,78
Clordano iso b	2,450	3	81,67
DDE	3,700	3	123,33
DDD	2,850	3	95,00
Mirex	3,483	3	116,11

Cuadro 3: Recuperación (%) de organoclorados en muestras fortificadas con 6 ppb.

(n=6)

Organoclorado	Concentración(ng/ml) cuantificada	Concentración(ng/ml) de enriquecimiento	Recuperación según CE(%)
Heptacloro	5,450	6	90,83
Aldrin	5,917	6	98,61
Cordano iso a	4,950	6	82,50
Clrdano iso b	6,050	6	100,83
DDE	6,100	6	101,67
DDD	6,650	6	110,83
Mirex	5,650	6	94,17

Cuadro 4: Recuperación (%) de organoclorados en muestras fortificadas con 9 ppb.

(n=6)

Organoclorado	Concentración(ng/ml) cuantificada	Concentración(ng/ml) de enriquecimiento	Recuperación según CE(%)
Heptacloro	9,750	9	108,33
Aldrin	9,200	9	102,22
Cordano iso a	9,617	9	106,85
Clrdano iso b	9,983	9	110,93
DDE	7,500	9	83,33
DDD	8,433	9	93,70
Mirex	8,950	9	99,44

Cuadro 5: Recuperación (%) de organoclorados en muestras fortificadas con 12 ppb.
(n=6)

Organoclorado	Concentración(ng/ml) cuantificada	Concentración(ng/ml) de enriquecimiento	Recuperación según CE(%)
Heptacloro	12,117	12	100,97
Aldrin	12,350	12	102,92
Cordano iso a	11,700	12	97,50
Clrdano iso b	12,067	12	100,56
DDE	11,800	12	98,33
DDD	11,800	12	98,33
Mirex	11,317	12	94,31

Cuadro 6: Recuperación (%) de organoclorados en muestras fortificadas con 15 ppb.
(n=6)

Organoclorado	Concentración(ng/ml) cuantificada	Concentración(ng/ml) de enriquecimiento	Recuperación según CE(%)
Heptacloro	14,650	15	97,67
Aldrin	14,667	15	97,78
Cordano iso a	15,417	15	102,78
Clrdano iso b	14,450	15	96,33
DDE	15,850	15	105,67
DDD	15,283	15	101,89
Mirex	15,633	15	104,22

El porcentaje de recuperación estimado para el Heptacloro estuvo en el rango de 90,83 a 108,33 %; 95,56 a 102,92 % para el Aldrin; 82,5 a 117,78 % para el Clordano iso a; 81,67 a 110,93 % para el Clordano iso b; 83,33 a 123,33 % para el DDE; 93,7 a 110,83 % para el DDD y 94,17 a 116,11 % para el Mirex.

Los estudios de repetitividad y precisión, expresados como el Coeficiente de Variación porcentual (CV%), se calcularon con el resultado de seis muestras diferentes enriquecidas con tres concentraciones de trabajo. Los resultados del promedio de las concentraciones obtenidas, la desviación estándar y coeficiente de variación para la repetitividad se muestran en los cuadros 7, 8 y 9 y para la precisión en los cuadros 10, 11 y 12.

Cuadro 7: Repetitividad de organoclorados en muestras fortificadas con 3ppb.

Organoclorado	Concentración ng/ml	Promedio(n=6)	Desviación Estándar	CV %
Heptacloro	3	3,17	0,15	0,0500
Aldrin	3	3,20	0,09	0,0300
Clordano iso a	3	3,52	0,16	0,0500
Clordano iso b	3	3,12	0,04	0,0100
DDE	3	3,00	0,20	0,0700
DDD	3	2,60	0,11	0,0400
Mirex	3	3,00	0,09	0,0300

Cuadro 8: Repetitividad de organoclorados en muestras fortificadas con 6ppb.

Organoclorado	Concentración ng/ml	Promedio(n=6)	Desviación Estándar	CV %
Heptacloro	6	5,65	0,26	0,0500
Aldrin	6	5,62	0,15	0,0300
Clordano iso a	6	4,98	0,26	0,0500
Clordano iso b	6	5,67	0,10	0,0200
DDE	6	6,00	0,40	0,0700
DDD	6	6,80	0,21	0,0300
Mirex	6	6,00	0,18	0,0300

Cuadro 9: Repetitividad de organoclorados en muestras fortificadas con 9ppb.

Organoclorado	Concentración ng/ml	Promedio(n=6)	Desviación Estándar	CV %
Heptacloro	9	9,17	0,15	0,0200
Aldrin	9	9,20	0,09	0,0100
Clordano iso a	9	9,52	0,16	0,0200
Clordano iso b	9	9,12	0,04	0,0044
DDE	9	9,00	0,20	0,0200
DDD	9	8,60	0,11	0,0100
Mirex	9	9,00	0,09	0,0100

Cuadro 10: Precisión de organoclorados en muestras fortificadas con 3ppb.

Organoclorado	Concentración ng/ml	Promedio(n=6)	Desviación Estándar	CV %
Heptacloro	3	2,98	0,50	0,1700
Aldrin	3	2,87	0,25	0,0900
Clordano iso a	3	3,77	0,24	0,0600
Clordano iso b	3	2,45	0,08	0,0300
DDE	3	3,70	0,37	0,1000
DDD	3	2,85	0,26	0,0900
Mirex	3	3,48	0,17	0,0500

Cuadro 11: Precisión de organoclorados en muestras fortificadas con 6ppb.

Organoclorado	Concentración ng/ml	Promedio(n=6)	Desviación Estándar	CV %
Heptacloro	6	5,45	0,36	0,0700
Aldrin	6	5,92	0,50	0,0800
Clordano iso a	6	4,98	0,37	0,0700
Clordano iso b	6	6,05	0,18	0,0300
DDE	6	6,10	0,53	0,0900
DDD	6	6,65	0,37	0,0600
Mirex	6	5,65	0,26	0,0500

Cuadro 12: Precisión de organoclorados en muestras fortificadas con 9ppb.

Organoclorado	Concentración ng/ml	Promedio(n=6)	Desviación Estándar	CV %
Heptacloro	9	9,75	0,79	0,0800
Aldrin	9	9,20	0,28	0,0300
Clordano iso a	9	9,12	0,74	0,0800
Clordano iso b	9	9,98	0,29	0,0300
DDE	9	7,50	0,37	0,0500
DDD	9	8,43	0,52	0,0600
Mirex	9	8,95	0,34	0,0400

Los coeficiente de variación obtenidos estuvieron entre 0,01 a 0,07 % para la repetitividad y 0,03 a 0,17 % para la precisión, cuando se fortificó las muestras con 3ppb; la repetitividad, cuando se fortificaron las muestras con 6 ppb, mostró un coeficiente de variación entre 0,02 a 0,07 % y la precisión entre 0,03 a 0,09 % y por último las muestras fortificadas con 9 ppb, mostraron una repetitividad con un coeficiente de variación entre 0,0044 y 0,02 % y una precisión con un rango entre 0,03 y 0,08 %.

Para el análisis de las matrices fortificadas con organoclorados, se consideró describir estadísticamente las áreas cromatográficas y verificar su linealidad. En el cuadro 13 se señala el promedio de las áreas cromatográficas, desviación estándar y coeficiente de variación para cada organoclorado en leche de cabra. Los resultados obtenidos en los ensayos relacionados con las curvas de calibración, usadas en la determinación de los plaguicidas se presentan en el cuadro 14. La comprobación de la

linealidad para cada uno de los analitos, la descripción de los componentes de la ecuación resultante del análisis de regresión lineal de cada organoclorado así como el coeficiente de correlación de cada curva también se señalan en esta tabla.

Cuadro 13: Areas cromatográficas de organoclorados en leche de cabra fortificada con diferentes concentraciones y su descripción estadística.

Organoclorados	Concentración ng/ml	Promedio areas (n=6)	Desviación Estándar	CV %
Heptacloro	3	30076	6466,7	0,2150
Aldrin	3	27946	4750,7	0,1700
Clordano iso a	3	4708	614,5	0,1305
Clordano iso b	3	16214	1316,8	0,0812
DDE	3	89046	4796,0	0,0539
DDD	3	13444	1514,4	0,1126
Mirex	3	37211	2303,6	0,0619
Heptacloro	6	79131	9696,5	0,1225
Aldrin	6	108679	17011,9	0,1565
Clordano iso a	6	9118	975,4	0,1070
Clordano iso b	6	42959	1589,4	0,0370
DDE	6	286634	52101,0	0,1818
DDD	6	35033	2786,3	0,0795
Mirex	6	236703	29626,6	0,1252
Heptacloro	9	164956	19300,9	0,1170
Aldrin	9	196598	6019,6	0,0306
Clordano iso a	9	24138	3086,3	0,1279
Clordano iso b	9	71997	2555,3	0,0355
DDE	9	409061	28331,1	0,0693
DDD	9	45316	3759,8	0,0830
Mirex	9	538862	34337,3	0,0637
Heptacloro	12	212040	12533,6	0,0591
Aldrin	12	280365	15749,2	0,0562
Clordano iso a	12	33419	1978,4	0,0592
Clordano iso b	12	87897	7956,1	0,0905
DDE	12	769025	21715,1	0,0282
DDD	12	64716	2804,5	0,0433
Mirex	12	755664	29866,9	0,0395
Heptacloro	15	264651	34189,3	0,1292
Aldrin	15	341678	9888,1	0,0289
Clordano iso a	15	47042	2941,3	0,0625
Clordano iso b	15	105292	2696,6	0,0256
DDE	15	1118637	106541,2	0,0952
DDD	15	84861	1942,0	0,0229
Mirex	15	1158789	127508,1	0,1100

Cuadro 14: Análisis de regresión lineal para organoclorados en leche de cabra basado en los promedios de áreas cromatográficas correspondientes a cinco concentraciones de los analitos.

Concentración	Heptacloro	Aldrin	Clordano iso a	Clordano iso b
3 ng/ml	30076,17	27945,50	4707,50	16214,00
6 ng/ml	79131,33	108679,33	9117,67	42959,17
9 ng/ml	164955,67	196598,33	24138,33	79524,50
12 ng/ml	212040,17	280365,17	33419,17	87897,00
15 ng/ml	264650,67	341677,50	47042,00	105292,00
R ²	0,9735	0,9896	0,9661	0,9750
Pendiente	20068,6167	26638,3333	3632,3667	7436,4667
Intercepto eje y	-30446,5500	-48691,7833	-9006,2167	-2056,2833

Concentración	DDE	DD	Mirex
3 ng/ml	89045,67	13443,83	37210,50
6 ng/ml	286633,83	35033,33	236703,00
9 ng/ml	409061,00	45316,17	538861,67
12 ng/ml	769024,83	64716,17	755664,33
15 ng/ml	1118637,00	84861,17	1158789,00
R ²	0,9531	0,9832	0,9776
Pendiente	84719,1167	5750,5833	92070,6167
intercepto eje y	-227992,9667	-3081,1167	-283189,8000

Los coeficientes de correlación (r^2), de todas las curvas de calibración estuvieron entre 0,9531 y 0,9896.

Un ejemplo gráfico de la linealidad se señala en los gráficos 1, 2, 3, 4, 5, 6 y 7 donde se muestra la línea de máximo ajuste, por el método de los mínimos cuadrados para cada uno de los plaguicidas organoclorados analizados.

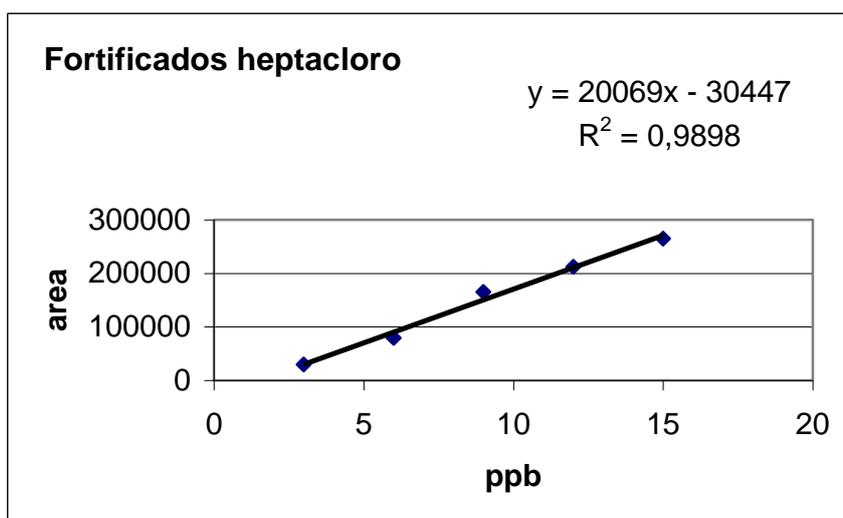


Gráfico 1: Análisis de regresión lineal de Heptacloro basado en los promedios de áreas cromatográficas correspondientes a cinco concentraciones del analito.

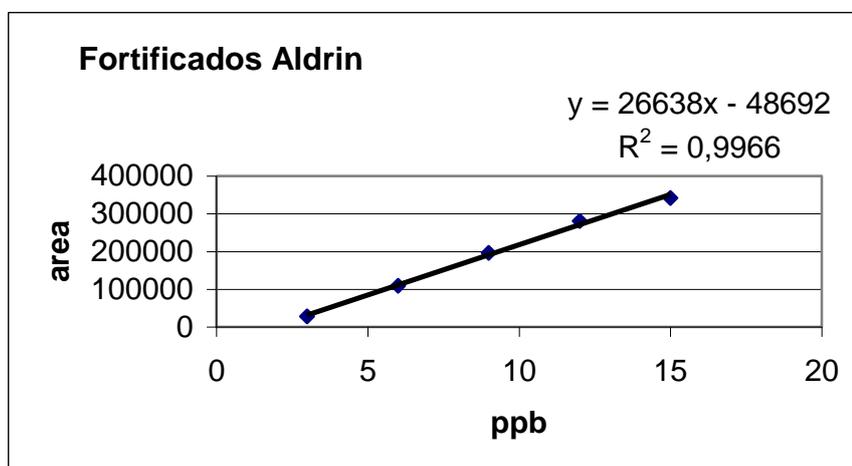


Gráfico 2: Análisis de regresión lineal de Aldrin basado en los promedios de áreas cromatográficas correspondientes a cinco concentraciones del analito.

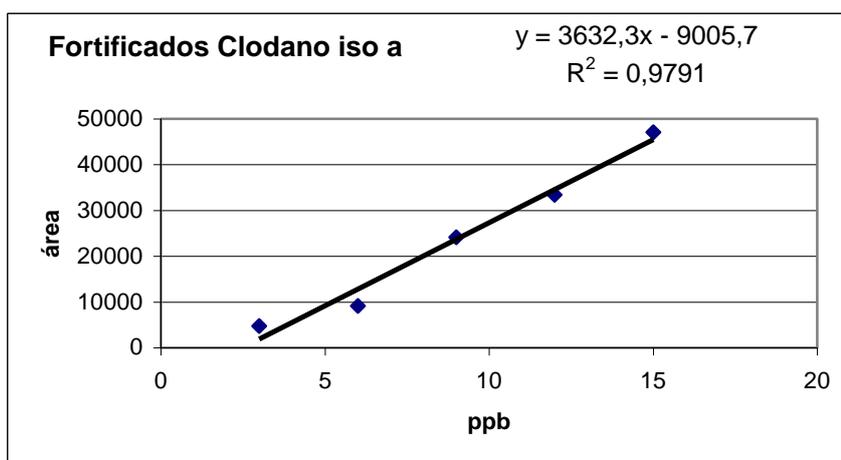


Gráfico 3: Análisis de regresión lineal de Clordano iso a basado en los promedios de áreas cromatográficas correspondientes a cinco concentraciones del analito.

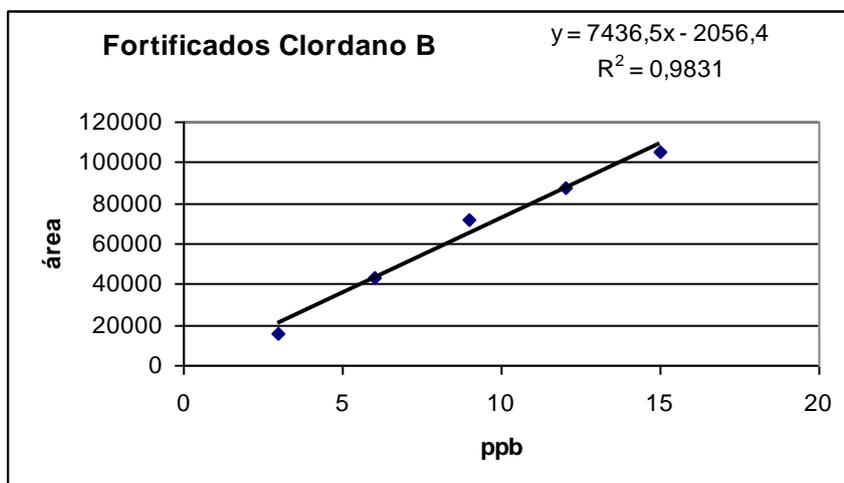


Gráfico 4: Análisis de regresión lineal de Clordano iso b basado en los promedios de áreas cromatográficas correspondientes a cinco concentraciones del analito.

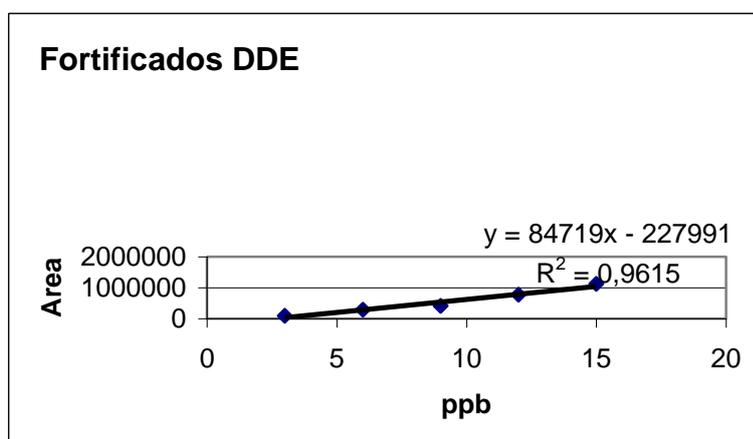


Gráfico 5: Análisis de regresión lineal de DDE basado en los promedios de áreas cromatográficas correspondientes a cinco concentraciones del analito.

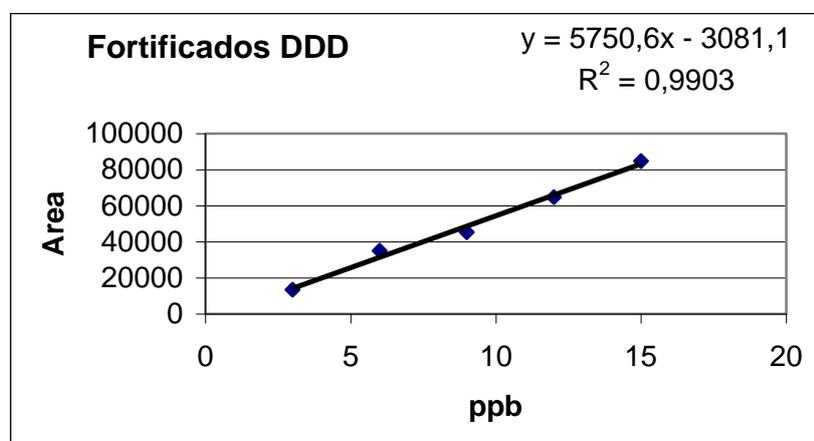


Gráfico 6: Análisis de regresión lineal de DDD basado en los promedios de áreas cromatográficas correspondientes a cinco concentraciones del analito.

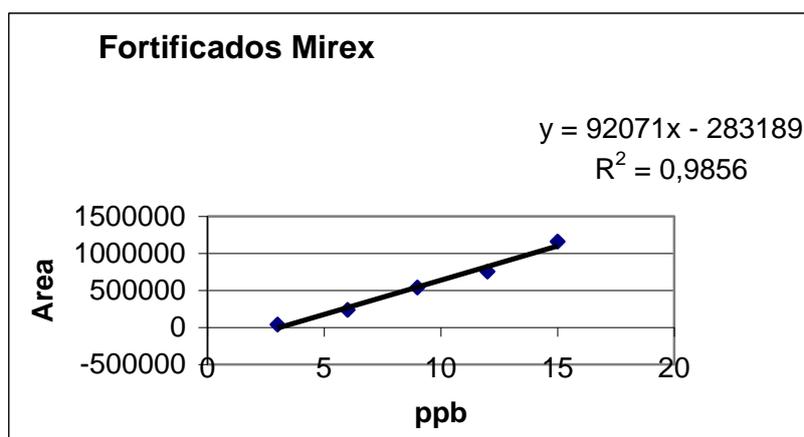


Gráfico 7: Análisis de regresión lineal de Mirex basado en los promedios de áreas cromatográficas correspondientes a cinco concentraciones del analito.

Para el cálculo del límite de decisión ($CC\alpha$) se realizaron 6 curvas de calibración. Cada curva fue analizada por separado calculando el promedio de los interceptos, de las pendientes, la desviación estándar de los interceptos, de las pendientes y posteriormente aplicando la fórmula para el determinar el valor de $CC\alpha$ de cada plaguicida organoclorado.

Los resultados del límite de decisión para cada uno de los plaguicidas organoclorados analizados se muestran en el cuadro 15.

Cuadro 15: Límite de Decisión de plaguicidas organoclorados en leche de cabra.

Organoclorados	Promedio Interseptos (áreas)	Promedio Pendientes (áreas)	Desviación estándar Interseptos	Desviación estándar Pendientes	$CC\alpha$
Heptacloro	-30446,55	20068,57	14816,75	2636,94	1,21
Aldrin	-48691,78	26638,33	8687,39	758,92	0,53
Clordano iso a	-9006,22	3632,35	1105,16	94,58	0,50
Clordano iso b	-1656,32	7403,13	1942,42	344,36	0,43
DDE	-227991,63	84719,12	58641,44	8414,4	1,14
DDD	-3081,12	5750,58	1791,42	112,41	0,51
Mirex	-283189,8	92070,61	400481,93	7422,89	0,72

El límite de decisión calculado en este estudio para cada uno de los plaguicidas organoclorados analizados estuvo entre 0,43 y 1,21 ppb.

La capacidad de detección ($CC\beta$) se calculó analizando 20 muestras blanco enriquecidas con el límite de decisión, realizando una curva de calibración y posteriormente calculando la desviación estándar de las áreas obtenidas de las muestras fortificadas, el intercepto y la pendiente de la curva de calibración. Luego se aplicó la fórmula para el cálculo de $CC\beta$ de cada plaguicida organoclorado.

En el cuadro 16 se muestran los resultados de la capacidad de detección para cada plaguicida organoclorado.

Cuadro 16: Capacidad de detección de plaguicidas organoclorados en leche de cabra.

Organoclorados	Desviación estándar Áreas	Intercepto curva calibración	Pendiente curva Calibración	$CC\beta$
Heptacloro	2398,193	-35061	18900,1	4,250
Aldrin	1377,239	-32131,6	24870,1	3,210
Clordano iso a	306,086	-6921,7	3435	4,451
Clordano iso b	373,914	-1403,6	7414,5	1,393
DDE	9113,680	-248919,1	88746,1	5,768
DDD	1143,660	-9404,9	6972,3	3,481
Mirex	2309,071	-261549,9	87780,7	5,930

El rango de la capacidad de detección obtenido para cada uno de los plaguicidas organoclorados analizados estuvo entre 1,393 y 5,930 ppb.

El último paso para la validación, fue determinar la robustez del método analítico. Los resultados de la robustez expresados como desviación estándar y su comparación con la desviación estándar obtenida en la precisión se muestran en el cuadro 17. El valor cuantificado más alto en la comparación de los promedios para cada plaguicida organoclorado y a qué parámetro corresponde dicho valor, se muestra en el cuadro 18.

Cuadro 17: Robustez de organoclorados expresados como desviación estándar y su comparación con la desviación estándar de la precisión.

Organoclorado	Desviación estándar Robustez	Desviación estándar Precisión
Heptacloro	0,0000000289	0,50
Aldrin	0,0000000173	0,25
Clordano iso a	0,0000000161	0,24
Clordano iso b	0,0000000300	0,08
DDE	0,0000000029	0,37
DDD	0,0000000043	0,26
Mirex	0	0,17

Cuadro 18: Valor promedio cuantificado más alto y su parámetro correspondiente.

Valor promedio mas alto	Parámetro
0,0000000506	Volumen de hexano
0,0000000306	Volumen de hexano
0,0000000306	Volumen de hexano
0,0000001225	Volumen de hexano
0,0000000056	Volumen de hexano
0,0000000100	Volumen de hexano
0,0000000000	-

La desviación estándar de la robustez de cada uno de los plaguicidas analizados estuvo entre 0 y 0,00000003 lo que es significativamente menor que la desviación estándar de la precisión en el punto más bajo de la curva. Además el promedio más alto en la comparación de los valores cuantificados corresponde en todos los casos al volumen de elusión con hexano.

2.- Muestras de leche de rebaños de cabras de la Comuna de Catemu.

Debido a que el método cumplió con todas las exigencias impuestas por la directiva 2002/657/CE de la Comunidad Europea para ser validado, se procedió a analizar las muestras de leche fresca proveniente de rebaños de cabras de productores de la Comuna de Catemu.

Los resultados de las muestras analizadas se muestran en el cuadro

Cuadro 19: Resultados de las muestras de leche de cabra analizadas para la detección de plaguicidas organoclorados.

Identificación de la muestra	Resultado	Identificación de la muestra	Resultado	Identificación de la Muestra	Resultado
1	Negativo	31	Negativo	61	Negativo
2	Negativo	32	Negativo	62	Negativo
3	Negativo	33	Negativo	63	Negativo
4	Negativo	34	Negativo	64	Negativo
5	Negativo	35	Negativo	65	Negativo
6	Positivo	36	Negativo	66	Negativo
7	Negativo	37	Negativo	67	Negativo
8	Negativo	38	Negativo	68	Negativo
9	Negativo	39	Negativo	69	Negativo
10	Negativo	40	Negativo	70	Negativo
11	Negativo	41	Negativo	71	Negativo
12	Negativo	42	Negativo	72	Negativo
13	Negativo	43	Negativo	73	Negativo
14	Negativo	44	Negativo	74	Negativo
15	Negativo	45	Negativo	75	Negativo
16	Negativo	46	Negativo	76	Negativo
17	Negativo	47	Negativo	77	Negativo
18	Negativo	48	Negativo	78	Negativo
19	Negativo	49	Negativo	79	Negativo
20	Negativo	50	Negativo	80	Negativo
21	Negativo	51	Negativo	81	Negativo
22	Negativo	52	Negativo	82	Negativo
23	Negativo	53	Negativo	83	Negativo
24	Negativo	54	Negativo	84	Negativo
25	Negativo	55	Negativo	85	Negativo
26	Negativo	56	Negativo	86	Negativo
27	Negativo	57	Negativo	87	Negativo
28	Negativo	58	Negativo	88	Negativo
29	Negativo	59	Negativo	89	Negativo
30	Negativo	60	Negativo	90	Negativo

DISCUSION

Los plaguicidas usados adecuadamente promueven la salud del hombre, permitiendo el control de insectos vectores de enfermedades e indirectamente al incrementar y mejorar la producción agrícola de alimentos. Sin embargo, deberá observarse siempre una “buena práctica agrícola” para evitar contaminaciones de los alimentos en general y por supuesto, de la leche.

El objetivo general de este estudio fue detectar la presencia de residuos de plaguicidas organoclorados en muestras de leche de cabra, para determinar la posible contaminación de la leche con estos compuestos y así verificar la sanidad de los productos derivados del procesamiento de esta leche, que es destinada fundamentalmente a la producción de quesos artesanales. Para la identificación de los plaguicidas organoclorados fue necesario montar, validar y adaptar el método analítico presente en el laboratorio de Farmacología de la Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias de la Universidad de Chile para la detección de plaguicidas organoclorados en músculo esquelético de cuatro especies comerciales (salmón, ave, bovino y cerdo) e introducir nuevos pasos para obtener una extracción completa de los plaguicidas en las muestras de leche.

Los métodos clásicos para la extracción de plaguicidas organoclorados, en general consideran muy largos periodos de extracción y grandes volúmenes de solventes. En 1993 Lott y Barker, informan la extracción con dispersión de la matriz en una fase sólida, utilizando como soporte la octadecilsilica y como purificador el Florisil® activado. Una de sus ventajas es la extracción con solvente en un sólo paso, lo que permite realizar una mayor cantidad de extracciones por día de análisis, además de proporcionar extractos limpios, los cuales pueden ser analizados directamente por cromatografía gaseosa con detector de captura de electrones.

La extracción de la materia grasa no tiene conexión con la extracción de plaguicidas. Este método permite una rápida extracción de los residuos de plaguicidas presentes en la leche de cabra (muestras adicionadas de plaguicidas organoclorados) y sin previa separación de la materia grasa.

El hexano fue el solvente utilizado para la elusión de los plaguicidas pues aumenta los porcentajes de recuperación de todos los plaguicidas en estudio.

Debido a estas características y a la factibilidad técnica se optó por utilizar este método, tanto para la validación del método como para la detección de los plaguicidas, en las muestras de leche.

La validación de una metodología analítica implica manejo del trabajo en el laboratorio, conocimiento del análisis y de las condiciones cromatográficas y es esencial para alcanzar datos exactos. Al respecto, la cromatografía gaseosa resultó ser una herramienta analítica muy exacta lo cuál queda reflejado en los resultados encontrados.

Los análisis realizados al comienzo del estudio, orientados a establecer la especificidad del método, pudieron constatar la existencia de interferencias mínimas que con ligeras modificaciones del método desaparecieron, abriendo así la posibilidad de validar el método analítico. La sensibilidad alcanzada por el método seleccionado fue de 3 ppb. Esta sensibilidad permite detectar concentraciones residuales de plaguicidas inferiores a las recomendadas por el *Codex Alimentarius*, y es menor a la recomendada por Pinto *et al* en 1987, donde se determinó una sensibilidad de 5 ppb para la detección de plaguicidas organoclorados en leche.

La aparición temporal (tiempos de retención) de los plaguicidas organoclorados mediante cromatografía gaseosa con detector de captura de electrones, está en directa relación con su polaridad y las condiciones cromatográficas existentes. Para ello se utilizó una columna capilar levemente polar, lo que sumado a la polaridad de los

plaguicidas, determina que el orden de aparición sea característico; convirtiendo a este parámetro en una herramienta útil pues no cabe la posibilidad de alteración del orden de aparición. Los tiempos de retención no fueron siempre los mismos para los plaguicidas analizados pues se determinó que cambios en las condiciones experimentales alteran este parámetro. El orden de aparición de los plaguicidas organoclorados analizados en este estudio fue el siguiente: Heptacloro, Aldrin, Clordano iso a, Clordano iso b, DDE, DDD y Mirex, en donde el Heptacloro es el más polar y el Mirex el menos polar.

Las recuperaciones obtenidas para los plaguicidas organoclorados fluctuaron entre 81,67 y 123,33 %, por lo tanto se encuentran dentro del rango aceptado por la directiva 2002/657/CE. Los porcentajes de recuperación obtenidos en este estudio son similares a los obtenidos en estudios hechos por Prapamontol y Stevenson en 1991 y Armendáriz *et al.*, en el año 2004 en muestras de leche de vaca.

Los estudios de repetitividad fueron estimados a partir de los coeficientes de variación obtenidos en las muestras ensayadas. Los valores calculados presentaron un coeficiente de variación entre 0,0044 y 0,07% lo que cumple con la condición aceptada, pues el coeficiente de variación de todas las concentraciones medidas fue inferior al de la precisión, que es lo que exige la directiva 2002/657/CE.

Para estimar la precisión del método analítico, la leche usada para los ensayos de repetitividad fue sometida a análisis en diferentes días, aplicando el mismo protocolo. Las precisiones obtenidas, expresadas como el coeficiente de variación, fluctuaron entre 0,03 y 0,17%, por lo que este parámetro cumple con lo requerido por la directiva 2002/657/CE, en la que exigen valores de coeficientes de variación lo más bajos posible.

Los análisis de regresión lineal realizados demostraron la linealidad existente en el método en su conjunto, lo que queda demostrado al analizar los coeficientes de

correlación de las curvas. Al respecto, todos los plaguicidas organoclorados analizados mostraron coeficientes de correlación mayores a 0,9 lo que se ajusta al criterio establecido por la directiva 2002/657/CE para la validación del método analítico. Estos resultados señalan que el método seleccionado, además de identificar los analitos estudiados, puede cuantificarlos en muestras problema. Es importante señalar que a mayor linealidad mayor es la capacidad de determinar con exactitud la concentración en muestras problema o fortificadas.

Los límites de decisión ($CC\alpha$) y la capacidad de detección ($CC\beta$) fueron calculados de acuerdo a la definición de la directiva 2002/657/CE. El límite de decisión estuvo en el rango de 0,43 (Heptacloro) a 1,21 ppb (Clordano iso b) y se informó finalmente como 1 ppb para los siete plaguicidas analizados con el fin de utilizar sólo un valor en las mediciones. El $CC\alpha$ calculado es el límite a partir del cual se puede concluir, con una probabilidad de error α (1%), que una muestra no es conforme. Estos valores son más altos que los obtenidos en estudios hechos por Yagüe *et al* en el año 2002, quienes obtuvieron límites de decisión entre 0,02 y 0,12 ppb, para plaguicidas organoclorados en yogurt. La capacidad de detección estuvo entre 1,393 (Clordano iso b) y 5,930 ppb (Mirex) informándose finalmente como 6 ppb para todos los plaguicidas analizados. La comparación de las capacidades de detección obtenidas en este estudio, con los resultados reportados por Mañes *et al* en el año 1993, donde se obtuvieron capacidades de detección entre 0,1 y 6,4 ppb, muestran que los valores obtenidos en este estudio pueden ser considerados satisfactorios. El valor más alto corresponde al Mirex, el último plaguicida en aparecer y además el que presentó el tiempo de retención mayor. El $CC\beta$ calculado es el contenido mínimo de la sustancia que puede ser detectado, identificado o cuantificado con una posibilidad de error β (5%).

En el caso de la robustez mediante la comparación de los promedios de los valores cuantificados se pudo identificar que el factor que más afecta a la robustez del método para todos los organoclorados analizados, exceptuando el Mirex, fue el volumen de hexano utilizado para la elusión de los plaguicidas. Para el Mirex no existió ningún factor que afectara la robustez del método. Este factor debe quedar establecido en el instructivo de la metodología analítica. Las desviaciones estándar de la robustez fueron significativamente menores que las desviaciones estándar de la precisión para todos los plaguicidas organoclorados en el punto mas bajo de la curva, por lo que se pudo interpretar que el método es lo suficientemente robusto, según lo dispuesto por la directiva 2002/657/CE.

Del análisis de las 90 muestras de leche de cabra traídas de productores de la comuna de Catemu, solo una muestra resultó positiva al plaguicida DDE en una concentración aproximada de 3 ppb. Esta muestra fue posteriormente sometida a un procedimiento en el cuál se le añade el analito detectado en una concentración similar a la cuantificada con el fin de mejorar la identificación del analito (cocromatografía). Los resultados de esta cocromatografía confirmaron la no presencia de este plaguicida en la muestra, por lo que se pudo determinar que el resultado positivo se debió a la presencia de algún compuesto presente en la leche que fue eluido al mismo tiempo que el plaguicida.

En comparación con los límites máximos residuales permitidos por el *Codex Alimentarius* para plaguicidas organoclorados en leche, todas las muestras analizadas en este estudio se encontraron bajo los límites máximos establecidos para los plaguicidas estudiados, lo que puede ser considerado satisfactorio pues es una herramienta útil para garantizar la calidad sanitaria de los productos obtenidos a partir de esta leche. Además es importante destacar que estos resultados podrían deberse a prohibición en la

importación, fabricación, venta y uso de los plaguicidas en estudio, lo que demostraría que actualmente estos plaguicidas estarían siendo controlados, destacándose las “buenas prácticas agrícolas” de los agricultores de la Comuna de Catemu.

A pesar que en nuestro país no existen estudios acerca de la presencia de residuos de plaguicidas organoclorados en leche de cabra, nuestros resultados pueden ser comparados con estudios descritos en la literatura nacional, en donde podemos señalar que para todos los plaguicidas analizados, los límites máximos residuales fueron más bajos que los descritos por Pinto *et al.*, 1990a, quienes detectaron la presencia de residuos de DDT, sus metabolitos, Aldrin, y Heptacloro en niveles sobre los máximo permisibles en muestras de leche bovina de plantas lecheras de la Región Metropolitana, VIII, IX y X Regiones del país. Aún cuando estos estudios corresponden a realidades geográficas y climáticas diferentes, disímiles sistemas de alimentación y distintas especies animales en estudio, de alguna manera estaría indicando que las normas reguladoras respecto al uso de plaguicidas organoclorados en la Comuna de Catemu serían más oportunas y eficaces.

Uno de los pocos estudios acerca de la presencia de residuos de plaguicidas organoclorados en leche de cabra fue llevado a cabo por Indraningsih *et al.*, en Australia, cerca de 15 años atrás. Estos autores estudiaron la presencia de residuos de endosulfan (un miembro de los plaguicidas organoclorados) en cabras lactantes, determinando que los principales sitios de acumulación de este plaguicida en las cabras son los riñones y el hígado y no la leche. Las bajas concentraciones de endosulfan detectadas en la leche se deberían a bajas concentraciones del plaguicida en la grasa lo que podría ser reflejo del rápido metabolismo del tejido adiposo en animales en lactancia. Esta podría ser otra posible explicación para los bajos niveles de residuos de plaguicidas organoclorados encontrados en las muestras de leche de cabra analizadas en nuestro estudio.

La decisión de regular y prohibir el uso de algunos plaguicidas organoclorados ya ha comenzado, a través de las resoluciones de Ministerio de Agricultura, lo cual debe destacarse. La resolución N° 2.142 prohibió a partir de 1987 la importación, fabricación, venta, distribución y uso de los plaguicidas Dieldrin, Endrin, Heptacloro y Clordano y la resolución N° 2.003 de 1988 prohíbe la importación, fabricación, venta, distribución y uso del plaguicida Aldrin. La prohibición del uso de Mirex es reciente y al igual que en el caso de los plaguicidas anteriormente nombrados se prohíbe la importación, fabricación, venta, distribución y aplicación de este plaguicida. Estas disposiciones, sumadas a programas que incentiven “buenas prácticas agrícolas”, programas de instrucción para los agricultores y un control periódico de los residuos de plaguicidas organoclorados en la leche, harán alcanzar niveles suficientemente bajos y sin riesgo para la salud pública.

En resumen, a la luz de la información disponible, se puede señalar que el único método efectivo para evitar los efectos nocivos de residuos de plaguicidas organoclorados sobre los organismos vivos es evitar la incorporación de estas sustancias a la cadena trófica alimentaria. La aplicación de métodos alternativos al uso de plaguicidas en el manejo de cultivos, como es el caso de los Biopesticidas (empleo de organismos vivos) conducentes a la obtención de bioalimentos, resulta por el momento ser un procedimiento difícil de poner en práctica dado su alto costo (Vega de Kuyper, 2002). Por esta razón es necesario llevar a cabo nuevos estudios y monitoreo acerca de la presencia de residuos de plaguicidas organoclorados en la leche, los que mantenidos en el tiempo, pueden entregar información actualizada para la adopción de políticas sanitarias eficientes y con fundamento científico. De esta manera se entiende el rol del Estado por una parte, y por otra, el de la empresa privada en el control de calidad de los alimentos.

CONCLUSIONES.

El método de dispersión de la matriz en fase sólida es aplicable a la detección de los plaguicidas organoclorados en leche de cabra: Heptacloro, Aldrin, Clordano iso a, Clordano iso b, DDE, DDD y Mirex.

El método seleccionado es rápido, exacto, repetible, preciso y robusto, para la determinación de siete plaguicidas organoclorados en leche de cabra.

La especificidad, sensibilidad y linealidad, alcanzadas por el método, son adecuadas para la detección de siete plaguicidas organoclorados en leche de cabra, en relación con sus límites máximos residuales.

El método ensayado se caracterizó por su simplicidad, confiabilidad y alto porcentaje de recuperación, en muestras de leche de cabra contaminada con plaguicidas organoclorados. Un personal medianamente entrenado puede analizar fácilmente hasta seis muestras por día incluyendo la etapa de cromatografía.

Los límites de decisión ($CC\alpha$) y las capacidades de detección ($CC\beta$) para los siete plaguicidas organoclorados estudiados en la leche de cabra con este método, son de 1 y 6 ng/ml respectivamente. Estos límites se encuentran por debajo de los límites máximos residuales permitidos por el *Codex Alimentarius*, lo que permite contar con un método sensible y específico en los laboratorios nacionales para la detección de plaguicidas organoclorados en leche de cabra.

Los resultados de este estudio confirman que las muestras de leche de cabra de los productores de la Comuna de Catemu, presentan niveles de residuos, de los siete plaguicidas organoclorados analizados, por debajo de los límites máximos residuales permitidos por el *Codex Alimentarius*.

Este es el primer estudio acerca de la presencia de residuos de plaguicidas organoclorados en leche de cabra hecho en nuestro país. Sin embargo, aunque nuestros resultados son satisfactorios, no descartan la necesidad de implementar un programa nacional de vigilancia para la presencia de otros tipos de plaguicidas (Organofosforados, Carbamatos, Piretroides) en leche de distintas especies animales, con el objetivo de aportar a mejorar la seguridad alimentaria, pues estos plaguicidas también presentan riesgos para la salud humana.

BIBLIOGRAFÍA

- **ARATA, A.** 1984. El uso de los plaguicidas en la agricultura y la salud pública. El punto de vista de la Ecología Humana. *Folia Entomol. Mex.* 59 (1):139-185.

- **ARMENDARIZ, C.; PEREZ DE CIRIZA, J.A.; FARRÉ, R.** 2004. Gas chromatographic determination of organochlorine pesticides in cow milk. *Intern. J. Food Sci. Nutr.* 55(3):215-221.

- **ARMISHAW, P.; MILLAR, R.G.** 1993. Comparison of gel permeation chromatography, sweep codestillation, and florisil column adsorption chromatography as sample cleanup techniques for the determination of organochlorine pesticide residues in animal fats. *J. AOAC Int.* 76(6): 1317-1322.

- **AULT, J.A.; SPURGEON, T.E.; GILLARD, D.E.; MALLISON, E.T.** 1985. Multiresidue gas chromatography method for determining organochlorine pesticides in meats: validation study for swine and beef fats. *J. AOAC.* 68(5): 941-944.

- **AZMI, M.A.; NAQVI, S.N.H.; ARSHAD AZMI, M.; ASLAM, M.** 2006. Effect of pesticide residues on health and different enzyme levels in the blood of farm workers from Gadap (rural area) Karachi – Pakistan. *Chemosphere.* 64 (10): 1739-1744.

- **BARRAL, R.; POZO, K.; URRUTIA, R.; CISTERNAS, M.; PACHECO, P.; FOCARDI, S.** 2005. Plaguicidas Organoclorados Persistentes En Sedimentos De Tres Lagos Costeros y un Lago Andino De Chile Central. *Boletín de la Sociedad Chilena de Química.* 23(3): 149-159.

- **BARRIENTOS, A.** 2005. Presencia de Residuos de Plaguicidas Organoclorados en Leche Cruda de Plantas Lecheras de la IX y X Regiones. Tesis Ingeniero en Alimentos. Valdivia. Chile. Universidad Austral. 65 p.

- **BASUALTO, J.** 1991. Contaminación ambiental con pesticidas. In: Primer Curso Nacional de Pesticidas para Ingenieros Agrónomos del Sector Estatal. Antumapu. Chile. pp. 42- 54.

- **BENTABOL, A.; JODRAL, M.** 1995. Ocurrance of organochlorine agrochemical residues in Spanish cheeses. Pestic Sci. 44:177-182.

- **BROCK, J.W.; BURSE, V.W.; ASHLEY, D.L.; NAJAM, A.R.; GREEN, V.E.; KORVER, M.P.; POWELL, V.K.; HODGE, C.C.; NEEDHAM, L.L.** 1996. An improved analysis for chlorinated pesticides and biphenyls (PCBs) in human and bovine sera using solid-phase extraction. Journal of Anal. Toxicol. 20(7): 528-536.

- **CAMPOS, R.** 1990. Residuos de pesticidas organoclorados en Leche Materna, de la Provincia de Cautín. Tesis Químico Laborista. Temuco. Chile. Universidad de la Frontera, Facultad de Ingeniería y Administración. 100p.

- **CARRASCO Y PRIMO.** 1980. Química agrícola II. Plaguicidas y fitoreguladores. 2ª ed. Alambra, Madrid. 639p.

- **CHEN, L.; DING, L.; JIN, H.; SONG, D.; ZHANG, H.; LI, J.; ZHANG, K.; WANG, Y.; ZHANG, H.** 2007. The determination of organochlorine pesticides

based on dynamic microwave-assisted extraction coupled with on-line solid-phase extraction of high-performance liquid chromatography. Anal. Chim. Acta. 589(2): 239-246.

- **CHILE. MINISTERIO DE AGRICULTURA.** 1980. Decreto ley N° 3.557 Título IV. Establece disposiciones sobre protección agrícola. Diario Oficial de la República de Chile, 09 febrero 1981.

- **CHILE. MINISTERIO DE SALUD.** 1999. Resolución N° 581. Fija Tolerancias Máximas de Residuos de Plaguicidas en los Alimentos de Consumo Interno. Diario Oficial de la República de Chile, 23 febrero 1999.

- **CHILE. SERVICIO AGRICOLA Y GANADERO.** 2006. Legislación respecto a plaguicidas de uso agrícola. [en línea]

<http://www.sag.gob.cl/pls/portal/docs/PAGE/PG_SAG_BIBLIOTECA/BIBL_INSYP_ROD/BIBLIO_INS_PLAG/BIBLIO_INS_PLAG_MANUALES/MANUAL_BUEN_USO_PLAG/L02.PDF> [consulta: 05-12-2006].

- **COLBORN, T.; DUMANOSKI, D.; MYRES, J.P.** 1996. Our Stolen Future. Dutton, New York. (citado por Muñoz de Toro, M.; Beldoménico, H.; García, S.; Stoker, C.; De Jesús, J.; Beldoménico, P.; Ramos, J.; Luque, E. 2005. Organochlorine levels in adipose tissue of women from a littoral region of Argentina. Environ. res. [en línea]<<http://www.sciencedirect.com>> [consulta: 20-03-2006]).

-DIARIO OFICIAL DE LAS COMUNIDADES EUROPEAS. 2002. Comisión de las Comunidades Europeas. Directiva 2002/657/CE. 35p.

-DIAZ, O.; GARCIA, M. 2003. Plaguicidas. **In:** Avances en toxicología de contaminantes químicos en alimentos. 2ª ed. Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo. Chile. pp. 77-81.

-DURHAM, W.F. 1971. Significance of pesticide residues to human Health. J. Dairy. Sci. 54(5):701-706.

-EL-KABBANY, S.; RASHED, M.M.; ZAYED, M.A. 2000. Monitoring of the pesticide levels in some waters supplies and agricultural land, in El-Haram, Giza (A.R.E.). J. Hazard Mater. 72(1): 11-21.

-FAO/OMS. FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS.1998. Programa conjunto sobre normas alimentarias, Comisión Del Codex Alimentarius. Residuos de Plaguicidas en los Alimentos: Límites Máximos de Residuos. Roma. Vol.2B.

-FAO/OMS. FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS 2003. (Versión Revisada). Código Internacional de conducta para la distribución y utilización de plaguicidas. Adoptado por el 123 ° periodo de sesiones del consejo de la FAO. Roma. pp. 2-31.

-**FERNICOLA, N.** 1985. Toxicología de los insecticidas organoclorados. Bol. Of. Sanit. Panam. 98(1):10-19.

-**GALLENBERG, L.A.; VODICNIK, M.J.** 1989. Transfer of persistent chemicals in milk. Drug Metab. Rev. 21:273-317. (citado por Mallatau, H.; Pappas, C.P.; Kondyli, E.; Albanis, T.A. 1996. Pesticide residues in milk and cheeses from Greece. Sci. Total Environ. 196(2):111-117).

-**GIRDHAR, N.; SINGHAL, K.K.** 1989. Sub acute toxicity of lindane (γ benzene hexachloride) in ruminants. Ind. J. Anim. Nutr. 6(2): 133-139.

-**HARRIS, C.; WOOLRIDGE, M.; HAY, A.** 2001. Factors affecting the transfer of organochlorine pesticide residues to breastmilk. Chemosphere. 43(2): 243-256..

- **HOFFMANN, C.; ANTÔNIA DA SILVA, G.; JESUS, R.; TEIXEIRA, H.; AUGUSTO, F.** 2007. Neuro-genetic multioptimization of the determination of polychlorinated biphenyl congeners in human milk by headspace solid phase microextraction coupled to gas chromatography with electron capture detection. Anal. Chim. Acta. 585 (1): 66-75.

-**HOLSTEGE, D.M.; SCHARBERG, D.L.; TOR, E.R.; HART, L.C.; GALEY, F.D.** 1994. A rapid multiresidue screen for organophosphorus, organochlorine, and N-methyl carbamate insecticides in plant and animal tissues. J. AOAC Int. 77(5): 1263-1274.

-INDRANINGSIH; MC SWEENEY, C.S.; LADDS, P.W. 1993. Residues of endosulfan in the tissues of lactating goats. *Aust. Vet. J.* 70(2): 59-62.

-INTERGOVERNMENTAL FORUM ON CHEMICAL SAFETY. IFCS. 2003. Forum IV. Bangkok. Tailandia. 1-7 de Noviembre de 2003.

-KANG, B.K.; SINH, B.; CHAHAL, K.K.; BATTU, R.S. 2002. Contamination of feed concentrates and green fodder with pesticide residues. *Pestic. Res. J.* 4(2): 308-312.

-KATHPAL, T.S.; KUMARI, B.; SINGH, S.; SINGH, J. 2001. Multi-residue analysis of bovine and human milk in cotton growing belt of Haryana. In: Proceedings of the International conference on pesticides, environment, food security organized by Society of Pesticide Science, New Delhi, India, pp. 236-238.

-LAURIA, L.; SETTIMI, L.; SPINELLI, A.; FIGA-TALAMANCA, I. 2006. Exposure to pesticides and time to pregnancy among female greenhouse workers. *Reprod. Toxicol.* 22(3):425-430.

-LONG, A.R.; CROUCH, M.D.; BARKER, S.A. 1991. Multiresidue matrix solid phase dispersion (MSPD) extraction and gas chromatographic screening on nine chlorinated pesticides in catfish (*Ictalurus punctatus*) muscle tissue. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 74(4): 667-670.

-LONGNECKER, M.P.; KLEBANOFF, M.A.; ZHOU, H.; BROCK, J.W. 2001. Association between maternal serum concentration of the DDT metabolite DDE and preterm and small-for-gestacional-age babies at birth. *Lancet*. 358 (9276): 110-114.

-LOSADA, A.; FERNANDEZ, N.; DIEZ, M.J.; TERAN, M.T.; GARCIA, J.; SIERRA, M. 1996. Organochlorine pesticide residues in bovine milk from León (Spain). *Sci. Total Environ*. 181(2):133-135.

-LOTT, H.M.; BARKER, S.A. 1993. Matrix Solid – Phase Dispersion Extraction and Gas Chromatographic Screening of 14 Chlorinated Pesticides in Oysters (*Crassostrea virginica*). *J. AOAC Int*. 76(1):69-72.

-MALLATOU, H.; PAPPAS, C.P.; KONDYLI, E.; ALBANIS, T.A. 1996. Pesticide residues in milk and cheeses from Greece. *Sci. Total Environ*. 196 (2):111-117.

-MANSOUR, S. 2004. Pesticide exposure – Egyptian scene. *Toxicology*. 198(1-3):91-115.

-MAÑES, J.; FONT, G.; PICO, Y. 1993. Evaluation of a solid-phase extraction system for determining pesticide residues in milk. *J. Chromatogr. A*. 642 (1-2):195-204.

-MARTINEZ, M.P.; ANGULO, R.; POZO, R.; JODRAL, M. 1997. Organochlorine Pesticides in Pasteurized Milk and Associated Health Risks. Food Chem. Toxicol. 35 (6): 621-624.

-MORALEDA, J. 2005. Niveles de Residuos de Pesticidas Organoclorados en Leche Pasteurizada UHT procedente de la IX y X Regiones de Chile. Tesis Ingeniero en Alimentos. Valdivia. Chile. Universidad Austral. 82p.

-MUKHERJEE, I.; GOPAL, M. 1996. Chromatographic techniques in the analysis of organochlorine pesticide residues. J. Chromatogr. A. 754(1-2): 33-42.

-MUÑOZ DE TORO, M.; BELDOMENICO, H.; GARCIA, S.; STOKER, C.; DE JESUS, J.; BELDOMENICO, P.; RAMOS, J.; LUQUE, E. 2005. Organochlorine levels in adipose tissues of women from a littoral region of Argentina. Environ. Res. [en línea] <<http://www.sciencedirect.com>> [consulta: 20-03-2006].

-NAG, S.; MAHANTA, S.K.; RAIKWAR, M.K.; BHADORIA, B.K. 2005. Residues in milk and production performance of goats following the intake of a pesticide (endosulfan). Small Ruminant Res. [en línea] <<http://www.sciencedirect.com>> [consulta: 10-10-2006].

-NURMINEN, T. 1995. Maternal pesticide exposure and pregnancy outcome. J. Occup. Environ. Med. 37: 935-940.

-ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD. 1992. Introducción. **In:** Consecuencias sanitarias del empleo de plaguicidas en la agricultura. Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente. Ginebra. pp 11-13.

-PARIS, E.; RÍOS, J. 2001. Intoxicaciones: Epidemiología, clínica y tratamiento. **In:** Ediciones Universidad Católica de Chile. Santiago, Chile. 257-258.

-PINTO, M.; BRAVO, S.; CRISTI, R. 1987. Métodos alternativos de bajo costo en análisis de pesticidas organoclorados. Agro Sur. 15 (1): 10-18.

-PINTO, C.; MONTES, L.; PINTO, M.; CRISTI, R.; VERGARA, G. 1990a. Residuos de pesticidas organoclorados en leche pasteurizada de 12 plantas lecheras. Chile. Arch. Med. Vet. 22(1): 85-94.

-PINTO, M.; MONTES, L.; ANRIQUE, R.; CARILLO, R.; TAMAYO, R.; CRISTI, R. 1990b. Residuos de plaguicidas organoclorados en leche de vaca y su relación con los alimentos para uso animal como fuentes de contaminación. Arch. Med. Vet. 22(2):143-153.

-PRADO, G.; DIAZ, G.; VEGA Y LEON, S.; GONZALES, M.; PEREZ, N.; URBAN, G.; GUTIERREZ, R.; RAMIREZ, A.; PINTO, M. 1998. Residuos de plaguicidas organoclorados en leche pasteurizada comercializada en Ciudad de México. Arch. Med. Vet. 30(1):55-65.

-PRAPAMONTOL, T.; STEVENSON, D. 1991. Rapid method for determination of organochlorine pesticides in milk. *J. Chromatogr. A.* 552: 249-257.

-RAMIREZ, S. 2006. Efectos Nocivos provocados por el uso de Plaguicidas en la Fauna Silvestre de México y sus consecuencias ecológicas. [en línea]. <<http://www.congresocbta.unam.mx/PVA07.htm>> [consulta: 13-03-2006].

-SHERMA, J. 1999. Pesticide residues analysis. 1997-1998. *J. AOAC Int.* 82(3): 561-574.

-SURENDRA, N.B.; UNNIKRISHNAN, V.; PREEJA, C.N.; RAMAMURTHI, M.K. 2000. A study on transfer of organochlorine pesticide residues from the feed of the cattle into their milk. *Pestic. Res. J.* 12(1): 68-73.

-TRIVIÑO, I. 1982. Contaminación de leche materna, tejido adiposo de mujeres y leche de vaca por plaguicidas de alto poder residual. *Bol. Inst. Salud Pública Chile.* 23(1-2).

-U.S. DEPARTAMENT OF AGRICULTURE. 1990. Compound Evaluation and Analitical Capability National Residue Program Plan, Food Safety and Inspection Service. J. Brown Eds. Washington DC, Estados Unidos de Norteamérica. 204 p.

-VEGA DE KUYPER, J. 2002. Química del medio ambiente y de los recursos naturales. Ediciones Universidad Católica de Chile. Santiago. Chile. 181p.

-WHORTON, D.; KRAUSS, RM.; MARSHALL, S.; MILBY, TH. 1977. Infertility in male pesticide workers. *Lancet*. 310 (8051):1259-1261.

-WOLFF, M.S.; TONIOLO, P.G. 1995. Environmental organochlorine exposure as a potential etiologic factor in breast cancer. *Environ. Health Perspect.* 103 (7): 141-145.

-YAGÜE, C.; HERRERA, A.; ARIÑO, A.; LAZARO, R.; BAYARRI, S.; CONCHELLO, P. 2002. Rapid method for trace determination of organochlorine pesticides and polychlorinated biphenyls in yogurt. *J. AOAC Int.* 85 (5):1181-1186.

-YOU DEN, W.J.; STEINER, E.H. 1975. Statistical Manual of the AOAC-Association of Official Analytical Chemists. In: Statistical methods for chemists. New York, United States. pp. 90-99.

-ZHANG, H.; CHAI, Z. F.; SUN, B.H.; ZHANG, J.L. 2006. A Survey of Extractable Persistent Organochlorine Pollutants in Chinese Commercial Yogurt. *J. Dairy Sci.* 89(5):1413-1419.

