



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

FACTORES BIOLÓGICOS Y AMBIENTALES QUE
INFLUYEN EN LA EXPOSICIÓN DE LACTANTES A
PLAGUICIDAS ORGANOCOLORADOS A TRAVÉS DE LA
INGESTIÓN DE LECHE MATERNA

TESIS PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTORA EN CIENCIAS AMBIENTALES

PRESENTA:

JOANA GOMES MARTINS

DIRIGIDA POR:

DRA. ARACELI AMAYA CHÁVEZ

DR. ARTURO COLÍN CRUZ

DR. STEFAN WALISZEWSKI



TOLUCA, MÉXICO. FEBRERO 2016

El Protocolo De Investigación correspondiente a esta tesis doctoral fue aceptado por acuerdo de la Comisión Académica de Maestría y Doctorado en Ciencias Ambientales, en su sesión del 5 de julio de 2011, con el número de registro: 26/DCA/2011.

El trabajo de investigación que se presenta fue realizado en el Departamento de Farmacia de la Facultad de Química de la Universidad Autónoma del Estado de México, bajo la línea de generación y aplicación del conocimiento “Evaluación farmacológica y toxicológica de sustancias y su aplicación”, con parte del financiamiento a través del Proyecto UAEMex con clave 3721/2014/CI, con título “Exposición de lactantes a plaguicidas organoclorados a través de la ingesta de leche materna en el Estado de México.

ÍNDICE GENERAL

	Pág.
Resumen	1
Abstract	2
1. Marco Teórico	3
1.1. Propiedades físico-químicas	4
1.2. Toxicocinética	7
1.3. Efectos de los organoclorados en el hombre	9
1.4. Exposición de lactantes	11
2. Antecedentes	11
3. Planteamiento del problema	19
4. Hipótesis	19
5. Objetivo general	19
5.1. Objetivos específicos	20
6. Metodología	20
6.1. Población en estudio	20
6.2. Estimación del consumo de plaguicidas OC en el Estado de México y en el Estado de Veracruz.	21
6.3. Desarrollo y validación de la metodología analítica para la determinación de los niveles de plaguicidas OC en las muestras de leche materna.	22
6.3.1. Soluciones y reactivos	23
6.3.2. Técnica de extracción: SPME	24
6.3.3. Método analítico: cromatografía de gases (GC)	24
6.3.4. Método de detección: espectrometría de masas (MS)	25
6.4. Evaluación de la influencia de los factores ambientales y biológicos, en los niveles de exposición de los lactantes.	26
6.5. Evaluación de la exposición de los lactantes a plaguicidas organoclorados por ingesta de leche materna.	26
6.6. Asociación con el riesgo a su salud.	27
6.7. Elaboración de las recomendaciones o estrategias que apoyen a la protección de las poblaciones afectadas.	27
7. Resultados y discusión	28

7.1.	Resultados y discusión publicados	28
7.1.1.	Artículo publicado	29
7.1.1.1.	Carta de aceptación	29
7.1.1.2.	Resumen	30
7.1.1.3.	Artículo publicado	31
7.1.2.	Artículo enviado	45
7.1.2.1.	Carta de confirmación de envío	45
7.1.2.2.	Resumen	46
7.1.2.3.	Artículo enviado	47
7.2.	Resultados y discusión no publicados	68
7.2.1.	Población en estudio	68
7.2.1.1.	Procedencia de las muestras	68
7.2.1.2.	Edad de las madres voluntarias	69
7.2.1.3.	Edad de los bebés cuyas madres participaron en el estudio	71
7.2.1.4.	Problemas de salud presentados por los bebés al nacer	73
7.2.1.5.	Índice de masa corporal de las madres participantes en el estudio	73
7.2.1.6.	Duración del embarazo	75
7.2.1.7.	Embarazos anteriores	76
7.2.1.8.	Alimentación de la madre	77
7.2.1.9.	Exposición ocupacional y/o ambiental a los plaguicidas organoclorados	84
7.2.2.	Estimación del consumo de plaguicidas OC en el Estado de México y en el Estado de Veracruz	85
7.2.3.	Desarrollo y validación de la metodología analítica para la determinación de los niveles de plaguicidas OC en las muestras de leche materna.	88
7.2.3.1.	Optimización de la técnica de extracción (SPME)	88
7.2.3.2.	Validación de la metodología analítica	91
7.2.4.	Evaluación de la influencia de los factores ambientales y biológicos, en los niveles de exposición de los lactantes.	94
7.2.5.	Evaluación de la exposición de los lactantes a plaguicidas organoclorados por ingesta de leche materna.	95

7.2.6. Asociación con el riesgo a su salud.	95
7.2.7. Elaboración de las recomendaciones o estrategias que apoyen a la protección de las poblaciones afectadas.	97
8. Conclusiones	98
9. Referencias bibliográficas	99
Anexo 1 - Cuestionario	105
Anexo 2 – Carta de consentimiento informado	114
Anexo 3 – Participaciones en congresos	118
Anexo 4 - Reconocimiento	121

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Rango de edades de las madres donantes del Estado de México	70
Figura 2. Rango de edades de las madres donantes del estado de Veracruz	71
Figura 3. Rango de edades de los bebés procedentes del Estado de México, cuyas madres participaron en el estudio	72
Figura 4. Rango de edades de los bebés procedentes de Veracruz, cuyas madres participaron en el estudio	72
Figura 5. Índice de masa corporal de las madres procedentes del Estado de México	74
Figura 6. Índice de masa corporal de las madres procedentes de Veracruz.	75
Figura 7. Duración del embarazo para las madres procedentes de ambos estados	76
Figura 8. Frecuencia de consumo de carnes rojas para las madres participantes, de ambos estados	77
Figura 9. Frecuencia de consumo de carnes blancas para las madres participantes, de ambos estados	78
Figura 10. Frecuencia de consumo de embutidos para las madres participantes, de ambos estados	79
Figura 11. Frecuencia de consumo de huevos para las madres participantes, de ambos estados	79
Figura 12. Frecuencia de consumo de pescado para las madres participantes, de ambos estados	80
Figura 13. Frecuencia de consumo de mariscos para las madres participantes, de ambos estados	81
Figura 14. Frecuencia de consumo de tubérculos y cereales para las madres participantes, de ambos estados	81
Figura 15. Frecuencia de consumo de lácteos para las madres participantes, de ambos estados	82
Figura 16. Frecuencia de consumo de lácteos para las madres participantes, de ambos estados	83

Figura 17. Frecuencia de consumo de aceite vegetal para las madres participantes, de ambos estados	83
Figura 18. Influencia del revestimiento de las fibras en las áreas cromatográficas de los picos obtenidos, para algunos de los plaguicidas estudiados	89
Figura 19. Influencia de la temperatura de extracción en las áreas cromatográficas de los picos obtenidos, para algunos de los plaguicidas estudiados	89
Figura 20. Influencia del tiempo de extracción en las áreas cromatográficas de los picos obtenidos, para algunos de los plaguicidas estudiados	90

ÍNDICE DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Persistencia en el aire, agua y suelo de algunos plaguicidas organoclorados	4
Tabla 2. Derivados del difenilcloroetano de acuerdo con los radicales sustituyentes	5
Tabla 3. Rangos de calibración adoptados para los plaguicidas estudiados.	24
Tabla 4. Tiempos de retención y fragmentos MS usados para la cuantificación de los compuestos estudiados.	25
Tabla 5. Zonas con mayor uso de plaguicidas en México, 2000.	86
Tabla 6. Uso de DDT para el control de paludismo en México, 1988-1999	87
Tabla 7. Valores de pendientes y coeficientes de correlación (R^2) de las curvas de calibración, límites de detección (LOD, $\mu\text{g/L}$) y cuantificación (LOQ, $\mu\text{g/L}$), porcentajes de recobro (R, %) y correspondiente porcentaje de desviación estándar relativa (% RSD, $n \geq 3$) para cada plaguicida.	91
Table 8. Repetibilidad ($n \geq 3$) y precisión intermedia (RSD, %) de los plaguicidas en estudio.	93

RESUMEN

A pesar de que el uso y la producción de contaminantes orgánicos persistentes, como es el caso de los plaguicidas organoclorados (OCPs), ha sido regulado en todo el mundo de acuerdo con la Convención de Estocolmo en 2001, estos compuestos siguen representando amenazas graves para el ambiente y para los seres humanos por su elevada persistencia y por su lipofilicidad. Los OCPs se acumulan en el tejido graso del cuerpo humano. En el caso de mujeres lactantes, estos contaminantes pasan del tejido graso hacia la leche materna, siendo posteriormente transferidos hacia el lactante. Con esta investigación se evaluaron los factores que pueden influir en los niveles de exposición de los lactantes a OCPs y los riesgos asociados a su salud. Se eligieron dos poblaciones de diferentes estados de la República Mexicana (Veracruz y Edo. de México) con diferentes características geográficas y de uso de OCPs. A las voluntarias, se les aplicó un cuestionario para conocer sus hábitos, datos ocupacionales y de vivienda, y se colectaron muestras de leche materna que fueron posteriormente analizadas utilizando la microextracción en fase sólida, la cromatografía de gases y la espectrometría de masas. Se detectó, en 10% de las muestras procedentes del Estado de México, por lo menos uno de los siguientes plaguicidas: 2,4' – DDD, 4,4' – DDE y HCB. Para Veracruz, se encontró que 37% de las muestras analizadas contenían 4,4'–DDE y/o HCB. Los principales factores que influyeron en la contaminación de las muestras de leche materna analizadas fueron: edad de la madre, número de partos, duración del período de lactancia, consumo de tubérculos, cereales y huevos, clima de la región, temperatura media anual, precipitación anual y altitud. Los niveles de plaguicidas detectados para ambos estados pueden representar un riesgo a la salud de los lactantes, principalmente los niveles de 4,4' – DDE para Veracruz y los niveles de HCB para el Estado de México. Se obtuvieron valores para la dosis de exposición diaria por ingesta de leche materna para el plaguicida 4,4'- DDE hasta 2 veces superiores a la dosis de ingesta diaria admisible, así como para el plaguicida HCB, cuyos valores de dosis de exposición diaria observados fueron de hasta 165 veces superiores a la dosis de ingesta diaria admisible. Así, sería conveniente continuar con programas de monitoreo para poder evaluar el desarrollo futuro de la exposición de lactantes e infantes a los plaguicidas organoclorados en el ambiente y especialmente en la leche materna, pues situándose este alimento en el topo de la cadena alimentaria, los lactantes estarán consumiendo las concentraciones más altas de contaminantes orgánicos persistentes acumulados en el ambiente.

ABSTRACT

Although the production and use of persistent organic pollutants, such as organochlorine pesticides (OCPs) has been regulated worldwide under the Stockholm Convention in 2001, these compounds continue to pose serious threats to the environment and to human beings due to their persistence and their high lipophilicity. OCPs accumulate in the fatty tissue of the human body. In the case of lactating women, these contaminants are transferred from the fatty tissue into the breast milk fat, and later transferred to the infant. In this study, factors that can influence the levels of exposure of infants to OCPs and risks associated with their health were evaluated. Two populations of different states of Mexico (Veracruz and Estado de México) with different geographical characteristics and policies of OCPs use were chosen. It was applied a questionnaire to the participants, to know their habits, occupational and housing data. Breast milk samples were collected and then analyzed using the solid phase microextraction, gas chromatography and mass spectrometry. It was detected at least one of the pesticides 2,4'-DDD, 4,4'-DDE and HCB in 10% of samples from the State of Mexico. For Veracruz, it was found that 37% of the analyzed samples contained 4,4'-DDE and / or HCB. The main factors that influenced the contamination of breast milk samples analyzed were: mother age, parity, duration of breastfeeding, consume of root vegetables, cereals and eggs, climate of the region, mean annual temperature, precipitation annual and altitude. Pesticide levels detected for both states may pose a risk to the health of infants, principally levels of 4,4'-DDE in Veracruz and levels of HCB in the Estado de México. The obtained values of daily exposure dose by intake of breast milk for pesticide 4,4'-DDE were two times higher than the acceptable daily intake. In the case of the pesticide HCB, the values of daily exposure dose observed were up to 165 times the acceptable daily intake. Thus, it would be appropriate to continue with monitoring programs to assess the future development of infant's exposure to organochlorine pesticides in the environment, especially through breast milk. As this food is on the top of the food chain, infants will be consuming the highest concentrations of POPs accumulated in the atmosphere.

1. MARCO TEÓRICO

El uso de plaguicidas presenta ventajas económicas considerables. Los agricultores los emplean para mejorar o mantener el rendimiento, eliminando o reduciendo la competencia de las malas hierbas o el ataque de plagas y para limitar la mano de obra necesaria. Estos químicos desempeñan, además, un papel fundamental puesto que garantizan cada año un abastecimiento fiable de productos agrarios a precios módicos, lo que los hace accesibles a todos los consumidores. Su empleo reduce la demanda de tierras para producción de alimentos, lo que a su vez deja tierras disponibles para otros usos, por ejemplo actividades recreativas, parques naturales y protección de la biodiversidad. Por otro lado, el incremento del volumen global de plaguicidas comercializados ha provocado preocupaciones acerca de sus efectos a mediano y largo plazo en la salud humana y en el medio ambiente [1].

Los plaguicidas se pueden clasificar de diversas maneras [2]:

1. Por su naturaleza química: inorgánicos, orgánicos (naturales, sintéticos);
2. Por su mecanismo de acción: contacto, ingestión, fumigante, sistémicos;
3. Por el tipo de organismos que afectan: insecticidas, acaricidas, fungicidas, herbicidas, etc.

En la categoría de plaguicidas orgánicos sintéticos están incluidos los plaguicidas organoclorados, que generalmente se utilizan como insecticidas, acaricidas específicos, herbicidas y fungicidas.

El uso generalizado de los plaguicidas organoclorados (OCPs) se debe a dos principales razones [2]:

1. Su persistencia, ya que al ser sustancias estables sus ingredientes permanecen activos durante un período largo de tiempo (Tabla 1);
2. El hecho de que la mayoría de los plaguicidas organoclorados sean muy económicos, sobre todo el diclorodifeniltricloroetano (DDT).

En la tabla 1, se presentan valores de persistencia en el aire, agua y suelo para algunos plaguicidas organoclorados.

Tabla 1. Persistencia en el aire, agua y suelo de algunos plaguicidas organoclorados [3].

COMPUESTOS	t_{1/2} AIRE	t_{1/2} AGUA	t_{1/2} SUELO
Heptacloro	No hay datos	< 1 día	0,91 - 3,2 años
Hexaclorobenceno	<4,3 años	> 100 años	3 - 22 años
Aldrín	< 9,1 horas	< 590 días	4 - 7 años
DDT	2 días	> 1 año	10 - 15 años
Dieldrín	<40,5 horas	> 2 años	4 - 7 años
Endrin	1,45 horas	> 112 días	> 12 años

t_{1/2} = tiempo de vida media

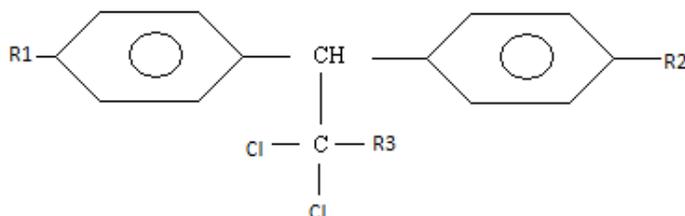
1.1. Propiedades Físicoquímicas

Los OCPs tienen variadas estructuras moleculares pero presentan en común las siguientes características [4]:

- a. Son hidrocarburos cíclicos de origen sintético;
- b. Son de amplio espectro;
- c. Son muy estables en diferentes ecosistemas (Tabla 1), por su poca degradabilidad, debida a que el átomo de cloro sustituyente en la molécula es relativamente no reactivo;
- d. Tiene altos coeficientes de partición y por lo tanto, van a acumularse en ambientes hidrofóbicos tales como materia orgánica del suelo o depósitos grasos de los organismos. Esta característica es debida a que el enlace C-Cl es no polar. Además sufren procesos de biomagnificación a través de las cadenas tróficas por lo cual se cree que sean más tóxicas a largo plazo;
- e. Presentan una movilidad elevada ya que estos compuestos se adhieren a partículas de polvo y al agua, transportándose así alrededor del mundo;
- f. Son neurotóxicos para el hombre y demás vertebrados;
- g. Están clasificados entre los plaguicidas de mediana a baja toxicidad aguda;
- h. Pueden producir efectos a largo plazo como:
 - I. Neuropatías;
 - II. Cáncer;
 - III. Inducción enzimática;
 - IV. Mutagénesis y teratogénesis.

Desde el punto de vista químico, pueden considerarse cuatro estructuras fundamentales en esta clase de insecticidas [4]:

a) Derivados de difenildicloroetano



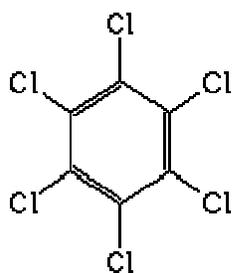
El difenildicloroetano puede presentar los siguientes derivados, enumerados en la tabla 2, de acuerdo con los radicales sustituyentes:

Tabla 2. Derivados del difenildicloroetano de acuerdo con los radicales sustituyentes [4].

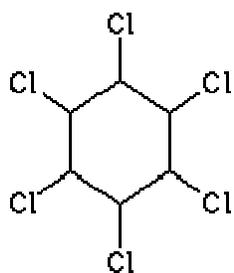
R1	R2	R3	Compuesto
- Cl	- Cl	- Cl	DDT
- Cl	- Cl	- H	DDD
- OCH3	- OCH3	- Cl	Metoxicloro

b) Derivados del ciclohexano

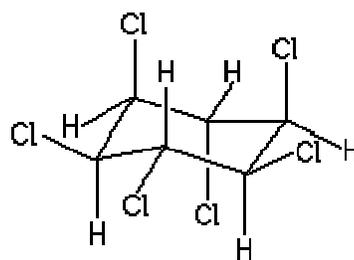
1. Hexaclorobenceno (HCB);
2. Hexaclorociclohexano (HCH);
3. Lindano (gama - HCH).



c) HCB (C₆Cl₆) *

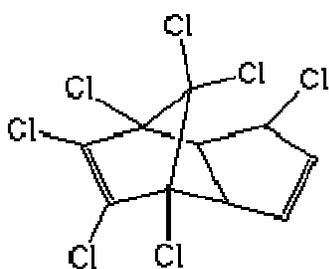


is ciclod HCH (C₆H₆Cl₆) * os

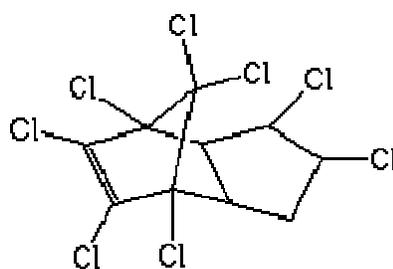


Gama - HCH (C₆H₆Cl₆) *

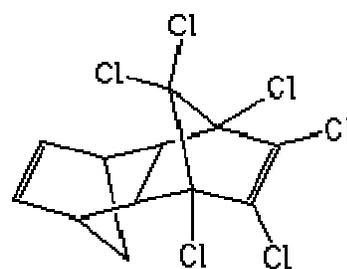
Gran parte de estos compuestos tienen estructuras heterocíclicas como: aldrín, endrín, dieldrín, heptacloro, clordano, mirex y endosulfán.



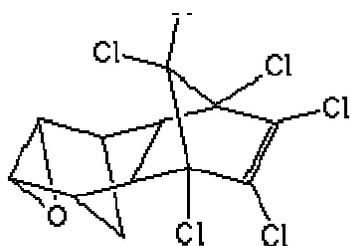
Heptacloro ($C_{10}H_5Cl_7$) *



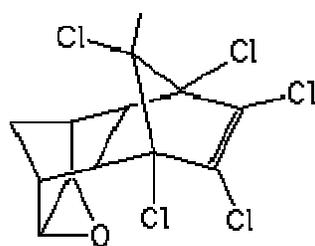
Clordano ($C_{10}H_6Cl_8$) *



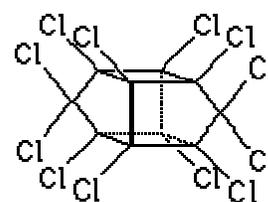
Aldrín ($C_{12}H_8Cl_6$) *



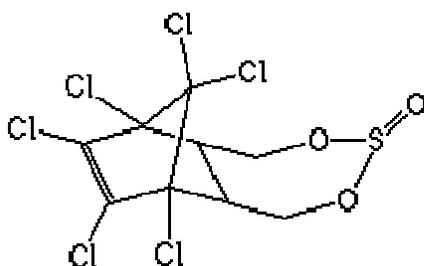
Dieldrín ($C_{12}H_8Cl_6O$) *



Endrín ($C_{12}H_8Cl_6O$) *



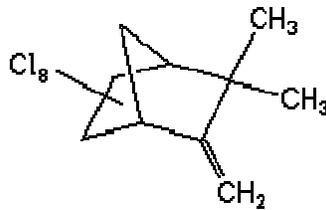
Mirex ($C_{10}Cl_{12}$) *



Endosulfán ($C_9H_6Cl_6O_3S$) *

d) Derivados de los terpenos policlorados

- Toxafeno (camfenoclorados).



Toxafeno (C₁₀H₁₀Cl₈) *

* - Fuente : 5

1.2. Toxicocinética

1.2.1. Exposición

Los plaguicidas organoclorados son ampliamente utilizados en la agricultura, en la silvicultura, en la protección de construcciones y en el control de insectos [6].

Existen diversos tipos de exposición humana a los plaguicidas. [3]:

- 1) La exposición aguda a altas dosis, que ocurre cuando hay accidentes o por la ingestión de alimentos altamente contaminados (como sucedió en la Bahía de Minamata, Japón, por la contaminación con metilmercurio; en Seveso, Italia, por la generación de dioxinas de un accidente en una planta de plaguicidas);
- 2) La exposición crónica de nivel medio, que está asociada con exposiciones laborales o con el consumo de alimentos contaminados;
- 3) La exposición crónica de bajo nivel, la cual está relacionada con la exposición a los niveles existentes en el ambiente.

1.2.2. Vías de exposición

La exposición a los plaguicidas puede suceder a través de diversas vías. Las más comunes son: la inhalatoria, la cutánea y la digestiva [7; 8]. Otras no tan comunes pueden en ocasiones ser trascendentes, tal es el caso de la vía transplacentaria o a través de la leche materna [8].

1.2.3. Distribución en el organismo

Una vez que los plaguicidas organoclorados son incorporados al organismo humano, llegan a la circulación sistémica y se almacenan en el tejido graso donde suelen ser inactivos. Cuando la nutrición es deficiente o de relativa inanición, los depósitos adiposos se movilizan y los OCPs se liberan, pasando a la sangre, con posibilidad de producir efectos tóxicos si la concentración alcanza un nivel suficientemente elevado [9, 10].

La mayoría de las moléculas tóxicas no suele estar en la sangre disueltas en el plasma, sino que se une en forma reversible (o irreversible, dependiendo de la intensidad de fijación, del tipo de enlace físico-químico) a las proteínas plasmáticas en particular la albúmina, ya que ésta posee un número considerable de sitios de unión y una gran cantidad de sustancias pueden fijarse a ella [4; 8].

1.2.4. Biotransformación

La biotransformación de un tóxico, puede presentar varias consecuencias: a) favorecimiento de la eliminación de los agentes tóxicos por la producción de compuestos más polares y así su eliminación a través de la orina, b) transformación de los tóxicos en compuestos de mayor o de menor toxicidad (caso más frecuente) y c) agotamiento o pérdidas de enzimas necesarias para el metabolismo celular normal.

En el caso de los plaguicidas organoclorados, son biotransformados a nivel hepático, y son almacenados en el tejido adiposo. Sufren un proceso de decloración, solamente una fracción es oxidada y transformada en derivados hidrosolubles, para ser excretados por el riñón muy lentamente [4].

En el caso de la biotransformación del DDT, éste compuesto pierde un átomo de cloro para transformarse en DDE. El DDT y el DDE son almacenados en el tejido adiposo. Una pequeña parte es oxidada y transformada en un derivado hidrosoluble del ácido acético: el DDA, que es excretado por el riñón. Respecto al metabolismo del heptacloro, éste es rápidamente transformado en el organismo por oxidación a su epóxido, el cual es depositado en el tejido graso, permaneciendo estable por varios meses. El aldrín es metabolizado por las enzimas microsomales hepáticas a su correspondiente epóxido (dieldrín) bastante liposoluble. El lindano se metaboliza por progresiva decloración,

conjugación glutatiónica, hidroxilación y se excreta en la orina en forma de triclorofenoles [4].

Uno de los factores que influyen en la biotransformación de los tóxicos es la inducción e inhibición de enzimas. Las sustancias químicas con capacidad de aumentar la actividad de los sistemas enzimáticos metabolizantes se han denominado “inductores” de enzimas. La inducción tiene doble importancia. Si el metabolismo lleva a la formación de metabolitos excretables o atóxicos, la inducción realizará la detoxificación y la excreción del compuesto. Sin embargo, si el metabolismo lleva a la formación de un metabolito más tóxico, la inducción aumentará la toxicidad del compuesto. Algunos OCPs son considerados inductores enzimáticos como es el caso del clordecone, lindano y DDT [4]. Diversos tóxicos pueden, sin embargo, competir con el sistema microsomal llegando a causar la inhibición de otros compuestos. La inhibición enzimática puede también causar un incremento o un decremento de la toxicidad. Otros factores como la edad y desarrollo, sexo, embarazo y hormonas [8] y los estados de desnutrición influyen también en la biotransformación de los tóxicos [4].

1.2.5. Excreción

La ruta más importante de excreción de las sustancias tóxicas o de sus productos de biotransformación es el riñón [8]. Otras rutas son la bilis, el aire espirado, sudor, saliva, leche y la secreción gastrointestinal. En el caso de la leche, es una ruta de excreción de particular importancia debido a su posterior consumo por los seres humanos. [4].

1.3. Efectos de los plaguicidas organoclorados en el hombre

Innumerables estudios reportan que los plaguicidas organoclorados pueden causar toxicidad crónica, incluso si la dosis de exposición es relativamente baja [8]. Estos contaminantes, provocan efectos estrogénicos o anti-estrogénicos y son considerados como disruptores endocrinos [9, 10]. Muchos plaguicidas organoclorados pueden causar linfoma no – Hodgkin (LNH) en adultos y niños, así como también pueden causar hepatotoxicidad, inmunotoxicidad, anormalidades en el desarrollo y efectos neuroconductuales. Los efectos adversos de estas sustancias son más negativos para el desarrollo fetal que para los adultos, pues los fetos humanos y los infantes son significativamente más sensibles a los contaminantes ambientales que los adultos [10],

debido a su crecimiento dinámico y a sus procesos de desarrollo [6]. En los neonatos, especialmente en los prematuros, los sistemas enzimáticos son deficientes. Así la ingesta de contaminantes conlleva a la toxicidad, pues no podrán activarse rápidamente [4].

En los seres humanos los plaguicidas (principalmente DDT y lindano) provocan efectos de tipo cutáneos caracterizados por reacciones alérgicas y exantemas. Todos los OCPs producen alteraciones metabólicas con frecuencia, al desencadenar la formación de enzimas y cloracné; asimismo tienen efectos neurológicos que abarcan lesiones del sistema nervioso central [2]. El endosulfán altera las concentraciones de sodio y potasio y disminuye los niveles de calcio y magnesio en el plasma sanguíneo. En el caso de la exposición a HCH, esto puede desencadenar una enfermedad llamada porfirina. Por otro lado se reporta que el DDT y metabolitos, como el 4,4'-DDT, 4,4'-DDE, tienen efectos estrogénicos. El heptacloro aumenta el riesgo de leucemia y desórdenes en el hígado en niños expuestos a este plaguicida presente en la leche [2].

De igual forma, además del tejido adiposo, se han reportado OCPs en el suero y en la leche materna. Un área de preocupación relacionada con la persistencia de plaguicidas en el cuerpo humano ha sido la transferencia de OCPs al feto a través de la placenta y de la leche materna. Los plaguicidas organoclorados se transfieren desde el tejido graso a la grasa de la leche durante la lactancia y las concentraciones determinadas en los recién nacidos son comparables con las evaluadas en el medio. Estos insecticidas también pueden trascolarse al feto por medio del cordón umbilical. El heptacloro ocasiona nacimientos prematuros y que los recién nacidos tengan un peso bajo y un desarrollo cerebral atrasado e incluso tiene potencial teratogénico. La presencia de compuestos como el DDT o sus metabolitos en altas concentraciones en la sangre de una mujer embarazada puede aumentar el metabolismo del estrógeno y la progesterona, lo que puede provocar un aborto [2].

Los niveles de plaguicidas organoclorados así como los de otros contaminantes en el cuerpo humano son influenciados por varios factores como por ejemplo la edad, hábito de fumar, número de embarazos, la ingesta de alimentos contaminados [7,11], duración de la lactancia y área de residencia [11]. Muchos de los factores biológicos mencionados están relacionados entre sí y es por lo tanto, complicado pronosticar la influencia de un solo factor en la acumulación de contaminantes en el cuerpo humano [7].

1.4. Exposición de lactantes

La leche materna es la más importante fuente de nutrientes (proteínas, carbohidratos, grasas y vitaminas), factores inmunológicos y otros constituyentes importantes relacionados con las respuestas del sistema inmunitario, para los bebés [12]. Desafortunadamente, este alimento no está libre de contaminantes, siendo una de las principales vías de excreción de plaguicidas organoclorados del cuerpo de las madres [13] y al mismo tiempo la principal fuente de exposición a estos contaminantes por los bebés [14]. La leche materna es una ventajosa matriz para determinar los niveles de contaminantes en el cuerpo humano pues es una matriz no invasiva y de bajo costo [11]. Este tipo de monitorización ha recibido cada vez más atención en las últimas décadas ya que proporciona información simultánea de la carga corporal de contaminante de las mujeres en edad reproductiva así como de la exposición del lactante [9, 11, 15, 16].

2. ANTECEDENTES

Como resultado de las innumerables investigaciones sobre los contaminantes orgánicos persistentes, como es el caso de los plaguicidas organoclorados en leche materna en varios países, fue reportada una disminución de los niveles de OCPs en la leche materna, en las últimas décadas, para los países desarrollados. La producción y uso de plaguicidas organoclorados fueron restringidos y prohibidos en Europa y América del Norte durante los años 70s provocando así la disminución mencionada de los niveles de estos compuestos [17]. Por otro lado, en algunos países en vías de desarrollo y países ex soviéticos, los OCPs como el DDT y el hexaclorociclohexano (HCH) aún son utilizados, encontrándose así altos niveles de los mismos en la leche materna [18].

Haraguchi *et al.* (2009) realizaron un estudio con la finalidad de comparar las concentraciones de varios contaminantes (DDT, HCH, HCB, entre otros) presentes en la leche materna de cuatro países asiáticos (Vietnam, China, Corea y Japón). La leche fue obtenida del Banco de Muestras Humanas de la Universidad de Kioto (un total de 134 muestras). En este estudio se concluyó que las tendencias de la contaminación por compuestos orgánicos persistentes son las siguientes: los niveles de DDT aún son altos en madres de China y Vietnam (a pesar de su gradual disminución); β -HCH and HCB predominan en madres chinas [19]. En un estudio publicado en 2011, Fujii *et al.*, reportaron que durante la última década los niveles de Σ DDT en China, Corea y Japón

han ido disminuyendo. Sin embargo, los niveles de Σ DDT en China (Beijing – región norte: 1458 ng/g) son 10 veces mayores que los niveles encontrados en Corea (Busan – región sur: 144 ng/g) y Japón (Takayama – región centro: 110 ng/g; Takarazuka – región centro: 117 ng/g; Sendai – región norte: 134 ng/g) [20]. Por otro lado, Chao *et al.* (2006) encontraron niveles de plaguicidas organoclorados en leche materna de madres del centro de Taiwán (Σ HCH: 3.4 ng/g; Σ Heptacloro: 7.3 ng/g; Σ DDT: 333 ng/g) similares a los niveles obtenidos en países desarrollados y significativamente más bajos a los niveles encontrados en países en vías de desarrollo asiáticos [9]. Otro estudio llevado a cabo en países asiáticos (Japón, China, Filipinas, Vietnam, Camboya, India, Malasia e Indonesia) entre 1999-2003 sugiere que los OCPs como el DDT (niveles entre 190 ng/g, Filipinas y 2100 ng/g, China y Vietnam) y el HCH (niveles entre 4.7ng/g, Vietnam y 1400 ng/g, China) están todavía en uso en estos países, y que las poblaciones residentes están continuamente expuestas a estos contaminantes [18].

Ennaceur *et al.* (2008) corroboraron la presencia de niveles más altos de DDT en países en vías de desarrollo cuando estos niveles se compararon con la presencia de dichos compuestos en países desarrollados. En este estudio fueron encontrados niveles considerables de plaguicidas organoclorados y otros contaminantes en leche materna en Tunisia. Todas las madres donantes eran no fumadoras y no contactaban directamente con OCPs. Las concentraciones de DDT cuantificadas están comprendidas entre 180 ng/g (en la región de Kasserine) y 9353 ng/g (en la región de Monastir). Las concentraciones de HCB se sitúan entre 0.38 ng/g (en la región de Tunis) y 294 ng/g (en la región de Bizerte). Por último, los niveles de HCH presentan valores entre 31.6 (en la región de Mahdia) y 88 ng/g (en la región de Monastir) [21].

De un estudio llevado a cabo en la República de Buriatia, Russia, Tsydenova *et al.* (2007) concluyeron que las personas de esta región están expuestas a niveles relativamente altos de varios contaminantes incluyendo plaguicidas organoclorados. Los compuestos más detectados en las muestras de leche materna analizadas fueron: HCH (810-1000 ng/g), DDT (580- 660 ng/g), PCB (160-240 ng/g) y HCB (100-130 ng/g) [22].

Mueller *et al.* (2008) realizaron un estudio para determinar los niveles de plaguicidas organoclorados persistentes en leche materna de mujeres australianas. De los resultados obtenidos, éstos autores concluyeron que durante los últimos 35 años la concentración media de DDT disminuyó a la mitad cada intervalo de 7.5-8.5 años. Esta disminución de

los niveles de DDT en la leche materna fue más rápida en los primeros 20 años y se ha frenado desde los 90s. Se espera que las concentraciones encontradas sigan disminuyendo con el pasar del tiempo aunque a un ritmo lento [23].

Kumar *et al.* (2006) publicaron un estudio donde reportaron los niveles de DDT y HCH en leche materna de una población de la región de Agra, India. Estos autores concluyeron que concentraciones considerables de DDT y HCH eran transferidas de las madres para los bebés, por lo cual se reforzó la necesidad de replantear las políticas de uso de estos contaminantes [24].

Yu *et al.* (2007) compararon los niveles de compuestos organoclorados en calostro y leche madura en madres de Eslovaquia y evaluaron si la diferencia entre la concentración de grasa de ambas leches influía en la cuantificación de estos contaminantes. Estos autores concluyeron que la mayoría de los plaguicidas organoclorados presentaban niveles más altos en calostro que en leche madura, indicando que existe una ligera reducción de los mismos en la carga corporal de la madre durante los primeros 10 días de lactancia. Sin embargo, y a pesar de la baja concentración de lípidos en el calostro, esta diferencia no es estadísticamente significativa pudiendo considerarse similares los valores encontrados. El plaguicida organoclorado que presentaba la más alta concentración fue el 4,4'-DDE [25].

Abballe *et al.* (2008), llevaron a cabo un estudio para evaluar la exposición a los contaminantes orgánicos persistentes, de infantes lactantes en Italia. En este estudio se concluyó que las concentraciones encontradas de estas sustancias en la leche materna estaban en el intervalo de valores observados en la última década en otros países europeos, el 4,4'-DDE presentó la concentración más alta [15]. Otros autores que evaluaron la concentración de contaminantes orgánicos persistentes en países europeos, incluyendo OCPs, particularmente en Noruega y Alemania, concluyeron también que los niveles de concentraciones determinadas se encontraban en el intervalo de valores observados para la mayoría de los países europeos [11, 26].

En un estudio realizado en leche materna de madres residentes cerca del río Madeira, en Amazonia, Brasil, Azeredo *et al.* (2008) reportaron la significativa exposición de esta población al plaguicida DDT y sus metabolitos, sobretodo asociada al consumo de

pescado contaminado con este compuesto. La presencia de estos contaminantes en este río se debe a su utilización para el control de enfermedades como la malaria [12].

En Venezuela, Brunetto *et al.* (1996), evaluaron los niveles de residuos de DDT en leche materna de madres residentes en varias poblaciones rurales, de un estado (Yaracuy) con considerable actividad agrícola y donde los plaguicidas son aplicados por vía aérea. Todas las participantes presentaron niveles de DDT en el intervalo de 5.1 a 68.2 µg/l y se concluyó que el grupo de mujeres en estudio no reflejaba exposición a altos niveles de DDT. Los autores afirman que los datos son consistentes con el hecho de que la exposición general de la población al DDT es resultado de un bajo nivel de contaminación. La fuente más común de exposición a estos contaminantes es a través de la comida contaminada [27].

La presencia de plaguicidas organoclorados en México se ha referido por algunos autores, tanto en leche materna [28, 29] como en tejidos humanos [30] y productos de origen animal [31, 32]. El uso del DDT en México está restringido y se limita a las campañas contra la malaria desde 1990, aún así es el país de América Latina que utiliza más toneladas al año [33]. Durante 1993-1994 aproximadamente 2700 toneladas de DDT fueron aplicadas para el control de los mosquitos vectores del paludismo [32]. Waliszewski *et al.* (1996) reportaron concentraciones promedio de DDT de 11000 µg/kg en mujeres del área de Veracruz, sugiriendo que se continuara con la monitorización en esta área [28].

Prado *et al.* (2004), investigaron el contenido de plaguicidas organoclorados en leche de madres lactantes de áreas urbanas y suburbanas de la Ciudad de México entre los años 1997 y 1999. Estos autores observaron que los niveles de residuos en las muestras de leche humana, provenientes de una zona urbana de esta ciudad indicaban una contaminación definitivamente superior a lo encontrado en muestras provenientes de una zona sub-urbana de la misma. Los valores promedios más objetables se presentaron en los residuos de aldrín + dieldrín, y (α+β)- HCH, con niveles de 13,6 y 10,7 veces superior a lo estipulado respectivamente como Límite Máximo de Residuo (LMR), según FAO/OMS. En el área suburbana muestreada se encontraron valores promedios inferiores a los niveles LMR, para los residuos de aldrín + dieldrín (0,06 µg/g), DDT y metabolitos (0,83µg/g). Sin embargo, se presentó igualmente una alta contaminación con (α+β)-HCH, con un nivel 5,7 veces superior al valor LMR permisible [29].

La exposición a sustancias tóxicas, como los OCPs, dependen de varios factores, como por ejemplo factores biológicos y ambientales. Así mismo, las características físico-químicas de los compuestos, la concentración, el tiempo y el modo de exposición son determinantes para la actividad tóxica del contaminante [34].

Relativamente a factores biológicos que pueden influir en la exposición de las madres lactantes a plaguicidas organoclorados, afectando así la exposición de los bebés a estos compuestos a través de la ingesta de la leche materna, se nombran algunos como:

- a) **Edad** – es considerado como uno de los factores que más contribuye para la presencia de residuos de plaguicidas organoclorados en leche materna. Debido a la naturaleza lipofílica y a la persistencia de los referidos plaguicidas en el ambiente, estos presentan un potencial considerable para acumular en el cuerpo humano (materia grasa) [35]. Como la lactancia es una de las vías más importantes de excreción de plaguicidas organoclorados del cuerpo de las mujeres lactantes [24], se observa que los niveles de estos en la leche materna aumentan con la edad de las madres lactantes primíparas [7, 9, 10, 21, 35].
- b) **Número de partos** – se espera que cuanto mayor el número de lactancias menor deberá ser la cantidad de plaguicidas organoclorados excretados, pues los niveles de estos contaminantes acumulados en el cuerpo de las madres se va disminuyendo (considerando que no hay una exposición adicional entre embarazos). Esta correlación ha sido mencionada en algunos estudios [7, 19, 36].
- c) **Duración de los anteriores periodos de lactancia (en caso de que se aplique)** – este factor presenta la misma correlación negativa con los niveles de OCPs en la leche materna, que el factor *número de partos*, por la misma razón. Cuanto más largo es un periodo de lactancia mayor será la excreción de estos plaguicidas y por consiguiente menor serán los niveles de OCPs excretados en lactancias posteriores (considerando que no hay una exposición adicional a estos contaminantes) [36].
- d) **Factores relacionados con el comportamiento (como por ejemplo el hábito de fumar, beber y consumir drogas)** – El hábito de fumar está asociado a un aumento de los niveles de OCPs en leche materna. Estos plaguicidas fueron muy utilizados en áreas de cultivo de tabaco y la monitorización de los residuos de

estos contaminantes, en este producto, fue escasa [35]. Por otra parte, los hábitos de fumar, beber y consumir drogas afectan la respuesta del cuerpo humano a los contaminantes ambientales. Por lo tanto, un fumador puede estar en mayor riesgo que un no fumador, cuando está expuesto a un estrés ambiental adicional. Con respecto al consumo excesivo de alcohol, se pueden observar trastornos a nivel del cerebro y del hígado [34].

- e) **Peso/ Índice de Massa Corporal (BMI)** – se han reportado niveles de plaguicidas excretados más bajos en mujeres con sobrepeso do que en mujeres delgadas (en las mismas condiciones de exposición). Se menciona como causa el efecto de dilución en el caso de las mujeres con sobrepeso [35].

Hay varios factores ambientales que pueden afectar la exposición de las madres lactantes y sus bebés a plaguicidas organoclorados, entre ellos: la temperatura, la humedad, la precipitación, la velocidad y dirección de los vientos, la variación de las condiciones diurnas y estacionales, las características geomorfológicas, la flora y fauna, entre otros. Estos factores están profundamente relacionados con las características físico-químicas de los plaguicidas organoclorados, como por ejemplo: solubilidad en agua, presión de vapor, constante de la Ley de Henry, coeficiente de partición de carbono orgánico, coeficiente de partición octanol/agua, factor de bioconcentración, velocidad de transformación y de degradación, entre otros [37].

Algunos de los factores ambientales que pueden influir en la exposición a OCPs son discutidos en seguida:

- a) **Tasa de precipitación** – la información sobre este factor puede ser muy útil para la determinación de la cantidad de arrastre de suelo por corrientes superficiales, para el conocimiento de los promedios de recarga de acuífero y el contenido de humedad en suelos. Una elevada tasa de precipitación ocasionará una importante migración de contaminantes hidrosolubles además de que remueve a las partículas y vapores de la atmósfera [37].
- b) **Temperatura** – este factor afecta el índice de volatilidad de los contaminantes. El aumento de la temperatura provoca un aumento del índice de volatilidad de un contaminante. Aunado a esto, la temperatura terrestre afecta también al movimiento de los contaminantes, por ejemplo, una zona fría o congelada retarda

el movimiento [37]. El aumento del índice de volatilidad de un contaminante potencia la absorción de éste a través de las vías respiratorias (con el aumento de la volatilidad, la probabilidad de contacto entre el contaminante presente en el aire ambiental y las vías respiratorias es mayor) y a través de la piel (la absorción de los tóxicos aumenta con el incremento de la temperatura cutánea) [10].

- c) **Velocidad y dirección de los vientos** – influyen en el índice de generación de polvos fugitivos. Durante los períodos de estabilidad atmosférica, la sedimentación gravitacional actuará para redepositar las partículas o gotas suspendidas [37].
- d) **Condiciones diurnas y estacionales** – pueden ser un factor importante para alterar las tasas de migración de los contaminantes en lugares donde los promedios de precipitación o temperatura varían mucho en las diferentes épocas del año o a lo largo del día [37].
- e) **Características geomorfológicas** – estas características pueden jugar un papel muy importante en la velocidad de las corrientes de agua, el volumen y el índice del velocidad de corrientes superficiales, promedios de erosión y características del suelo [37]. Características como la altitud son también importantes en la medida en que están profundamente relacionadas con las condiciones climáticas y de presión atmosférica.

Se nombran algunas de las características físico-químicas más importantes de los contaminantes que interfieren en la exposición de las madres y consecuentemente de los lactantes a estos compuestos:

- a) **Solubilidad en agua**– los agentes químicos muy solubles en agua se adsorben con baja afinidad a los suelos y por lo tanto, son rápidamente transportados desde el suelo contaminado hasta los cuerpos de agua superficial y subterránea, al contrario de los agentes químicos poco solubles en agua. La solubilidad puede variar con la temperatura y con el pH y afecta la volatilidad de los contaminantes [37].
- b) **Presión de vapor** – es una medida de la volatilidad de un agente químico en estado puro y es un determinante importante de la velocidad de volatilización al aire desde suelos o cuerpos de agua superficialmente contaminados. Este factor

es condicionado por la temperatura, velocidad del viento, características de adsorción del contaminante y la solubilidad en agua del compuesto [37].

- c) **Constante de la Ley de Henry (H)** – esta toma en cuenta el peso molecular, la solubilidad y la presión de vapor y indica el grado de volatilidad de un químico en una solución. Cuando la presión de vapor es relativamente alta con respecto a su solubilidad en agua, la constante de la ley de Henry también es alta y el químico se evaporará preferentemente al aire. Un alto valor para la constante de la ley de Henry de un contaminante podría sugerir que la inhalación sería la vía de exposición [37].
- d) **Coefficiente de Partición Octanol/Agua (Kow)** – este coeficiente predice el potencial del agente químico para acumularse en la grasa animal. Cuanto más alto sea el valor de Kow de un contaminante mayor será la tendencia de que este se acumule en los organismos. Este factor está directamente relacionado con la tendencia a bioconcentrarse en la biota y esta inversamente relacionado con la solubilidad en agua [37].
- e) **Factor de bioconcentración (FBC)** – es una medida de la magnitud de la distribución química al equilibrio entre un medio biológico. En general, los compuestos que tienen un alto valor de Kow tienen un alto FBC [37].
- f) **Velocidad de transformación y de degradación** – este factor toma en cuenta los cambios físicos, químicos y biológicos de un contaminante a través del tiempo [37].

Otros factores externos como la dieta, local de residencia y ocupación pueden también influir en la exposición a OCPs. Madres que viven en zonas donde son aplicados plaguicidas organoclorados (por ejemplo, aplicaciones en las habitaciones, para control de los vectores de paludismo, o aplicaciones a nivel agrícola) o zonas muy contaminadas pueden presentar mayores concentraciones de estos contaminantes en la leche [38]. La ocupación también es un factor importante pues el trabajo directo con plaguicidas aumenta considerablemente la probabilidad de contaminación por estos compuestos [35]. Otra fuente de contaminación por plaguicidas organoclorados, muy común para la población en general, son los alimentos, particularmente la carne, alimentos provenientes del mar y los productos lácteos [6]. De acuerdo con Chao *et al.* (2006), madres que

comen pescado más de una vez a la semana presentaron niveles significantes de algunos OCPs. Por otro lado, madres que adoptan una dieta abundante en vegetales presentaron niveles más bajos de OCPs en la leche, cuando comparadas con madres cuya dieta es menos abundante en estos alimentos [9]. Alimentos ricos en grasa, como la leche y sus derivados, han sido también mencionados como productos alimentares que presenten niveles altos de plaguicidas organoclorados [31, 32].

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

A pesar de que el uso y la producción de contaminantes orgánicos persistentes, como es el caso de los plaguicidas organoclorados, ha sido regulado en todo el mundo de acuerdo con la Convención de Estocolmo en 2001, estos compuestos siguen planteando amenazas ambientales graves para la vida silvestre y para los seres humanos [21].

De lo anterior se destaca, que es muy importante la monitorización de zonas donde todavía se siguen utilizando contaminantes como el DDT (ejemplo Veracruz) pues estas poblaciones están expuestas a dosis elevadas de estos contaminantes. Sin embargo, la monitorización de zonas donde ya no es permitido el uso de estos compuestos (ejemplo Estado de México), es igualmente importante, ya que estas sustancias se siguen infiltrando en la cadena trófica durante años, debido a su persistencia en suelos y organismos vivos. Por lo tanto, del análisis de estos estudios llevados a cabo en todo el mundo y en particular en México, se puede concluir, que es recomendable la continua vigilancia de estos plaguicidas organoclorados para tomar acciones de protección y prevención hacia la población y en especial hacia las madres lactantes y sus bebés.

4. HIPÓTESIS

Factores como la edad, peso, número de hijos, ocupación y hábitos alimenticios de las madres y las condiciones ambientales como temperatura, altitud, entre otros, influyen en los niveles de exposición de lactantes a plaguicidas organoclorados.

5. OBJETIVO GENERAL

Evaluar los factores biológicos y ambientales que influyen en la exposición de lactantes a plaguicidas organoclorados, a través de la ingesta de leche materna.

5.1. Objetivos específicos

- 1) Definir y caracterizar la población en estudio.
- 2) Estimar el consumo de OCPs en el Estado de México y en el Estado de Veracruz.
- 3) Desarrollar y validar la metodología analítica que se usará para la determinación de los niveles de plaguicidas organoclorados en las muestras de leche materna.
- 4) Evaluar la influencia de los factores ambientales y biológicos, en los niveles de exposición de los lactantes.
- 5) Evaluar la exposición de los bebés a plaguicidas organoclorados por ingesta de leche materna.
- 6) Asociar con el riesgo a su salud.
- 7) Elaborar las recomendaciones o estrategias que apoyen a proteger a las poblaciones afectadas.

6. METODOLOGÍA

6.1. Población en estudio:

Se trabajó con dos poblaciones: una población procedente de Veracruz en donde se han hecho aplicaciones de DDT para el control del paludismo [31] y otra población procedente del Estado de México donde se podrían haber usado en la agricultura y donde pueden ser producidos accidentalmente por la industria. Los contaminantes orgánicos persistentes como es el caso de los OCPs producidos no intencionalmente pueden tener origen en: incineradores de desechos, desechos peligrosos procedentes de la combustión en hornos de cemento, producción de pasta de papel utilizando cloro elemental o productos químicos que producen cloro elemental para el blanqueo, industria metalúrgica, entre otros [39].

Para la determinación de los niveles de OCPs en la leche materna de voluntarias del Estado de México y del Estado de Veracruz se realizaron los siguientes pasos:

- a) Se eligieron las zonas de cada uno de los dos estados mencionados, donde se hizo la colecta de muestras
- b) Se realizó la gestión ante las autoridades competentes para contar con el acceso a la población y obtener el consentimiento informado para dar a conocer a las madres voluntarias el propósito de la investigación, los procedimientos que se

usaron, los riesgos y/o beneficios que pudieran resultar de la investigación, el compromiso de privacidad y anonimato, entre otra información.

- c) Se tomaron las muestras de leche materna de las voluntarias.
- d) Se les aplicó un cuestionario, para conocer: edad, número de embarazos, número de lactancias y su duración, hábitos alimenticios, ocupación, residencia, medidas antropométricas del lactante, cantidad de leche consumida y frecuencia, entre otra información que junto con las medidas antropométricas de la madre ayudaron a evaluar los factores que influyen en la exposición a OCPs.
- e) Se analizaron las muestras de leche para determinar los niveles de OCPs.

6.2. Estimación del consumo de plaguicidas OC en el Estado de México y en el Estado de Veracruz.

Para identificar el grado de uso de los plaguicidas organoclorados en ambos estados, se consultó la información disponible a nivel de la legislación vigente, así como de productos y cantidades usadas. De entre los plaguicidas autorizados en México, se supone que los compuestos que efectivamente se usan en cada estado pueden variar, de acuerdo con sus condiciones climáticas, con sus producciones agrícolas, entre otros factores. Seguidamente, se nombran algunos de los organismos que se consultaron para la obtención de la información mencionada:

1. **COFEPRIS** – Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios (<http://www.cofepris.gob.mx/>);
2. **SAGARPA** – Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo rural, Pesca y Alimentación (<http://www.sagarpa.gob.mx/Paginas/default.aspx>) ;
3. **SEMARNAT** - Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales (<http://www.semarnat.gob.mx/Pages/Inicio.aspx>) ;
4. **AMIFAC** - Asociación Mexicana de la Industria Fitosanitaria, A.C. (<http://www.amifac.org.mx/>);
5. **SENASICA** – Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (<http://www.senasica.gob.mx/>);
6. **PROFEPA** – Procuraduría Federal de Protección al Ambiente (<http://www.profepa.gob.mx/>);
7. **CICOPLAFEST** - Comisión Intersecretarial para el Control del Proceso y Uso de Plaguicidas, Fertilizantes y Sustancias Tóxicas (CICOPLAFEST), en la que toman

parte las Secretarías de Salud (a través de la Comisión Federal de Protección Contra Riesgos Sanitarios: COFEPRIS), Medio Ambiente y Recursos Naturales (Semarnat), Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (Sagarpa) y de Economía.

8. Normas emitidas por la Secretaría de Salud (<http://portal.salud.gob.mx/>);
9. **INE** – Instituto Nacional de Ecología (<http://www.ine.gob.mx/>);
10. **INEGI** – Instituto Nacional de Estadística y Geografía (<http://www.inegi.org.mx/>).

6.3. Desarrollo y validación de la metodología analítica para la determinación de los niveles de plaguicidas organoclorados en las muestras de leche materna.

De acuerdo con la bibliografía consultada, las técnicas más usadas para la extracción de plaguicidas organoclorados son todavía las técnicas tradicionales como es el caso de la extracción en fase sólida [31] y la extracción líquido-líquido [14; 20; 22]. Sin embargo estos procedimientos consumen mucho tiempo, mano de obra, son muchas veces complicados, pueden ser caros y producen considerables cantidades de residuos [40]. La tendencia de los últimos años se ha dirigido hacia el desarrollo de procedimientos que necesitan reducidos volúmenes de muestra, que permiten la obtención de una mayor especificidad, mayor selectividad en la extracción, el aumento de potencial para automatización o métodos en línea que reducen las operaciones manuales, y un enfoque más respetuoso con el medio ambiente (química verde), con menor producción de residuos y uso de pequeños volúmenes o sin disolventes orgánicos [41]. A pesar de que las técnicas convencionales son todavía usadas para la extracción de OCPs en leche, han sido propuestas nuevas alternativas como es el caso de la dispersión de matriz en fase sólida (MSPD) [42], método QuEChERS (quick, easy, cheap, effective, rugged and safe) [40, 43], extracción con líquido presurizado (PLE) [44] y microextracción en fase sólida (SPME) [45].

En el presente estudio se seleccionó la microextracción en fase sólida como técnica de extracción por ser una técnica alternativa libre de solventes, con una reducida producción de residuos y un reducido tiempo de preparación de la muestra. Este procedimiento permite también la obtención de límites de detección bajos y una buena reproducibilidad. Muy importante también en la selección de la técnica a usar son las condiciones de

laboratorio y equipos disponibles que en este caso permitieron el desarrollo de extracción por SMPE [46].

De acuerdo con la bibliografía consultada, la cromatografía de gases (GC) es una de las técnicas de análisis más empleadas para la cuantificación de plaguicidas organoclorados en leches [7, 10, 16, 22-24, 28] acoplada frecuentemente a la detección por captura de electrones (ECD) [11, 22, 24, 28] o a la detección por espectrometría de masas (MS) [7, 10, 16].

La metodología que se desarrolló consistió en:

- a) Método de extracción: SPME, basada en un método de SPME ya reportado al cuál se hicieron algunas modificaciones [47];
- b) Método de análisis: cromatografía de gases (GC);
- c) Método de detección: espectrometría de masas (MS).

Para la validación de la metodología se consideraron parámetros como adecuabilidad del sistema, linealidad, repetitividad, precisión intermedia, exactitud, límites de detección y de cuantificación.

6.3.1. Soluciones y reactivos

Los estándares analíticos de los plaguicidas organoclorados usados para el desarrollo y validación de la metodología que se presenta fueron suministrados por Chem Service (West Chester, United States of America): Aldrín (100 mg/L, solución en metanol), dieldrín (100 mg/L, solución en metanol), 4,4' – DDT (98.2%); y por Sigma Aldrich (Steinheim, Germany): 2,4-DDD (99.0%), 4,4-DDE (99.8%), HCB (99.0%), y lindano (99.0%). Las soluciones madre individuales (concentraciones entre 142.6 – 190.9 mg/L) fueron preparadas en metanol (grado HPLC), suministrado por Fermont (Monterrey, Mexico), y almacenado bajo refrigeración (-5 °C). La solución madre que contenía la mezcla de todos los plaguicidas (10.00 mg/L aldrín, 10.00 mg/L dieldrín, 20.24 mg/L 2,4' – DDD, 20.12 mg/L 4,4' – DDE, 22.91 mg/L 4,4' – DDT, 19.96 mg/L HCB, 20.91 mg/L lindano) también fue preparada en metanol, semanalmente y almacenada bajo refrigeración (2 – 6 °C). Las soluciones de calibración con ajuste matricial (cinco niveles de concentraciones) fueron preparadas en leche de vaca comercial, analizado previamente para confirmar la ausencia de los compuestos estudiados. Las muestras de leche fueron fortificadas con diferentes volúmenes de la solución con la mezcla de los OCPs y mantenidas en refrigeración (2 – 6

°C) durante 24 horas. La cuantificación se realizó por calibración externa y los rangos de calibración adoptados para los plaguicidas estudiados se presentan en la Tabla 3.

Tabla 3. Rangos de calibración adoptados para los plaguicidas estudiados.

Plaguicida	Rango de con. (µg/L)
Aldrín	15.63 – 250.00
Dieldrín	31.25 – 500.00
2,4'-DDD	18.97 – 303.53
4,4'-DDE	18.86 – 301.80
4,4'-DDT	42.95 – 687.24
HCB	9.36 – 149.69
Lindano	19.60 – 313.63

6.3.2. Técnica de extracción: SPME

La microextracción en fase sólida se llevó a cabo manualmente. Las fibras de SPME (Supelco, Bellefonte, Estados Unidos de América) fueron acondicionadas de acuerdo a las instrucciones del proveedor. El procedimiento de extracción se llevó a cabo en viales de vidrio transparente de 4 mL (Agilent, Estados Unidos de América). Las muestras de leche de 2 mL fueron extraídas en modo *headspace* con una fibra revestida por 50/30 µm DVB/CAR/PDMS. Las condiciones de extracción fueron: temperatura de extracción de 90°C, con agitación y tiempo de extracción de 45 min.

6.3.3. Método analítico: cromatografía de gases (GC)

Los análisis por cromatografía de gases se llevaron a cabo en un Varian 3900 GC (Varian, Mississauga, ON, Canadá), equipado con un inyector split/splitless. La columna cromatografica usada fue una VF-Xms, 30 x .025 mm ID x 0.25 µm (Varian, Mississauga, ON, Canadá). El gas de arrastre utilizado fue el helio de alta pureza (99.9999%). El inyector fue mantenido a una temperatura fija de 270°C. La desorción de la fibra de SPME se llevó a cabo en el puerto del inyector durante 5 min. El programa de

temperatura del horno usado para los análisis fue el siguiente: temperatura inicial de 100°C durante 1.0 min, elevada a 160°C a una velocidad de 40.0 °C/min. Una vez atingida esta temperatura, se volvió a subir hasta 200°C a una velocidad de 2.0 °C/min. Se mantuvo a esta temperatura por 3 min. Finalmente, se incrementó la temperatura a 260°C a una velocidad de 8.0 °C/min manteniéndose durante 8.0 min.

6.3.4. Método de detección: espectrometría de masas (MS)

Los tiempos de retención para cada plaguicida organoclorado fueron determinados en modo *full scan*. Se usó un espectrómetro de masas con trampa iónica Saturn 2100T (Varian, Mississauga, ON, Canadá) operado en modo de impacto electrónico (1750 V). La trampa, el colector y la línea de transferencia fueron mantenidos a 180, 80 and 300 °C, respectivamente. Los tiempos de retención y los fragmentos que se usaron para la cuantificación de los compuestos se presentan en la Tabla 4. Para la adquisición de los datos y control del equipo se usó el software MS Workstation, versión 6.9.3 (Varian).

Tabla 4. Tiempos de retención y fragmentos MS usados para la cuantificación de los compuestos estudiados.

Plaguicida	Tiempo de retención (min)	Fragmento de cuantificación MS (<i>m/z</i>)
Aldrín	20.40	66, 79, 263
Dieldrín	28.43	79, 263, 279
2,4'-DDD	28.52	165, 235
4,4'-DDE	28.08	176, 246, 318
4,4'-DDT	31.75	165, 235
HCB	11.79	284, 142
Lindano	13.89	109, 181, 219

6.4. Evaluación de la influencia de los factores ambientales y biológicos, en los niveles de exposición de los lactantes.

Para evaluar la influencia de factores biológicos y ambientales en los niveles de exposición a plaguicidas organoclorados determinados en las muestras de leche materna, se analizaron los resultados de las encuestas que se aplicaron a las madres donantes. Se realizó un análisis de correlación para verificar si hay alguna relación con la tendencia presentada en los niveles de OCPs determinados.

6.5. Evaluación de la exposición de los lactantes a plaguicidas organoclorados por ingesta de leche materna.

La evaluación toxicológica incluye elementos como la estimación de exposiciones, comparación de las estimaciones de exposición con las guías de salud, determinación de los efectos en la salud relacionados con la exposición, y evaluación de los factores que influyen en los efectos adversos en la salud.

Para la estimación de la exposición a plaguicidas en leche materna se consideraron factores como la duración y frecuencia de exposición, fluctuación de la exposición y biodisponibilidad. Adaptando el modelo de estimación de la dosis de exposición presentado por la ATSDR (Agency for Toxic Substances and Disease Registry) [37] se pudo estimar la dosis de exposición a través de la siguiente ecuación:

$$DE = \frac{C \times TI \times FE}{PC}$$

Donde:

DE = Dosis de Exposición por ingesta de leche materna;

C = Concentración del contaminante en la leche materna (mg/l);

TI = tasa de ingreso (L/día);

FE = Factor de Exposición (se calcula al multiplicar la frecuencia de exposición por la duración de la misma y dividiendo por el período en el cual la dosis se promedia; no presenta unidades);

PC = Peso Corporal (kg).

6.6. Asociación con el riesgo a su salud.

Estimados los niveles ingeridos, se compararon los resultados obtenidos con los valores de Ingesta Diaria Aceptable, IDA (dosis máxima de un plaguicida que puede ingerirse diariamente sin que ocasione daños detectables durante la vida de un individuo) se determinaron los posibles efectos para la salud y se concluyó sobre los posibles riesgos a la salud de los lactantes.

6.7. Elaboración de las recomendaciones o estrategias que apoyen a la protección de las poblaciones afectadas.

Después de la evaluación de la exposición y de los riesgos a la salud de las poblaciones estudiadas, en especial de los lactantes, se elaboraron las recomendaciones necesarias para mitigar el problema de contaminación en causa.

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Esta sección está dividida en dos partes: resultados y discusión publicados y resultados y discusión no publicados.

7.1. Resultados y discusión publicados

Los resultados y discusión publicados están divididos en dos artículos. El primer artículo que resultó de este trabajo de investigación es un artículo de revisión sobre las metodologías analíticas reportadas para la determinación de plaguicidas organoclorados en leche. Esta publicación sirvió de soporte para la selección de la metodología que se usó en este trabajo para la determinación de los OCPs en la leche materna. Este artículo fue publicado en la revista indizada Chemosphere, cuyo Factor de Impacto es de 3.34 (2015), y tiene como título “Extraction and clean-up methods for organochlorine pesticides determination in milk”. La segunda parte de resultados y discusión publicados se incluyó en un artículo enviado (no publicado todavía) también a la revista Chemosphere. En este artículo se presenta la información relativa a la contaminación de las muestras de leche analizadas, factores que influyeron en esta contaminación e información sobre la exposición de los lactantes a OCPs a través de la ingesta de leche materna contaminada. Tiene como título “Infants’ exposition to organochlorine pesticides through breast milk intake. A case study of two Mexican populations”.

7.1.1. Artículo publicado

7.1.1.1. Carta de aceptación

De: ees.chem.0.204c63.e339eb47@eesmail.elsevier.com [ees.chem.0.204c63.e339eb47@eesmail.elsevier.com] En nombre de Chemosphere [chem-eo@elsevier.com]

Enviado el: miércoles, 03 de abril de 2013 5:11

Para: Araceli Amaya Chavez

Asunto: CHEM27366R1 - Editor decision - accepted

Dear Dr. Amaya-Chávez,

I am pleased to inform you that the manuscript "Extraction and clean-up methods for organochlorine pesticides determination in milk: Review" (Dr. Araceli Amaya-Chávez) has now been accepted by the editor for publication.

Your manuscript will soon be passed to the production department for further handling. Then you will receive further notice.

Thank you for considering our journal for the publication of your research.

Kind regards,

For the Editor,

Karuna Narasimhan

Journal Manager

Chemosphere

7.1.1.2. Resumen

Los plaguicidas organoclorados (OCPs) pueden causar daño al ambiente y a la salud humana ya que son compuestos lipofílicos, con elevada resistencia a la degradación y con tiempos de vida media largos en humanos. Como la mayoría de los plaguicidas organoclorados persistentes fueron prohibidos desde hace algunos años, se espera encontrar estos compuestos a niveles traza en el medio ambiente. Por lo tanto, se requieren técnicas analíticas cada vez más sensibles y fiables para garantizar un monitoreo eficaz de estos compuestos. El objetivo de esta revisión es discutir los métodos de extracción y limpieza utilizados para la determinación de los residuos de OCPs en la leche, publicados en los últimos 20 años. Para llevar a cabo esta revisión, se realizó una búsqueda bibliográfica exhaustiva. A pesar de las desventajas de los métodos de extracción y limpieza convencionales como la extracción líquido-líquido, extracción en fase sólida o extracción Soxhlet, estos procedimientos siguen siendo utilizados debido a su confiabilidad. Nuevos métodos de extracción aplicados a la determinación de OCPs en leche, como la microextracción en fase sólida, extracción por dispersión de matriz en fase sólida o extracción por QuEChERS, no han sido evaluados a fondo. La mayoría de las metodologías analizadas en este trabajo presentan buenas características de desempeño de acuerdo con los criterios de aceptabilidad establecidos en el procedimiento SANCO. La comparación entre los límites de cuantificación (LC) y límites de detección (LOD), para las metodologías reportadas, no siempre es posible debido a la heterogeneidad de unidades presentadas. Por lo tanto, los investigadores deben tener en cuenta una homogeneización de las unidades de LC y LOD, según los reglamentos internacionales y los LMR establecidos. Por último, se necesita más investigación para obtener una metodología ideal para la determinación de OCPs en leche, que reúna las características favorables al medio ambiente presentadas por las nuevas técnicas y la fiabilidad de las metodologías tradicionales.

7.1.1.3. Artículo publicado

Chemosphere 92 (2013) 233–246



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Chemosphere

journal homepage: www.elsevier.com/locate/chemosphere



Review

Extraction and clean-up methods for organochlorine pesticides determination in milk



Joana Gomes Martins^a, Araceli Amaya Chávez^{a,*}, Stefan M. Waliszewski^b, Arturo Colín Cruz^a, María Magdalena García Fabila^a

^aDepartamento de Farmacia de la Facultad de Química, Universidad Autónoma del Estado de México, Paseo Tollocan Esq. Paseo Colón, C.P. 50100 Toluca, Estado de México, Mexico
^bCentro de investigaciones Biomédicas de la Universidad Veracruzana, Xalapa, Veracruz, Mexico

HIGHLIGHTS

- This review discusses extraction and clean-up methods used to monitor OCP in milk.
- Conventional extraction methods are still the most used, despite its disadvantages.
- New extraction methods have not been evaluated in detail for OCP analysis in milk.
- More research is needed to obtain the ideal method for OCPs determination in milk.

ARTICLE INFO

Article history:

Received 19 October 2012
Received in revised form 12 March 2013
Accepted 1 April 2013

Keywords:

Organochlorine pesticides
Milk samples
Extraction methods
Clean-up procedure

ABSTRACT

Organochlorine pesticides (OCPs) can cause environmental damage and human health risks since they are lipophilic compounds with high resistance to degradation and long half-lives in humans. As most persistent OCPs have been banned years ago, it is expected to find these compounds at trace levels in environment. Therefore, increasingly sensitive and reliable analytical techniques are required to ensure effective monitoring of these compounds. The aim of this review is to discuss extraction and clean-up methods used to monitor OCP residues in milk, reported in the last 20 years. To carry out this review, an exhaustive bibliographic review was conducted. Despite the disadvantages of conventional extraction and clean-up methods, such as liquid–liquid, solid-phase or Soxhlet extractions, these procedures are still used due to their reliability. New extraction methods, like solid-phase microextraction, matrix solid-phase dispersion or QuEChERS, have not been thoroughly evaluated for OCP determination in milk. Almost all the methodologies analyzed in this review presented good performance characteristics according to the performance acceptability criteria set in SANCO's procedure. Comparison between limits of quantification (LOQ) and detection (LOD), for the reported methodologies, is not always possible due to the heterogeneity of the units. Thus, researchers should take into account an homogenization of LOD and LOQ units, according to the international regulations and MRLs established. Finally, more research is necessary to obtain the ideal methodology for OCPs determination in milk, which comprises the environmentally friendly characteristics of the new techniques and the reliability of the traditional methodologies.

© 2013 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Contamination by persistent chemicals is potentially harmful to organisms at higher trophic levels in the food chain. Humans are principally exposed to these chemicals through ingestion, since diet is the most important source of chronic exposure to low doses of these substances (LeDoux, 2011). Of the 24 chemicals targeted by the Stockholm Convention, listed in the annexes of the convention text, 15 are organochlorine pesticides (OCPs): aldrin, endrin, dieldrin, chlordane, chlordecone, dichlorodiphenyltrichloroethanes

(DDTs), heptachlor, mirex, toxaphene, endosulfan and isomers, hexachlorobenzene (HCB), alpha-hexachlorocyclohexane (α -HCH), beta-hexachlorocyclohexane (β -HCH), lindane, and pentachlorobenzene (Stockholm Convention, 2009). Studies on the concentration of OCPs in the environment showed that emission sources of these compounds (such as DDT) in the last 20 years have moved from industrialized countries to developing countries, due either to the late production ban in these countries or to the use in agriculture and control of diseases such as malaria, typhus and cholera (Choi et al., 2009). Today, OCPs have been banned for agricultural or domestic uses in Europe, North America, and many countries of South America in agreement with the Stockholm Convention. Nevertheless, some of these compounds are still applied.

* Corresponding author. Tel./fax: +52 722 2173890.
E-mail address: aamayac@uaemex.mx (A. Amaya Chávez).

An example is the pesticide DDT which is used to control the growth of mosquitoes that spread malaria, as mentioned above, or as an antifouling agent in some developing countries. In addition, dicofol, the most frequently used acaricide, which is made of DDT and its formulated products, always contains a small amount of DDT (Chung and Chen, 2011).

OCPs can cause environmental damage and human health risks since they are lipophilic compounds with high resistance to degradation and long half-lives in humans (Chao et al., 2006; Padrón et al., 2006). The half-life of most organochlorine pesticides can range from a few years to more than 10 (Padrón et al., 2006). Several studies have reported that OCPs have endocrine-disrupting activity. It has been well established that these compounds can accumulate in human tissue and can cause chronic toxicity after long-term exposure. Many organochlorine pesticides have been found to be carcinogenic in rodent studies. In addition, they can cause non-Hodgkin's lymphoma, hepatotoxicity, immunotoxicity, developmental abnormalities, neurobehavioral effects and population declines (Qu et al., 2010).

Although most of the OCPs are no longer used, these persistent chemicals can be transferred and magnified to higher trophic levels through the food chain due to their relative stability and bioaccumulation property (Chung and Chen, 2011). These compounds have been confirmed to bioaccumulate in blood (Greizerstein et al., 1999; Jaraczewska et al., 2006), breast milk (Chao et al., 2006; Romero and Dorea, 2000; Mueller et al., 2008), and adipose tissues of humans through dietary intake (Waliszewski et al., 1995; Chao et al., 2006). The presence of these compounds in milk from other mammals has also been reported (Waliszewski et al., 1997; Real et al., 2005; Prado et al., 2007; Ashnagar et al., 2009; Kampire et al., 2011). Therefore, pesticide residue analysis in environmental samples has received increasing attention in the last few decades, resulting in many environmental monitoring programs for a broad range of pesticides (Padrón et al., 2006). Residues of OCPs (including DDT, HCB and HCH isomers) have been determined in samples from areas where these compounds were or are used (such as Africa, Asia, Latin America) (Allé et al., 2009). Nevertheless, the presence of these substances has been also detected in zones where OCPs were never used, such as the Arctic. Within the circumpolar studies, several populations living in Arctic and sub-Arctic areas were determined to be highly exposed to persistent organic pollutants (POPs) due to their local dietary habits. Long-range atmospheric transport and deposition of POPs in the Arctic have been studied through the Arctic Monitoring and Assessment Program (AMAP) (Polder et al., 2003).

Among the biological matrices mentioned above, milk is a convenient sampling matrix for measuring residue concentrations of persistent OCPs. Cow's milk is considered a nearly complete food since it is a good source of protein, fat and major minerals. Additionally, it is the main constituent of the daily diet, principally for vulnerable groups such as infants, school age children and the elderly. On the other hand, milk is an ideal liquid to dissolve environmental contaminants such as pesticides because most of them are fat-soluble (Kampire et al., 2011). Due to their lipophilic properties, OCPs are primarily stored in fat-rich tissues and subsequently translocated and excreted through milk fat (Waliszewski et al., 1997). Cow's milk may contain high levels of pesticides as a result of residue accumulation in the tissues following the cattle's exposure from feeding on contaminated feedstocks or from drinking contaminated water (Kampire et al., 2011). Thus, knowledge of cow's milk contamination by OCPs provides important information about human exposure to these contaminants, through the ingestion of dairy products.

Human milk is the most complete source of nutrients (proteins, carbohydrates, fat and vitamins), immune factors and other important constituents for infants (Azeredo et al., 2008). It is a convenient

matrix for monitoring POPs, such as OCPs, in humans because of the non-invasive sample collection and the suitability for determination of these lipophilic compounds due to the relatively rich lipid content (Tue et al., 2010). Additionally and not less important, the concentration of OCPs in human breast milk is a key factor for evaluating the toxic potential of contaminants in breastfeeding infants (Mihn et al., 2004), who are at the early stage of development and vulnerable to toxic contaminants (Tue et al., 2010). Infants and small children do not have fully developed detoxification mechanisms. Their immune systems are immature and their organs are in the process of rapid growth (Yu et al., 2006). Human milk offers a unique opportunity for estimation of total chemical intake by infants during breast-feeding (Romero and Dorea, 2000).

When breast milk is employed for human biomonitoring, it is important to take into account the process of depuration, that is, the reduction of chemicals in milk during lactation (Esteban and Castaño, 2009). Since most of the organochlorine pesticides, considered POPs, have been banned years ago, it is expected that these compounds will be found at trace levels in the environment. Thus, increasingly sensitive and reliable analytical techniques are required to ensure effective monitoring of OCPs.

In order to protect health for consumers, Maximum Residue Levels (MRLs) for pesticides and different commodities have been regulated internationally. In the case of the European Union, since 1 September 2008, a new legislative framework (Regulation (EC) No. 396/2005) for pesticide residues is applicable. This regulation completes the harmonization and simplification of pesticide MRLs, while ensuring better consumer protection throughout the EU. The Codex Alimentarius Commission, established by the Food and Agriculture Organization (FAO) and World Health Organization (WHO) in 1963, develops harmonized international food standards, guidelines and codes of practice to protect the consumers' health and ensure fair trade practices in the food trade. The Commission also promotes coordination of all food standards work undertaken by international governmental and non-governmental organizations. The Codex pesticide residues in food online database contain Codex Maximum Residue Limits for Pesticides (MRLs) and Extraneous Maximum Residue Limits (EMRLs) adopted by the Codex Alimentarius Commission up to and including its 34th Session (July 2011) (Codex Alimentarius, 2012).

Table 1 summarizes the OCP MRLs established by different international regulations, the European Union (EU) and the Codex Alimentarius regulations. In the case of the EU, MRLs are established for milk and cream (not concentrated, nor containing added sugar or sweetening matter), butter and other fats derived from milk, cheese and curd (Regulation (EC) No. 396/2005). Regarding the Codex Alimentarius, MRLs are established for milks in general (Codex Alimentarius, 2012). There are no MRLs specifically established for OCPs in human milk. However, due to the similarity of the matrix and the dairy intake of both commodities, MRL values established for OCPs in milks (in general) are taken as reference for the information analysis reported in this work.

In general, food and environmental samples cannot be analyzed without some preliminary sample preparation, since contaminants are too diluted and the matrix is rather complex. Due to the low levels of detection required by regulatory bodies and the complex nature of the matrix, the efficiency of the sample preparation is very important, as well as the low level detection and identification of the target compounds (Picó et al., 2007). In the case of milk samples, one of the main difficulties related to the determination of these analytes is its high fat and protein content that can often interfere in the analytical determination. For this reason, sample extraction can be long and tedious, involving several clean-up steps to remove the co-extracted material from the matrix (Aguilera-Luiz et al., 2011).

Table 1
EU and Codex MRLs established for different OCPs and for milks.

Pesticide (residue definition)	MRL (mg kg ⁻¹)	
	EU	CODEX
Aldrin and Dieldrin (Aldrin and Dieldrin combined expressed as Dieldrin)	0.006	0.006
Chlordane (sum of <i>cis</i> - and <i>trans</i> -chlordane and oxychlordane)	0.002 ^a	0.002
Chlordecone	0.02	n.e.
DDT (sum of <i>p,p'</i> -DDT, <i>o,p'</i> -DDT, <i>p-p'</i> -DDE and <i>p,p'</i> -TDE (DDD) expressed as DDT)	0.04	0.02
Endosulfan (sum of alpha- and beta-isomers and endosulfan-sulfate expressed as endosulfan)	0.05 ^a	0.01
Endrin	0.001	n.e.
Heptachlor (sum of heptachlor and heptachlor epoxide expressed as heptachlor)	0.004	0.006
Hexachlorobenzene	0.01	n.e.
Hexachlorocyclohexane (HCH), alpha-isomer	0.004	n.e.
Hexachlorocyclohexane (HCH), beta-isomer	0.003	n.e.
Lindane (gamma-isomer of hexachlorocyclohexane (HCH))	0.001 ^a	0.01
Methoxychlor	0.01 ^a	n.e.
Quintozene (sum of quintozene and pentachloro-aniline expressed as quintozene)	0.01 ^a	n.e.

n.e. – Not established.

^a Lower limits of analytical determination.

There is some information that has been reported about methodologies for organochlorine pesticide determination in fatty foods (Gilbert-López et al., 2009; Chung and Chen, 2011) but we have not found reviews wherein analytical aspects of OCPs determination in milk are specifically discussed. This review is intended to discuss extraction and clean-up methods used to monitor OCP residues in milk, reported in the last 20 years.

2. Extraction methods

Generally, analytical methods involve processes such as sampling, sample preparation, separation, detection and data analysis. More than 80% of the analysis time is consumed in sampling and sample preparation steps, such as extraction, concentration, fractionation and isolation of analytes. Thus, it is easy to conclude that the choice of an appropriate sample preparation method influences considerably the reliability and accuracy of food analysis (Kataoka et al., 2000). Most pesticide residue determination methods include two key steps: extraction of target analytes from the bulk of the matrix and clean-up of the analytes from the matrix co-extractives (Bennett et al., 1997).

In general, traditional procedures are still used nevertheless are time-consuming, labor-intensive, complicated, expensive and produce considerable quantities of wastes (Wilkowska and Biziuk, 2011). In recent years, several new analytical techniques to prepare food and environmental samples for extraction and determination of pesticide residues have been developed (Picó et al., 2007). The trends in recent years have been towards the ability to use smaller initial sample sizes (even for trace analysis), while obtaining greater specificity, greater selectivity in extraction, increased potential for automation or for on-line methods that reduce manual operations, and a more environmental friendly approach (green chemistry) with less waste and the use of small volumes or no organic solvents (Smith, 2003). The ideal methodology of sample preparation should also be fast, precise and accurate. Additionally, it should be easy to apply and use low cost materials (Picó et al., 2007).

Even though conventional techniques such as liquid–liquid extraction (LLE) and solid-phase extraction (SPE) are still used for the extraction of pesticides from milk, other alternatives, such as matrix solid-phase dispersion (MSPD) (Focant et al., 2004), the QuEChERS method (acronymic name from quick, easy, cheap, effective, rugged and safe) (Aguilera-Luiz et al., 2011), pressurized liquid extraction (PLE) (Mezcua et al., 2007) and solid-phase microextraction (SPME) (Röhrig and Meisch, 2000) have been proposed.

2.1. Liquid–liquid extraction

For liquid milk, liquid–liquid extraction (LLE) is still the preferred method for extracting OCPs (Chung and Chen, 2011; LeDoux, 2011). This procedure consists of shaking liquid milk samples several times in selected organic solvents for extracting pesticide residues from the bulk of the milk (LeDoux, 2011).

When water-miscible extraction systems are used, it is also necessary to include a water-removal or partitioning step. Analysis of liquid milk for pesticides in a low range provides numerous analytical challenges due to the complexity of the matrix. The milk matrix comprises high moisture, lipids, sugars and proteins, which must be removed to achieve the required sensitivity. Milk tends to form emulsions during liquid–liquid partitioning (Bennett et al., 1997).

In the case of OCPs determination, the selection of appropriate solvents and extraction methods is critical in order to achieve a satisfactory recovery from the matrix of interest. Owing to their lipophilicity, organic solvents normally can extract OCPs from food efficiently but lipids are also co-extracted. Solvents such as ethanol, methanol, ethyl acetate, hexane and their mixtures like ethanol/ethyl acetate (Bennett et al., 1997), acetone/hexane (Romero and Dorea, 2000; Mueller et al., 2008; Bulut et al., 2011), ethyl acetate/acetone/methanol (Azeredo et al., 2008), hexane/dichloromethane (Qu et al., 2010), petroleum ether (Kampire et al., 2011) have been used to perform LLE. In some cases sonication and/or vortex are also applied to improve the extraction efficiency and recoveries (Stuetz et al., 2001; Azeredo et al., 2008). During liquid–liquid extraction, it is relatively common to add salts to the solution so that the organic phase can be separated from the aqueous phase more easily (Chung and Chen, 2011).

In some cases, prior to the LLE, an acid may be added to the samples since it allows the determination of free and conjugated pesticides and the degradation of phthalates that overlap the pesticides during gas chromatography (Waliszewski et al., 2008). The most common acids used are chloridric acid (HCl) (Qu et al., 2010), formic acid (Behrooz et al., 2009) and sulfuric acid (Waliszewski et al., 1997). On the other hand, this procedure may limit the determination of some OCPs which are sensitive to acid treatment (Chung and Chen, 2011).

Analyzing the literature, it is possible to observe that most of the reported works for OCPs determination in different kind of milks (human, cow's, buffalo's, and sheep's milks) are based on LLE techniques, as mentioned above. Some of these methodologies allowed the simultaneous determination of other pesticide groups or other types of pollutants such as organophosphorus (Schenck

and Casanova, 1999; Ciscato et al., 2002), carbamates, pyrethroids (Ciscato et al., 2002), PCBs (Behrooz et al., 2009), with good recoveries and acceptable quantification (LOQs) and detection limits (LODs).

Nevertheless, these classical methods of analyte extraction using sample homogenization and liquid–liquid partitioning are time consuming, require large amounts of expensive and hazardous organic solvents, multistep procedures associated with the high risk of analyte losses (Ojeda and Rojas, 2011) and cannot be automated (LeDoux, 2011; Chung and Chen, 2011). Furthermore, the evaporation of large solvent volumes is a source of atmospheric and environmental pollution (LeDoux, 2011). Recent studies still report the use of LLE for the OCPs extraction from milk (Qu et al., 2010; Bulut et al., 2011; Bergkvist et al., 2012; Hassine et al., 2012). Qu et al. (2010) reported a study of the exposure of young mothers and newborns to OCPs, in China, in which sample extraction was carried out by LLE. The samples of concern were extracted with hexane/dichloromethane mixture, following the addition of chloridric acid (HCl) and 2-propanol. In this study, 21 OCPs were analyzed. Nevertheless, only 10 compounds were reported because the other OCPs determined were detected in less than 15% of all samples. Endosulfan (II) and endrin ketone were not detected in any sample. Good limits of detection were achieved for the reported organochlorine pesticides. The low frequency of some OCPs such as heptachlor, heptachlor epoxide, aldrin, dieldrin, endosulfan (I), endosulfan sulfate, endrin, endrin aldehyde and methoxychlor, in the analyzed sample may be due to the addition of chloridric acid since some of these compounds are not resistant to acid treatment (as mentioned above). To achieve an accurate analysis it would be necessary to evaluate the effect of the acid addition on the extraction of these OCPs. Bulut et al. (2011) determined the OCPs' residues in buffalo, cow and sheep milk from Turkey. The extraction of all milk samples was performed by liquid–liquid extraction with hexane/acetone and without addition of acid. The developed methodology was used for monitoring purposes and data obtained showed that some pesticides in all milk analysed exceeded the acceptable Maximum Residue Level (MRL) when compared to Codex MRLs.

2.2. Solid–liquid extraction (SLE)

Liquid–solid extraction is based on the distribution ratio of the analyte between solid and fluid (Żwir-Ferenc and Biziuk, 2004). In the case of milk samples, it may be applied to powdered milk. This procedure has been applied to liquid milk after the milk samples were mixed with anhydrous sodium sulfate, obtaining a coarse powder (Waliszewski et al., 1997; Kumar et al., 2006).

As LLE, the selection of an appropriate solvent is a crucial factor to achieve good results in a solid liquid extraction. Dichloromethane (Kumar et al., 2006) and petroleum ether (Waliszewski et al., 1997) are some of the solvents for the SLE of OCPs from milk.

2.3. Soxhlet extraction

The traditional Soxhlet extraction method has also been applied to the extraction of organochlorine pesticides from milk (Brunetto et al., 1996; Prado et al., 2004; Zhou et al., 2011). Usually, n-hexane is used; however other solvent systems such as n-hexane/dichloromethane (Zhou et al., 2011) can also be used.

Brunetto et al. (1996) applied this methodology for extraction of DDT residues from human milk of Venezuelan women. Good results were obtained, with a recovery rate that ranged between 99% and 107% and a limit of detection (LOD) of $0.5 \mu\text{g L}^{-1}$. Some years later, the same extraction technique was applied for determination of OCPs in human milk of women from Mexico City (Prado et al., 2004).

Soxhlet usually performs efficient extractions for a large range of pesticides. However, performing this technique under unfavorable conditions can result in poor recovery rates. In any case, Soxhlet extraction is time-consuming, expensive in terms of energy (heating), analyst time (much handling) and solvent use (large volumes) (LeDoux, 2011).

Zhou et al. (2011) reported a methodology, adopted for determination of OCPs, based on Soxhlet extraction, gel permeation chromatography and gas chromatography–negative chemical ionization–mass spectrometry (GC–NCI–MS) detection. Although the developed methodology presented good performance characteristics, the Soxhlet extraction time was 24 h.

2.4. Solid-phase extraction (SPE)

Solid-phase extraction (SPE) is widely accepted as an alternative extraction/clean-up method to LLE for extraction of pollutants in liquid samples (Lambropoulou and Albanis, 2007).

Conventional solid-phase extraction (SPE) is based on adsorption of analytes onto solid sorbents. This extraction technique is commonly used for enriching analytes from liquid and gaseous matrices. Many food matrices have been cleaned up by SPE for determination of several analytes. The solid-phase extraction or purification is performed in four steps: conditioning (the functional groups of the sorbent bed are solvated in order to make them interact with the sample), retention (the analytes are bound to the bed surface), selective washing (undesired species are removed) and elution (the analytes are desorbed and collected) (Żwir-Ferenc and Biziuk, 2004).

The selection of an appropriate sorbent depends on the interaction mechanisms between the sorbent and the analytes. Alumina, magnesium silicate and graphitized carbon are commercially available sorbents (Żwir-Ferenc and Biziuk, 2004). Alawi et al. (1992) and Sharaf et al. (2008) reported different methodologies for the determination of organochlorine pesticides in human milk, including SPE extraction and Florisil (activated magnesium silicate) as sorbent. Nevertheless, the most common material is silica since it is sufficiently reactive to allow its surface to be modified by chemical reaction and stable enough to permit its use with a wide range of solutions (Żwir-Ferenc and Biziuk, 2004). Diatomaceous earth, a natural material constituted primarily of silica, has been reported as a possible sorbent for SPE extraction in the case of OCPs determination in human milk (Mihn et al., 2004; Tsydenova et al., 2007). Polymer-based sorbents are also common for SPE. Sorbents in general, used in solid-phase extraction belong to three principal classes: nonpolar, polar and ion exchange. The choice of these materials depends on the food matrix, analytes of interest and their interferents (Żwir-Ferenc and Biziuk, 2004).

An innovation of the SPE method has been the introduction of a disk format which, in comparison with a packed cartridge, offers larger flow area and lower bed mass (Żwir-Ferenc and Biziuk, 2004). Covaci and Schepens (2001), developed and evaluated solid-phase disk extraction (SPDE) for the isolation and concentration of persistent organochlorine pollutants (including some organochlorine pesticides) from human body fluids (serum, cord blood, milk, between others). The authors concluded that solid-phase disk extraction provides an effective method for monitoring of selected organochlorine pollutants in different human body fluids.

Principal advantages of SPE are: the analytical procedure is simpler, small volumes of solvents are used and cleaner extracts and greater recoveries are usually obtained. SPE also allows avoidance of the emulsion formation often encountered in LLE. Automation is also possible (Lambropoulou and Albanis, 2007).

Although the potential of SPE for extraction and clean-up of pesticides from food samples is recognized, some characteristics must still be improved. The main problems that researchers need

to overcome include difficulties in: (1) choosing an adsorbent and elution solvent for multiresidue analysis of compounds with a very wide range of physicochemical characteristics; (2) substantial variation in the performance of the products offered by different manufacturers; and (3) the small sample volume that can be extracted with some SPE adsorbents (Lambropoulou and Albanis, 2007).

Together with liquid–liquid extraction, solid-phase extraction is one of the most frequently used extraction techniques for the determination of OCPs in milk.

2.5. Solid-phase microextraction (SPME)

Solid-phase microextraction (SPME) was introduced several years ago by Pawliszyn and co-workers and represents a further advance as a complete solvent-free alternative technique (Arthur and Pawliszyn, 1990; Miège and Dugay, 1998; Balasubramanian and Panigrahi, 2011), reducing the laboratory-generated waste and time for sample preparation (Fernandez-Alvarez et al., 2008). This procedure also allows for achieving lower detection limits and good reproducibility (Wang et al., 2008). SPME can integrate sampling, extraction, concentration and sample introduction into a single uninterrupted process, resulting in high sample yield (Fernandez-Alvarez et al., 2008). Organic compounds are simply extracted by dipping the solid phase coating of a silica fiber support into an aqueous solution. Then, fibers are transferred into the heated injector of a gas chromatograph where the extracted analytes are thermally desorbed and analyzed. Contrary to SPE, the total amount of extracted sample is used for the determination by GC. SPME requires small sample volumes and numerous fibers with different polarities are available, such as polydimethylsiloxane (PDMS), polydimethylsiloxane–divinylbenzene (PDMS–DVB), polyacrylate (PA), carbowax–divinylbenzene (CW–DVB), and carboxen–polydimethylsiloxane (CX–PDMS), among others. Furthermore, the technique is easy to automate by using a commercially available auto-sampler (Miège and Dugay, 1998). A clean-up step is not necessary with the SPME technique because of the selective nature of the coatings (Alpendurada, 2000). The process involving SPME is different from those involving SPE. It is based on a partition process. A first step is the extraction of the analytes according to their partition coefficients. Consequently, extraction recoveries of 100% cannot be achieved and the partition equilibrium may sometimes be required to be reached (Miège and Dugay, 1998). SPME may be operated in the headspace mode, immersed into the aqueous matrix or in membrane protection mode (Balasubramanian and Panigrahi, 2011). It depends on the volatility of the analytes and the matrix characteristics. Several factors can influence the SPME efficiency. During the extraction step, the ionic strength and the pH of the aqueous sample, the nature and the thickness of the fiber, the stirring conditions and the temperature of the extraction must be optimized. During the desorption step, the temperature of the GC injector and the length of desorption time must be considered (Miège and Dugay, 1998). The principal advantages of SPME are: good analytical performance, simplicity and low cost. SPME produces relatively clean and concentrated extracts and it is ideal for mass spectrometry (MS) applications. This procedure does not suffer from the plugging encountered with SPE. It also completely eliminates use of organic solvents, as mentioned above. A relatively long equilibration time is needed and sample stirring, sonication, fiber vibration and rotation have been used to reduce this absorption time. An inherent disadvantage is that quantitative work is still rather laborious because carry-over between samples may be considerable (Lambropoulou and Albanis, 2007).

This technique is of increasing interest in the field of pesticide residues analysis and has been applied for the determination of different classes of pesticides including organophosphorus, organochlorine, and pyrethroid in a large number of matrices, such as

wine (Martins et al., 2011a, 2011b, 2012), urine, serum (López et al., 2001), environmental liquid samples (Padrón et al., 2006), cow milk (Rodrigues et al., 2011), and breast milk (Röhrig and Meisch, 2000; Fernandez-Alvarez et al., 2008).

During the application of SPME for the analysis of organochlorine pesticides in breast milk, perchloric acid can be added to break down analyte–matrix composites, and headspace sampling mode is an option to avoid damages in the fiber and interferences on the analysis by other milk components (Fernandez-Alvarez et al., 2008; Rodrigues et al., 2011).

Röhrig and Meisch (2000) reported on an application of solid-phase microextraction for the rapid analysis of chlorinated organic compounds, including some OCPs, in breast milk. After optimization, the authors achieved a very fast and sensitive extraction method. The linearity of the method was very good and the limits of detection and determination were low enough for biomonitoring purposes. Fernandez-Alvarez et al. (2008) developed a SPME extraction technique combined with gas chromatography and microelectron-capture detection for the determination of pesticide residues (including OCPs) in bovine milk. The authors obtained a reliable and linear method in the concentration range of interest, with satisfactory limits of detection and quantification.

2.6. Matrix solid-phase dispersion (MSPD)

Matrix solid-phase dispersion is a new-based extraction and clean-up technique developed for pesticide multiresidue analysis. The main difference between MSPD and SPE is that, in SPE, samples must be in liquid state before application to the column while MSPD can handle solid or viscous liquid samples directly. Interactions of the system components are greater in MSPD and different, in part, from those in SPE (Lambropoulou and Albanis, 2007).

MSPD performs sample disruption while dispersing its components into a solid support. This technique combines sample homogenization with preliminary clean-up of the analytes (Picó et al., 2007). In a first step, homogenized samples are ground with a solid sorbent in order to disrupt the structure of the raw material and achieve its homogeneous distribution around the sorbent particles. Classic applications of MSPD procedure employ reversed-phase sorbents as dispersants. Octadecyl-silica (C_{18}) is the most often used but C_8 and C_{30} materials have been considered too. Normal-phase, non-bonded sorbents, such as Florisil, alumina and silica, have also been proposed as dispersants in several MSPD applications. Replacement of reversed or normal-phase dispersants by sand, diatomaceous earth or Celite has been reported. Several authors have demonstrated that similar precision and recovery results can be obtained. Nevertheless, it does lead to cost-effective methods (García-López et al., 2008). Mixtures, such as silica gel and charcoal are used as solid sorbents. The layer of sorbent with adsorbed analytes is placed in a column, on a layer of anhydrous sodium sulfate (to capture the water contained in the sample). Subsequently, they are washed out with an appropriately chosen solvent that guarantees a good separation of the analytes (Żwir-Ferenc and Biziuk, 2004). The nature of the elution solvent is also crucial for obtaining efficient desorption of pesticides from the adsorbent while retaining interferences on the column. Most adsorbents have been tested in combination with a large variety of solvents including, for example, acetonitrile, dichloromethane or mixtures of these with methanol or hexane (Lambropoulou and Albanis, 2007).

MSPD extraction is a technique wherein a sample extraction and clean-up may be carried out in the same step with good recoveries and reproducibility, reducing the analysis time and the amount of solvent employed. Principal advantages are that this procedure allows rapid sample turnover and improved access to timely data on residue levels present in the sample. It also requires a small sample size and it decreases considerably the amount of

solvent used compared to the classical methods, thus decreasing environmental contamination and improving work safety (Zwir-Ferenc and Biziuk, 2004). Additional advantages of MSPD are: low cost per extraction and no need for expensive instrumentation (García-López et al., 2008). MSPD has become a well-established sample-preparation technique in food analysis (Lambropoulou and Albanis, 2007). Nevertheless, works reporting MSPD extraction of organochlorine pesticides from milk are still limited. Solvent evaporation remains a problem with this extraction technique and literature reports of on-line coupling of MSPD to liquid chromatography (LC) or gas chromatography (GC) instruments are scarce (Lambropoulou and Albanis, 2007).

Focant et al. (2004) developed a methodology for measurement of selected polybrominated diphenyl ethers, polybrominated and polychlorinated biphenyls and organochlorine pesticides in human serum and milk using comprehensive two-dimensional gas chromatography isotope dilution time-of-flight mass spectrometry. The extraction step for the human milk samples was performed by MSPD, using diatomaceous earth as sorbent and dichloromethane as elution solvent. However, in this case a clean-up step was required.

2.7. Pressurized liquid extraction (PLE)

To avoid some of the main disadvantages associated with the application of clean-up steps, such as long sample treatment time and large volumes of organic solvents consumed, modern extraction techniques are applied, specifically, the pressurized liquid extraction (PLE) technique (Mezcua et al., 2007). This technique, also known as accelerated solvent extraction (ASE), is one of the most recent solid and semisolid sample extraction methodologies. The fundamental difference between SFE and PLE is that SFE uses solvents near or above their critical point (usually CO₂-based fluids), whereas PLE uses traditional aqueous and organic solvents (Raynie, 2006; Lambropoulou and Albanis, 2007). PLE uses high temperature and pressurized liquid extraction conditions to extract the analytes (Chung and Chen, 2011). At high temperature the rate of extraction increases because the viscosity and the surface tension of the solvent decrease whereas its solvent strength and rate of diffusion into the sample increase. Pressure keeps the solvent below its boiling point and forces its penetration into the pores of the sample. The combination of high temperature and pressure results in better extraction efficiency, thus minimizing solvent use and expediting the extraction process. The time required for extraction is almost independent of sample mass and the efficiency of extraction is mainly dependent on temperature. PLE has been successfully used for determination of pesticides in different food matrices, with a particular interest in application of the technique to analysis of lipid-containing foods (Lambropoulou and Albanis, 2007). The efficiency of PLE is normally higher when compared to other extraction techniques, especially Soxhlet. The optimization of the methodology includes parameters such as the effects of extraction temperature, number of extraction cycles and various extraction solvent mixture compositions on the extraction effectiveness and recoveries of certain OCPs from fish samples. Besides, clean-up sorbent materials can also be imbedded in the extraction. PLE has the advantages of low solvent consumption and a short extraction period. Nevertheless, the initial cost is high, as large amounts of unwanted matrix substances are co-extracted and some unstable OCPs including endrin, endrin aldehyde and pentachlorobenzene (PeCB) yield low recoveries (Chung and Chen, 2011).

Mezcua et al. (2007) developed a methodology for determination of 12 organophosphorus and organochlorine pesticides in milk-based infant formulas combining PLE with online clean-up followed by gas chromatography tandem mass spectrometry. The authors concluded that the developed PLE-GC-MS/MS multiresidue

method is a selective, simple, rapid and suitable procedure for the accurate identification and quantification of the 12 studied pesticides in milk infant formulas. The use of an online clean-up utilizing alumina in the extraction cell during the PLE process and the optimization of the desorption temperature during the GC injection allows the avoidance of typical interferences caused by co-extraction of lipids present in samples.

2.8. QuEChERS

Recently, the QuEChERS (quick, easy, cheap, effective, robust and safe) procedure has become very popular since it has been shown to be a powerful methodology in pesticide residue analysis in foodstuffs. This extraction method allows the simultaneous extraction of polar and non-polar compounds with adequate recoveries, and thus it can be suitable for the extraction of a wide range of compounds (Vidal et al., 2009). QuEChERS is a fast and convenient replacement for LLE which supplies high-quality results in a minimum number of steps and with low consumption of solvent and glassware (Lambropoulou and Albanis, 2007). The QuEChERS method is primarily used for non-fatty food samples, including natural agricultural products (Jeong et al., 2012). The original procedure consists in the extraction of the homogenized sample by hand-shaking or vortex mixing with the same amount of acetonitrile to obtain a final extract sufficiently concentrated to avoid solvent evaporation. Gram quantities of salts (anhydrous magnesium sulfate, MgSO₄, and sodium chloride, NaCl) are then added to the sample, with mixing, to drive partitioning of the analytes between the aqueous residue and the solvent. After simple vortex mixing and centrifugation, clean-up and removal of residual water is performed simultaneously using a fast procedure, called dispersive solid-phase extraction (DSPE). In this, a primary-secondary amine (PSA) adsorbent and more anhydrous MgSO₄ are mixed with the sample extract. Acetonitrile is the solvent of choice for the QuEChERS method and the dispersing adsorbent most frequently used is PSA. Mixed-mode materials containing two adsorbents, for example C₁₈ and PSA, have also been tested (Lambropoulou and Albanis, 2007). MgSO₄ is used to reduce the water phase and promote partitioning of pesticides into an organic layer and PSA can be used to remove compounds such as fatty acids, organic acids, and various sugars. Graphite carbon block (GCB) can also be used and it has strong affinity for planar molecules and can effectively remove pigments such as chlorophylls and carotenoids (Jeong et al., 2012). The QuEChERS procedure has the advantages of high recovery, accurate results, high sample throughput, low solvent and glassware usage, less labor and bench space, lower reagent costs and ruggedness. Organic acids and other potential contaminants are removed during clean-up (Lambropoulou and Albanis, 2007). This methodology simplifies the extraction of analytes and the extract clean-up without adversely affecting the magnitude of analyte recoveries (Wilkowska and Biziuk, 2011). The main disadvantage of this extraction method is that the concentration of the target compounds in the final extract is lower than in the concentrated extracts obtained by use of most traditional procedures. Consequently, the final extract must be concentrated to a greater extent to provide the necessary sensitivity and to achieve the limits of quantification (LOQ) desired (Lambropoulou and Albanis, 2007). Difficulties may also arise when the official methods are applied to emulsified fatty foods such as milk. Some lipophilic pesticides such as DDE and HCB have been shown to be poorly recovered from milk and avocado samples, and the recovery rate tended to decrease as the fat content increased (Jeong et al., 2012).

Jeong et al. (2012) developed a QuEChERS-based method by response surface methodology for the determination of pesticide residues (including some OCPs) in milk. According with the report

results, for the OCPs dieldrin and endosulfan sulfate, the QuEChERS method achieved acceptable results, with recoveries in the range of 82–99%. For the OCPs o,p'-DDE, p,p'-DDE, o,p'-DDT and p,p'-DDT, it was possible to detect and quantify the molecules by the optimized method even though the recoveries were less than 80%.

3. Clean-up procedures

Even though the analytes of interest are isolated from the bulk matrix, several interfering compounds (fats, sugars, proteins, etc.) may also be co-extracted simultaneously with target compounds, which could interfere in the determination (Żwir-Ferenc and Biziuk, 2004; Gilbert-López et al., 2009). Moreover, co-extracted compounds, especially lipids, tend to adsorb in GC systems such as injection port and column, resulting in poor chromatographic performance (LeDoux, 2011). Consequently, a purification step is required before the determination (Żwir-Ferenc and Biziuk, 2004; Gilbert-López et al., 2009). This step is called the clean-up and allows for isolation of the target compounds from potential interfering co-extractives as well as discarding the extraction solvent (Gilbert-López et al., 2009). Several purification methods have been attempted to eliminate co-extracted interference from extracts including freezing centrifugation, liquid–liquid partitioning, gel permeation chromatography, and solid-phase extraction. Most of the published methods use anhydrous sodium sulfate at one or more steps in order to remove water traces from the extraction solvent system (LeDoux, 2011).

3.1. Freezing centrifugation

In the case of OCPs extraction from milk samples, lipids are one of the most important interferences. The simplest technique for lipids removal is by freezing centrifugation. Fatty substances have lower melting points than the solvent so that frozen lipids can be removed by centrifugation or filtering while OCPs remain dissolved in the solvent. Nevertheless, the solubility of lipids in solvent not only depends on the temperature but also the solubility product. Consequently, this technique can remove significant amount of lipids for some fatty matrix but not for every matrix (Chung and Chen, 2011).

3.2. Partitioning lipid extraction

Liquid–liquid partitioning has also been used, generally prior to additional clean-up procedures such as SPE, to eliminate co-extracted compounds from pesticide extracts. Nevertheless, solvent partitioning can lead to the loss of some analytes and thus to lower recoveries (LeDoux, 2011). Since organochlorine pesticides are also slightly soluble in polar solvent, loss of OCPs and thus lower recoveries are expected (Chung and Chen, 2011).

3.3. Adsorption chromatography

One of the most commonly used clean-up procedure is adsorption chromatography applying the SPE technique. With this technique, the analytes and interfering compounds are adsorbed on a solid sorbent, followed by elution of the target compounds from the substrate and arrest of the interfering substances. It is common to use, for this purpose, chromatographic columns that are factory-made and filled with modified silica gel, Florisil or alumina (Żwir-Ferenc and Biziuk, 2004). These packing materials are used for purification of the extracts from lipid fractions (Żwir-Ferenc and Biziuk, 2004) and may also be applied to remove lipids in sample preparation or the solid phase extraction step (as mentioned

above) with minimal adverse effect on non-lipid chemicals (Chung and Chen, 2011).

Clean-up procedure using SPE technique is reported in several studies for OCP determination in milk (Brunetto et al., 1996; Bennett et al., 1997; Romero and Dorea, 2000; Behrooz et al., 2009; Prado et al., 2004; Kumar et al., 2006) and it can be combined with different extraction methodologies.

3.4. Gel permeation chromatography (GPC)

GPC was applied to the clean-up of OCP residues in late 1970s and became the most commonly employed and necessary step for lipids removal of fatty food. This method separates low molecular mass (up to several hundreds) compounds such as OCPs from high molecular mass compounds such as lipids of 600–1500 mass units (Żwir-Ferenc and Biziuk, 2004; Chung and Chen, 2011; LeDoux, 2011). Larger molecules are stopped in the deposit and smaller ones are washed out. Columns used in gel chromatography are usually filled with copolymers of styrene and divinylbenzene. The most common mobile phases used are cyclohexane or combinations of solvents with several elution forces (toluene/ethyl acetate; ethyl acetate/cyclohexane; acetone/cyclohexane, etc.) (Żwir-Ferenc and Biziuk, 2004). If correctly used and without exceeding the maximum loading of the GPC, the residual lipids remaining after GPC clean-up normally fall less than 1% of the initial amount (Chung and Chen, 2011).

This clean-up procedure was used in some reported studies for OCPs determination in milk preceded by different extraction methods, such as SPE (Tsydenova et al., 2007), LL extraction (Ciscato et al., 2002; Mueller et al., 2008) and Soxhlet extraction (Zhou et al., 2011). Tsydenova et al. (2007) reported a clean-up stage which included two different procedures; a clean-up by GPC followed by SPE purification.

3.5. Sulfuric acid treatment

Another common purification procedure to remove fatty co-extracted interferences during the clean-up step is sulfuric acid treatment (Bouwman et al., 2006). Although some OCPs are classified as persistent organic chemicals, it is notable that some of them are not resistant to sulfuric acid treatment. These sulfuric acid-sensitive OCPs, such as dieldrin, endrin, endrin aldehyde, chlordecone, endosulfan I, endosulfan II, trans-heptachlor epoxide and dicofol, can be sulfonized completely in contact with concentrated sulfuric acid. In particular, dieldrin and endrin are the most sensitive and will degrade in a few minutes with this treatment. The other acid-labile OCPs will also degrade to different degrees in an hour (Chung and Chen, 2011). Nevertheless, this technique presents several advantages for the determination of organochlorine pesticides which are resistant to the sulfuric acid treatment. Apart from the determination of free and conjugated pesticides and the degradation of phthalates that overlap the pesticides during gas chromatography, leading to misinterpretations, the methodology allows for the replacement of expensive adsorbents and significant decrease in the volume of organic solvents used, (Waliszewski et al., 2008). Waliszewski et al. (1997) used the sulfuric acid treatment for the determination of organochlorine residues in milk and butter, obtaining good results for the analyzed pesticides, with the exception of dieldrin, endrin and methoxychlor, which are destroyed by the action of concentrated sulfuric acid (as stated above). These authors also obtained significant differences in recoveries of α and β -endosulfane due to partial conversion of β -endosulfane to α -endosulfane in the presence of concentrated sulfuric acid during clean-up.

Pandit et al. (2002) also used the sulfuric acid treatment as purification treatment, simultaneously with SPE. This study did not include the determination of sulfuric acid sensitive OCPs. Conse-

quently, the authors could achieve good results for all the analyzed compounds.

4. Quantification methods for OCPs

Most pesticides are volatile and thermally stable. In the case of OCPs, specifically, most of these compounds are non-polar and easily vaporized. Thus, gas chromatography (GC) is the most common technique for chromatographic separation.

Several selective detectors may be coupled with GC for OCP analysis such as electron-capture detection (ECD), nitrogen-phosphorus detection (NPD) and mass spectrometry (MS). GC-ECD is the most commonly used detection method with acceptable detection limits. However, even though the above mentioned detectors can be used for quantification, a GC-MS detector must be used for confirmation. To further increase confidence in confirmative analysis, a GC coupled with tandem MS is one of the suitable techniques (Chung and Chen, 2011).

Although liquid chromatography (LC) is not so common for OCP analysis, it is another option, principally in the case of compounds with poor volatility, high polarity and thermal instability (Sannino et al., 2004). A liquid chromatographic mass spectrometry (LC/MS) system is commonly used for polar, non-volatile and/or thermally labile pesticides. OCPs are mainly nonpolar compounds and are normally not ionized efficiently with atmospheric chemical (APCI) or electrospray ionization (ESI) mode of LC/MS. The development of atmospheric pressure photoionization (APPI) technology has expanded the range of compounds amenable to LC-MS to include nonpolar compounds (Chung and Chen, 2011).

5. Reported methodologies for OCPs determination in milk samples

To carry out this review, a bibliographic survey of scientific databases was performed, followed by analysis of the collected information. It is important to note that the collected information included different classes of pesticides but that only OCPs data were analyzed. The most studied OCPs are aldrin, dieldrin, endrin, hexachlorocyclohexane and its isomers (HCHs), hexachlorobenzene (HCB), heptachlor, heptachlor epoxide, dichlorodiphenyltrichloroethane (DDT) and its isomers, and endosulfan and its isomers (information not shown).

Table 2 summarized the reported works found, published between 1992 and 2011. Analyzing the information obtained, it is possible to observe that LLE is the most common method for the extraction of OCPs from milk. SPE is also an usual OCP extraction procedure in milk samples. It is possible to observe that scarce information of recent extraction methods for OCPs determination in milk have been reported. New extraction techniques arose with the aim of decreasing the use of toxic solvents, extraction time, sample volume required, and analysis costs. However, methodologies such as PLE may not always be suitable for the determination of OCPs in fatty foods as those unstable compounds (such as endrin aldehyde and chlordecone) would be lost (Chung and Chen, 2011). The complexity of the milk matrix may be another obstacle for the application of faster and more recent extraction procedures for OCPs. Despite its disadvantages, traditional methods such as solid-liquid, liquid-liquid or Soxhlet extraction still provide promising approaches for the extraction of OCPs from milk.

Table 3 shows the main steps for different sample preparation techniques, where it is possible to observe that LLE is a multi-step procedure that often results in analyte losses and, on the other hand, SPME is a process with only two steps, making very fast sample preparation possible. Regarding sample clean-up methods, SPE is the most common procedure. Both conventional glass columns

packed with sorbents and ready-to-use cartridges have been used with the most common phases already mentioned above. In the case of SPE clean-up the quality of the sorbents, the extraction solvents and all materials which are in contact with the sample are extremely important to achieving good results. Some extraction methods do not require an extra step for sample purification, such as SPME. As mentioned previously, SPME integrates sampling, extraction, concentration and sample introduction into a single uninterrupted process, avoids the requirement of a clean-up step and results in high sample yield. Methodologies which avoid the requirement of sample clean-up are the second most frequently reported. Sulfuric acid treatment and liquid-liquid partitioning are the purification procedures less reported for the OCPs determination in milk samples.

In an analytical method, several extraction and clean-up steps are combined to achieve maximum analyte recovery with minimal matrix interference. In the pesticide analysis field, recovery rates in the range of 70–120% are considered to be acceptable and can be extended to routine analysis, as recommended by the Codex Alimentarius guidelines (LeDoux, 2011) as well as by the EU Commission guidelines, set in SANCO's procedure "Method Validation and Quality Control Procedures for Pesticide residues analysis in food and feed" (SANCO/12495/2011).

It is possible to observe that almost all the methodologies reported presented good performance characteristics in accordance with the performance acceptability criteria set in SANCO's procedure (SANCO/12495/2011). Even some of the analyzed methodologies presented a deviation $\leq 10\%$ from the recovery value of 100% (Brunetto et al., 1996; Waliszewski et al., 1997; Mihn et al., 2004; Kumar et al., 2006; Behrooz et al., 2009). Some examples are: the methodology reported by Brunetto et al. (1996) based on Soxhlet extraction and SPE clean-up with recovery values in the range of 99–107%; two methodologies grounded in SLE presenting very good recovery values, in the range of 90–99% (Waliszewski et al., 1997) and 86–99% (Kumar et al., 2006), respectively; a liquid-liquid based extraction technique and SPE clean-up, reported by Behrooz et al. (2009), with recoveries in the range of 90–110%; and an SPE methodology with GPC and SPE clean-up, described by Mihn et al. (2004), reporting recoveries that ranged between 90% and 108%. Obviously, the characteristics of each OCP and the number of pesticides included in the same analysis play an important role in the recovery results for an analytical methodology. It is difficult to compare the performance characteristics of different analytical methodologies when all or some of the target compounds are different. Furthermore, in most of the analyzed works, authors do not publish performance characteristics of the analytical methods for each individual pesticide. Comparison between limits of quantification (LOQ) and detection (LOD) for the different methodologies reported is not always possible due to the heterogeneity of the units. Some authors present LOD or LOQ values in a lipid basis while others present them on a whole milk basis. In this sense, researchers should take into account a homogenization of the LOD and LOQ units, according to the international regulations and MRLs established. Comparing the OCP MRLs presented in Table 1, with the LOD and LOQ values (Table 2) expressed in the same units (LOD and LOQ for each pesticide not shown), it is possible to observe that values of LOD and LOQ reported are acceptable, ensuring compliance with the MRLs established by European Commission and Codex Alimentarius, for OCPs residues in milk. Considering results expressed in $\mu\text{g L}^{-1}$ (Table 2), the lowest limits of detection were reported by Fernandez-Alvarez et al. (2008), Azeredo et al. (2008), and Castilla-Pinedo et al. (2010), with values ranging between 0.003–0.016 $\mu\text{g L}^{-1}$, 0.004–0.034 $\mu\text{g L}^{-1}$ and in the range of 0.0001 $\mu\text{g L}^{-1}$, respectively. Azeredo et al. (2008) and Castilla-Pinedo et al. (2010) also present good recovery results while Fernandez-Alvarez et al. (2008) present a maximum recovery value greater than the maxi-

Table 2
Methodologies reported for OCPs determination in milk samples and respective performance characteristics (works published between 1992 and 2012).

Refs.	Matrix	OCPs tested	Extraction procedure	Clean up procedure	Separation technique	Recovery (%)	Anal. features
Alawi et al. (1992)	HM, PcowM, PoM	15	SPE: Florisil Eluent: petroleum ether/ DCM Reconst.: hexane	–	GC-ECD (external standard) GC-MS (confirmation)	n.s.	n.s.
Picó et al. (1995)	HM, IF	26	SPE: octadecylsilica Eluent: hexane	–	GC-ECD GC-MS	44–106 (for HM)	LOD range 0.14–6.36 $\mu\text{g L}^{-1}$ (ECD) and 0.25–10.85 $\mu\text{g L}^{-1}$ (MS)
Brunetto et al. (1996)	HM	2	Soxhlet: n-hexane	SPE: Florisil	GC-ECD (external standard) LC-DAD (confirmation)	99–107	LOD: 0.5 $\mu\text{g L}^{-1}$
Bennett et al. (1997)	LWM	30	LLE ethanol:ethyl acetate	SPE: C ₁₈ cartridges (eluent: acetonitrile) SPE: aminopropyl column (methanol:methylene chloride) Reconst.: acetone	GC-ECD (external standard) GC-MS (internal standard for MS detection: anthracene-d ₁₀ , pyrene-d ₁₀ , chrysene-d ₁₂)	45–111	LOD (ECD) range 0.6–58.6 $\mu\text{g kg}^{-1}$ LOD (MS) range 9–102 $\mu\text{g kg}^{-1}$
Waliszewski et al. (1997)	CowM, Bt	14	SLE: petroleum ether	Conc. sulfuric acid Reconst.: petroleum ether	GC-ECD (external standards)	91–99	LOD range 0.001–0.003 mg kg^{-1}
Schenck and Casanova (1999)	RM	6	LLE: acetonitrile, methanol and acetone	SPE: C ₁₈ column SPE: GCB column (isooctane), for OC pesticides	GC-ECD	68–120	–
Romero and Dorea (2000)	HM	13	LLE: acetone:hexane Reconstitution in n-hexane	SPE: Florisil (hexane:diethylether) and secondly with hexane:diethylether)	GC-ECD (internal standard: hexachorobenzene)	75–120	LOD (lipid basis) range 0.01–0.355 mg kg^{-1}
Röhrig and Meisch (2000)	HM	10	SPME	–	GC-ECD (external standard calibration)	–	LOD range 0.31–3.41 $\mu\text{g L}^{-1}$; LOQ range 1.17–12.92 $\mu\text{g L}^{-1}$
Schinas et al. (2000)	HM	7	LLE: ethyl acetate, methanol and acetone	SPE: C ₁₈ cartridges (isooctane)	GC-ECD (internal standard procedure)	80–113	–
Campoy et al. (2001)	HM	17	Addition of methanol and sodium oxalate LLE: ethyl ether:hexane (extraction procedure repeated twice)	Conc. sulfuric acid SPE: silica Sep-Pak (hexane) and hexane:methanol:isopropanol	GC-ECD GC-MS (confirmation)	n.s.	n.s.
Covaci and Schepens (2001)	HS, UCS, HM, FF, SF	6	SPE: C ₁₈ extraction disk cartridges Eluent: hexane and hexane:DCM	SPE: acid silica cartridge (hexane followed by isooctane)	GC-ECD (internal standard)	70–108 (for OCPs in milk)	LOD range 10–100 ng L^{-1}
Stuetz et al. (2001)	HM	7	LLE: ethyl acetate:acetone:methanol	SPE: octadecyl (C ₁₈)-bonded silica cartridges Conc. sulfuric acid Reconst.: isooctane	GC-ECD (internal standard: aldrin)	83–110	LOD range 0.5–2.5 $\mu\text{g L}^{-1}$
Bates et al. (2002)	HM	6	LLE: hexane:acetone	Partitioning with acetonitrile SPE: Florisil	HRGC–HRMS	–	–
Pandit et al.	M, DP	7	LLE: hexane and acetone	Conc. sulfuric acid	GC-ECD	83–97	LOD range

(continued on next page)

Table 2 (continued)

Refs.	Matrix	OCPs tested	Extraction procedure	Clean up procedure	Separation technique	Recovery (%)	Anal. features
(2002)			(for milk)				0.001–0.003 mg kg ⁻¹
			Soxhlet (for powder milk)	SPE: Florisil (for milk and powder milk)			
Ciscato et al. (2002)	CowM	13	LLE: acetone (partitioning with DCM)	GPC: cyclohexane and ethyl acetate	GC-ECD; GC-NPD; GC-FPD	70–105 (for OCPs)	LOD range 0.002–0.01 mg kg ⁻¹
Prado et al. (2004)	HM	12	Soxhlet: n-hexane (for 8 h)	SPE: chromatographic column packed with Florisil (hexane:DCM)	GC-ECD (external standard)	≥ 80	LOD (lipid basis) range 0.010–0.038 mg kg ⁻¹
				Reconst.: isooctane			
Mihn et al. (2004)	HM	8	SPE: column packed with diatomite earth (diethyl ether)	GPC: hexane:DCM	GC-MS (for TCPMe quantification)	90–108	LOD (lipid basis) range 0.1–1 µg kg ⁻¹
				SPE: Florisil (PCBs and OCPs)	GC-ECD (for the quantification of the others OCPs)		
Focant et al. (2004)	HS; M	11	MSPD: diatomaceous earth (for human milk)	SPE: silica and sulfuric acid silica (hexane)	GC X GC-IDTOFMS	–	LOD range 1–15 µg L ⁻¹
			Eluent: dichloromethane		GC-IDHRMS		
Ghidini et al. (2005)	OM, CM, MP	24	SPE: ready-to-use Chem Elut CE 1005 (for milk ssmple)	SPE: Florisil (for milk samples)	GC-ECD; GC-MS (for confirmation)	–	LOD: 0.2 µg L ⁻¹ (for milk); LOQ: 0.4 µg L ⁻¹ (for milk)
Poon et al. (2005)	AT, HM	17	LLE: acetane:hexane	GPC: preswollen (dichloromethane)	GC-MS	89 (for DDTs)	n.s.
Jaraczewska et al. (2006)	UCS, HS, HM	10	SPE: Oasis™ SPE cartridge	SPE: acid silica (DCM)	GC-MS (ECNI mode, internal standard, for OCPs and PCBs analysis)	70–102 (milk)	LOQ (lipid basis) range 0.5–4 µg kg ⁻¹ (for PCBs, OCPs and PBDEs)
			Eluent: DCM (for milk samples)	Reconst.: isooctane (for milk samples)			
Kumar et al. (2006)	HM	7	SLE: DCM	SPE: Florisil (n-hexane/DCM)	GC-ECD (external standard)	86–99	LOD: 0.001 mg L ⁻¹ ; LOQ: 0.01 mg L ⁻¹
				Reconst.: n-hexane			
Yu et al. (2006)	HM	6	LLE: hexane and acetone	Conc sulfuric acid	n.s.	80–120	n.s.
Yu et al. (2007)	HM (colostrum and mature milk)	4	LLE: 5% natrium oxalate solution, ethanol, diethyl ether and finally hexane	SPE: Florisil-silica gel column (DCM:hexane)	GC-ECD (external standard)	n.s.	LOD (lipid basis): 0.055–0.747 µg kg ⁻¹ (for colostrum)
			The resulting aqueous phase was extract with hexane		HRGC/LRMS-SIM (for confirmation in problematic cases)		LOD (lipid basis): 0.101–0.683 µg kg ⁻¹ (for mature milk)
Tsydenova et al. (2007)	HM	13	SPE: diatomaceous earth (diethyl ether)	GPC: Bio-Bead S-X 3	GC-ECD (for OCPs quantification, external standard)	60–120 (for ¹³ C ₁₂ -labeled BDEs)	n.s.
				SPE: Florisil (first fraction eluted with hexane and second fraction eluted with DCM:hexane)	GC-MS (for TCPMe quantification)		
Mueller et al. (2008)	HM	17	LLE (acetone:hexane)	GPC SPE: Florisil	HRGC/HRMS (internal standard: ¹³ C _x surrogate standards – ES-5021 labeled compound surrogate solution)	n.s.	n.s.
Fernandez-Alvarez et al., (2008)	CowM	19	SPME	–	GC-µECD (external standard)	76–139 (corresponding only to OCP values)	LOD range 0.003–0.16 µg L ⁻¹ ; LOQ range 0.010–0.52 µg L ⁻¹
Azereido	HM	3	LLE: ethyl	SPE: C ₁₈ solid SPE cartridge	GC-ECD (internal)	82–103	LOD range

Table 2 (continued)

Refs.	Matrix	OCPs tested	Extraction procedure	Clean up procedure	Separation technique	Recovery (%)	Anal. features
et al. (2008)			acetate:acetone:methanol	(n-hexane) SPE: Florisil	standard: DCN)		0.0040–0.0340 $\mu\text{g L}^{-1}$
Der Parsehian et al., (2008)	HM	23	SPE: Florisil (methylene chloride and petroleum ether)	–	GC-ECD	n.s.	LOD range 0.3–1.3 $\mu\text{g L}^{-1}$
Sharaf et al. (2008)	HM, HS, UCS, AT	10	SPE: Florisil (diethyl ether:petroleum ether)	–	GC-ECD (external standard)	83–91	LOQ range 0.003–0.017 $\mu\text{g kg}^{-1}$
Rodas-Ortiz et al., (2008)	HM	26	LLE: hexane	SPE: Florisil (first fraction: hexane; second fraction: hexane:DCM)	GC-ECD	n.s.	n.s.
Allé et al. (2009)	HM, AT	10	SPE: Florisil	–	GC-ECD	n.s.	LOD (lipid basis): 5 ng kg^{-1}
Ashnagar et al. (2009)	CowM	7	Eluent: petroleum benzene:DCM Reconst.: hexane LLE (addition of aqueous potassium oxalate solution followed by methanol, diethyl ether and finally n-hexane)	LLE: Petroleum:acetonitrile	HPLC-UV	n.s.	n.s.
Behrooz et al. (2009)	HM	10	LLE: n-hexane:DCM after addition of formic acid	SPE: silica, impregnated with concentrated sulfuric acid (44% w/w) (eluted with n-hexane followed by DCM) Reconst.: isoctane	GC-ECD	90–110	LOQ (lipid basis) range 0.01–0.2 $\mu\text{g kg}^{-1}$
Haraguchi et al. (2009)	HM	9	Addition of calcium oxalate solution and ethanol:diethylether LLE: n-hexane	GPC: Bio-Beads S-X3 SPE: silica gel (n-hexane:DCM)	GC-MS	n.s.	LOQ (lipid basis): 0.1–2.5 $\mu\text{g g}^{-1}$
Qu et al. (2010)	B, UCB, S, HM	10	HCl and 2-propanol were added to the sample	Conc. sulfuric acid SPE: silica/sulfuric acid column (eluted with hexane:DCM) Reconst.: hexane	GC-MS (internal standard: PCNB)	76 (for surrogate standards)	LOD (lipid basis) range 0.5–0.8 $\mu\text{g kg}^{-1}$
Castilla-Pinedo et al. (2010)	PM	20	LLE: hexane:DCM SPE: C ₁₈ cartridge(hexane:acetone)	–	GC- μ ECD (external standard) GC-MS(for confirmation)	≥ 80	LOD in the range of 0.0001 $\mu\text{g L}^{-1}$; LOQ: 0.02 $\mu\text{g L}^{-1}$
Fujii et al. (2011)	HM	5	Addition of potassium oxalate solution and ethanol:diethylether LLE: n-hexane	GPC: Bio-Beads S-X3	GC-MS	84–94	LOD (lipid basis): 0.005–0.05 $\mu\text{g kg}^{-1}$ LOQ (lipid basis): 0.01–0.10 $\mu\text{g kg}^{-1}$
Zhou et al. (2011)	HM	23	Soxhlet: n-hexane:DCM (24 h)	GPC: low pressure column SPE: Florisil Reconst.: hexane	GC-NCI-MS (internal standard: ¹³ C ₁₂ -labeled)	85–130	LOD (lipid basis) range 0.05–3.00 $\mu\text{g kg}^{-1}$
Kampire et al. (2011)	FCowM, PCowM	8	LLE: petroleum ether Reconst.: hexane	– SPE: Florisil (n-hexane) – Reconst.: cyclohexane	GC-ECD (external standard) GC-MS (for confirmation)	78–95 (fresh milk) 78–94 (pasteurized milk)	LOD (lipid basis) range 0.01–0.04 $\mu\text{g kg}^{-1}$; LOQ range 0.01–0.04 $\mu\text{g kg}^{-1}$
Mezcua et al. (2007)	M-basedIF	4	PLE: acetonitrile	–	GC-MS/MS	87–110 (for OC pesticides)	LOD range 0.03–

(continued on next page)

Table 2 (continued)

Refs.	Matrix	OCs tested	Extraction procedure	Clean up procedure	Separation technique	Recovery (%)	Anal. features
Bulut et al. (2011)	CowM, BuM, ShM	19	LLE: hexane/acetone	- SPE: Florisil (diethyl ether:petroleum ether) - Reconst.: hexane	GC-ECD	71–98	0.21 $\mu\text{g kg}^{-1}$; LOQ range 0.10– 2.60 $\mu\text{g kg}^{-1}$ n.s.
Jeong et al. (2012)	M	6	QuEChERS	-	GC-ECD	72–90, for OC pesticides	LOD range 0.52– 1.50 $\mu\text{g kg}^{-1}$; LOQ range 1.72– 5.00 $\mu\text{g kg}^{-1}$
Hassine et al. (2012)	HM	7	LLE: n-hexane:acetonitrile:ethanol	SPE: Florisil (DCM:n-hexane)	HRGC-ECD	79–100	LOD ranged 0.5–1 $\mu\text{g kg}^{-1}$ (lipid basis)
Bergkvist et al. (2012)	HM	8	LLE: methyl tert-butyl ether/hexane	SPE: acid silica	GC-MS	79–106	LOQ ranged 0.010– 0.300 $\mu\text{g kg}^{-1}$
Luzardo et al. (2012)	CM, OM	21	SPE: C ₁₈ cartridge Eluent: hexane	GPC: fluorinated divinylbenzene (DCM) SPE: silica gel (DCM:hexane and then methanol:DCM)	GC-MS	n.s.	LOQ in the range of 10 $\mu\text{g L}^{-1}$

Abbreviations: AT – adipose tissue; B – blood; Bt – butter; BuM – buffalo's milk; CM – conventional milk; CowM – Cow's milk; MS – maternal serum; DB – dolphin blubber; DCM – dichloromethane; DCN – dichloronaphthalene; DP – dairy products; ECD – electron capture detection; ECNI – electron-capture negative ionization; FcowM – fresh cow's milk; FF – follicular fluid; FPD – GC – gas chromatography; GCB – graphitized carbon black; GPC – gel permeation chromatography; HCl – hydrochloric acid; HL – hake liver; HM – human milk; HMT – herring muscle tissue; HPLC – high performance liquid chromatography; HRGC – high resolution gas chromatography; HRMS – high resolution mass spectrometry; HS – human serum; IF – infant formulas; LC – liquid chromatography; LLE – liquid-liquid extraction; LOD – limit of detection; LOQ – limit of quantification; LWM – liquid whole milk; M – milk; M-basedIF – milk-based infant formulas; MP – meat products; MS – mass spectrometry; n.s. – not specified; NCI – negative chemical ionization; NPD – nitrogen phosphorus detection; OM – organic milk; PCBs – polychlorinated biphenyls; PcowM – pasteurized cow's milk; PCNB – pentachloronitrobenzene; PM – pasteurized milk; PoM – powder milk; Reconst. – reconstitution; RM – raw milk; S – serum; SF – seminal fluid; ShM – sheep's milk; SIM – selective ion monitoring; SLE – solid-liquid extraction; SPE – solid-phase extraction; SPME – solid-phase microextraction; TCPMe – tris(4-chlorophenyl)methane; UCB – umbilical cord blood; UCS – umbilical cord serum; UV – ultraviolet.

Table 3

Protocols used in different sample preparation techniques: LLE, SPE, and SPME (Alpendurada, 2000).

LLE	SPE	SPME
Addition of organic solvents to the sample	Conditioning of cartridges or membranes	Exposing SPME fiber to the sample
Agitation in a separatory funnel	Sample elution	Desorption of analytes in the analytical instrument
Separation of aqueous and organic phases	Solvent elution to remove interferences and analyte desorption	
Removal of organic phase	Evaporation/concentration of the organic phase	
Evaporation/concentration of the organic phase	Injection in the analytical instrument	
Injection in the analytical instrument		

imum recovery value acceptable by the Codex Alimentarius and EU commission guidelines. Regarding limits of detection expressed in $\mu\text{g kg}^{-1}$ or mg kg^{-1} (Table 2), Mezcua et al. (2007) reported a methodology based on PLE which presented the lowest LOD values (0.030–0.210 $\mu\text{g kg}^{-1}$), with also good recovery values (87–110%). The lowest LOQ value was obtained with SPE based methodology reported by Sharaf et al. (2008), in the range of 0.003–0.017 $\mu\text{g kg}^{-1}$. LOD values were not published and good recovery values were likewise obtained with this methodology. As in the case of the recovery values, the comparison of the LOD and LOQ values between different methodologies is difficult, since analytical methods are not always developed for the determination of the same target compounds, as stated above.

6. Conclusions

The determination of POPs such as organochlorine pesticides is extremely important to protect environment and human health, since they are lipophilic compounds with high resistance to degra-

tion and long half-lives in humans. Consequently, reliable methods with sufficiently low detection limits are required to support monitoring and regulatory enforcement.

One analytical challenge in this field is to present consistent results, following official guidelines, as fast as possible and considering method characteristics such as recovery, accuracy, sensitivity and specificity. Conventional extraction methodologies, such as LLE, Soxhlet and clean-up procedures are tedious, time consuming, require considerable handling and use large volumes of solvents. However, these methodologies are still used due to their reliability.

Increasing attention, nowadays, is pointed to techniques which are environmentally friendly by minimizing the use of organic solvents and hazardous waste production. Advances in sample preparation are intended to save employee labor and time, reduce the cost per sample and at the same time, improve the efficiency of the analyte isolation. Recent researches have focused on the development of efficient, economical and miniaturized sample preparation methods. Microextraction methods have attracted much attention in the recent years as alternatives for classic extraction

procedures. Although these analytical trends, new extraction methods have not been thoroughly evaluated for OCPs determination in milk. Traditional methods are still providing promising approaches for the OCPs extraction in milk samples.

According to the current situation, extraction methods should be methodically evaluated to find one that is fast and effective for the determination of OCPs in milk.

Concerning clean-up methods, the methodologies that do not require a clean-up step are preferred since they are faster and less laborious. Nevertheless, they are not always effective. SPE is the most common procedure. It is an effective clean-up method but is dependent on the quality of the sorbents, the extraction solvents and all materials that enter into contact with the sample.

Economic issues for each method were not evaluated. The choice of one of them and especially of an extraction procedure will depend on each specific case as well as on the ultimate aim. The properties of the OCPs and the matrix are the decisive factor for the selection of the appropriate technique for pesticide determination. Nevertheless, the properties and concentrations of interfering compounds, the time required for analysis and sample preparation simplicity of an extraction technique are also important. Finally, the laboratory equipment, the economic support for the investigation, and the experience of the researcher are other factors which play an important role in the choice of the methodologies for determination of OCPs in milk. In conclusion, more research is needed to achieve the ideal method for OCPs determination in milk samples.

References

- Aguilera-Luiz, M.M., Plaza-Bolaños, P., Romero-González, R., Vidal, J.L.M., Frenich, A.G., 2011. Comparison of the efficiency of different extraction methods for the simultaneous determination of mycotoxins and pesticides in milk samples by ultra high-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Anal. Bioanal. Chem.* 399, 2863–2875.
- Alawi, M.A., Ammari, N., Al-Shuraiqi, Y., 1992. Organochlorine pesticide contaminations in human milk samples from women living in Amman, Jordan. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 23, 235–239.
- Allié, A., Dembellé, A., Yao, B., Ado, G., 2009. Distribution of organochlorine pesticides in human breast milk and adipose tissue from two locations in Côte d'Ivoire. *Asian J. Appl. Sci.* 2 (5), 456–463.
- Alpendurada, M.F., 2000. Solid-phase microextraction: a promising technique for sample preparation in environmental analysis. *J. Chromatogr., A* 889, 3–14.
- Arthur, C.L., Pawliszyn, J., 1990. Solid-phase microextraction with thermal desorption using fused silica optical fibers. *Anal. Chem.* 62, 2145–2148.
- Ashnagar, A., Naseri, N.C., Farnad, M.C., 2009. Determination of organochlorine pesticide residues in cow's milk marketed in Ahwaz city of Iran. *Int. J. PharmTech Res.* 1 (2), 247–251.
- Azeredo, A., Torres, J.P.M., Fonseca, M.F., Britto, J.L., Bastos, W.R., Silva, C.E.A., Cavalcanti, G., Meire, R.O., Sarcinelli, P.N., Claudio, L., Markowitz, S., Malm, O., 2008. DDT and its metabolites in breast milk from Madeira River basin in the Amazon, Brazil. *Chemosphere* 73, S246–S251.
- Balasubramanian, S., Panigrahi, S., 2011. Solid-phase microextraction (SPME) techniques for quality characterization of food products: a review. *Food Bioproc. Technol.* 4, 1–26.
- Bates, M.N., Thomson, B., Thomson, N., 2002. Reduction in organochlorine levels in the milk of New Zealand women. *Arch. Environ. Health: Int. J.* 57 (6), 591–597.
- Behrooz, R.D., Sari, A.E., Bahramifar, N., Naghdi, F., Shahriyari, A.R., 2009. Organochlorine pesticide and polychlorinated biphenyl residues in human milk from Tabriz, Iran. *Toxicol. Environ. Chem.* 91 (8), 1455–1468.
- Bennett, D.A., Chung, A.C., Lee, S.M., 1997. Multiresidue method for analysis of pesticides in liquid whole milk. *J. AOAC Int.* 80 (5), 1065–1077.
- Bergkvist, C., Aune, M., Nilsson, I., Sandanger, T.M., Hamadani, J.D., Tofail, F., Oyvind-Odland, J., Kabir, I., Vahter, M., 2012. Occurrence and levels of organochlorine compounds in human breast milk in Bangladesh. *Chemosphere* 88, 784–790.
- Bouwman, H., Sereda, B., Meinhardt, H.M., 2006. Simultaneous presence of DDT and pyrethroid residues in human breast milk from a malaria endemic area in South Africa. *Environ. Pollut.* 144, 902–917.
- Brunetto, R., León, A., Burguera, J.L., Burguera, M., 1996. Levels of DDT residues in human milk of Venezuelan women from various rural populations. *Sci. Total Environ.* 186, 203–207.
- Bulut, S., Akkaya, L., Gök, V., Konuk, M., 2011. Organochlorine pesticide (OCP) residues in cow's, buffalo's, and sheep's milk from Afyonkarahisar region, Turkey. *Environ. Monit. Assess.* 181, 555–562.
- Campoy, C., Jiménez, M., Olea-Serrano, M.F., Frias, M.M., Cañabate, F., Olea, N., Bayés, R., Molina-Font, J.A., 2001. Analysis of organochlorine pesticides in human milk: preliminary results. *Early Human Development* 65 (Suppl.), S183–S190.
- Castilla-Pinedo, Y., Alvis-Estrada, L., Alvis-Guzmán, N., 2010. Exposición a organoclorados por ingesta de leche pasteurizada comercializada en Cartagena, Colombia. *Rev. Salud Pública* 12 (1), 14–26.
- Chao, H.-R., Wang, S.-L., Lin, T.-C., Chung, X.-H., 2006. Levels of organochlorine pesticides in human milk from central Taiwan. *Chemosphere* 62, 1774–1785.
- Choi, M.P.K., Kang, Y.H., Peng, X.L., Ng, K.W., Wong, M.H., 2009. Stockholm Convention organochlorine pesticides and polycyclic aromatic hydrocarbons in Hong Kong air. *Chemosphere* 77, 714–719.
- Chung, S.W.C., Chen, B.L.S., 2011. Determination of organochlorine pesticide residues in fatty foods: a critical review on the analytical methods and their testing capabilities. *J. Chromatogr., A* 1218, 5555–5567.
- Ciscato, C.H.P., Gebara, A.B., Spinosa, H.S., 2002. Pesticide residues in cow milk consumed in São Paulo city (Brazil). *J. Environ. Sci. Health B37* (4), 323–330.
- Codex Alimentarius, 2012. <<http://www.codexalimentarius.org/standards/pesticide-mrls/en/>> (accessed July, 2012).
- Covaci, A., Schepens, P., 2001. Solid phase disk extraction method for the determination of persistent organochlorine pollutants in human body fluids. *Anal. Lett.* 34 (9), 1449–1460.
- Der Parsehian, S., 2008. Plaguicidas organoclorados en leche maternal. *Rev. Hosp. Mat. Inf. Ramón Sardá* 27 (2), 70–78.
- Esteban, M., Castaño, A., 2009. Non-invasive matrices in human biomonitoring: a review. *Environ. Int.* 35, 438–449.
- European Commission SANCO/12495/2011. Method Validation and Quality Control Procedures for Pesticide Residues Analysis in Food and Feed. <<http://www.eurl-pesticides.eu/docs/public/tmplArticle.asp?CntID=727&LabID=100&Lang=EN>> (accessed July, 2012).
- European Parliament and Council, Regulation (EC) No. 396/2005 of the European Parliament and of the Council of 23 February 2005 on Maximum Residue Levels of Pesticides in Products of Plant and Animal Origin and Amending Council Directive 91/414/ECC. *Off. J. Eur. Commun. L* 70 of 16/03/2005, 1–16 (accessed July, 2012).
- Fernandez-Alvarez, M., Llompарт, M., Lamas, J.P., Lores, M., Garcia-Jares, C., Cela, R., Dagnac, T., 2008. Development of a solid-phase microextraction gas chromatography with microelectron-capture detection method for a multiresidue analysis of pesticides in bovine milk. *Anal. Chim. Acta* 617, 37–50.
- Focant, J.-F., Sjödin, A., Turner, W.E., Patterson Jr., D.G., 2004. Measurement of selected polybrominated diphenyl ethers, polybrominated and polychlorinated biphenyls and organochlorine pesticides in human serum and milk using comprehensive two-dimensional gas chromatography isotope dilution time-of-flight mass spectrometry. *Anal. Chem.* 76, 6313–6320.
- Fujii, Y., Haraguchi, K., Harada, K.H., Hitomi, T., Inoue, K., Itoh, Y., Watanabe, T., Takenaka, K., Uehara, S., Yang, H.-R., Kim, M.-Y., Moon, C.-S., Kim, H.-S., Wang, P., Liu, A., Hung, N.N., Koizumi, A.A., 2011. Detection of dicofol and related pesticides in human breast milk from China, Korea and Japan. *Chemosphere* 82, 25–31.
- García-López, M., Canosa, P., Rodríguez, I., 2008. Trends and recent applications of matrix solid-phase dispersion. *Anal. Bioanal. Chem.* 391, 963–974.
- Ghidini, S., Zanardi, E., Battaglia, A., Varisco, G., Ferretti, E., Campanini, G., Chizzolini, R., 2005. Comparison of contaminant and residue levels in organic and conventional milk and meat products from Northern Italy. *Food Addit. Contam.* 22 (1), 9–14.
- Gilbert-López, B., García-Reyes, J.F., Molina-Díaz, A., 2009. Sample treatment and determination of pesticide residues in fatty vegetable matrices: a review. *Talanta* 79, 109–128.
- Greizerstein, H.B., Stinson, C., Mendola, P., Buck, G.M., Kostyniak, P.J., Vena, J.E., 1999. Comparison of PCB congeners and pesticide levels between serum and milk from lactating women. *Environ. Res. Section A* 80, 280–286.
- Haraguchi, K., Koizumi, A., Inoue, K., Harada, K.H., Hitomi, T., Minata, M., Tanabe, M., Kato, Y., Nishimura, E., Yamamoto, Y., Watanabe, T., Takenaka, K., Uehara, S., Yang, H.-R., Kim, M.-Y., Moon, C.-S., Kim, H.-S., Wang, P., Liu, A., Hung, N.N., 2009. Levels and regional trends of persistent organochlorines and polybrominated diphenyl ethers in Asian breast milk demonstrate POPs signatures unique to individual countries. *Environ. Int.* 35, 1072–1079.
- Hassine, S.B., Ameur, W.B., Gandoura, N., Driss, M.R., 2012. Determination of chlorinated pesticides, polychlorinated biphenyls, and polybrominated diphenyl ethers in human milk from Bizerte (Tunisia) in 2010. *Chemosphere* 89, 369–377.
- Jaraczewska, K., Lulek, J., Covaci, A., Voorspoels, S., Kaluba-Skotarczak, A., Drews, K., Schepens, P., 2006. Distribution of polychlorinated biphenyls, organochlorine pesticides and polybrominated diphenyl ethers in human umbilical cord serum, maternal serum and milk from Wielkopolska region, Poland. *Sci. Total Environ.* 372, 20–31.
- Jeong, I.-S., Kwak, B.-M., Ahn, J.-H., Jeong, S.-H., 2012. Determination of pesticide residues in milk using a QuEChERS-based method developed by response surface methodology. *Food Chem.* 133 (2), 473–481.
- Kampire, E., Kiremire, B.T., Nyanzi, S.A., Kishimba, M., 2011. Organochlorine pesticide in fresh and pasteurized cow's milk from Kampala markets. *Chemosphere* 84, 923–927.
- Kataoka, H., Lord, H.L., Pawliszyn, J., 2000. Applications of solid-phase microextraction in food analysis. *J. Chromatogr., A* 880, 35–62.
- Kumar, A., Dayal, P., Shukla, G., Singh, G., Joseph, P.E., 2006. DDT and HCH residue load in mother's breast milk: a survey of lactating mother's from remote villages in Agra region. *Environ. Int.* 32, 248–251.

- Lañbropoulou, D.A., Albanis, T.A., 2007. Methods of sample preparation for determination of pesticide residues in food matrices by chromatography–mass spectrometry-based techniques: a review. *Anal. Bioanal. Chem.* 389, 1663–1683.
- LeDoux, M., 2011. Analytical methods applied to the determination of pesticide residues in foods of animal origin. A review of the past two decades. *J. Chromatogr., A* 1218, 1021–1036.
- López, F.J., Pitarch, E., Egea, S., Beltran, J., Hernández, F., 2001. Gas chromatographic determination of organochlorine and organophosphorus pesticides in human fluids using solid phase microextraction. *Anal. Chim. Acta* 433, 217–226.
- Luzardo, O.P., Almeida-González, M., Henríquez-Hernández, L.A., Zumbado, M., Álvarez-León, E.E., Boada, L.D., 2012. Polychlorobiphenyls and organochlorine pesticides in conventional and organic brands of milk: occurrence and dietary intake in the population of the Canary Islands (Spain). *Chemosphere* 88, 307–315.
- Martins, J., Esteves, C., Lima-Faria, A., Barros, P., Ribeiro, N., Simões, T., Correia, M., Delerue-Matos, C., 2011a. Multiresidue method for the determination of organophosphorus pesticides in still wine and fortified wine using solid-phase microextraction and gas chromatography–tandem mass spectrometry. *Anal. Lett.* 44 (6), 1021–1035.
- Martins, J., Esteves, C., Simões, T., Correia, M., Delerue-Matos, C., 2011b. Determination of 24 pesticide residues in fortified wines by solid-phase microextraction and gas-chromatography–tandem mass spectrometry. *J. Agric. Food Chem.* 59 (3), 6847–6855.
- Martins, J., Esteves, C., Lima-Faria, A., Barros, P., Ribeiro, N., Simões, T., Correia, M., Delerue-Matos, C., 2012. Analysis of six fungicides and one acaricide in still and fortified wines using solid-phase microextraction–gas chromatography/tandem mass spectrometry. *Food Chem.* 132 (1), 630–636.
- Mezcua, M., Repetti, M.R., Agüera, A., Ferrer, C., García-Reyes, J.F., Fernández-Alba, A.R., 2007. Determination of pesticides in milk-based infant formulas by pressurized liquid extraction followed by gas chromatography tandem mass spectrometry. *Anal. Bioanal. Chem.* 389, 1833–1840.
- Viège, C., Dugay, J., 1998. Solid-phase microextraction and gas chromatography for rapid analysis of pesticides. *Anal. Mag.* 26 (6), M137–M143.
- Mihn, N.H., Someya, M., Minh, T.B., Kunisue, T., Iwata, H., Watanabe, M., Tanabe, S., Viet, P.H., Tuyen, B.C., 2004. Persistent organochlorine residues in human breast milk from Hanoi and Hochiminh city, Vietnam: contamination, accumulation kinetics and risk assessment for infants. *Environ. Pollut.* 129, 431–441.
- Vueller, J.F., Harden, F., Toms, L.-M., Symons, R., Fürst, P., 2008. Persistent organochlorine pesticides in human milk samples from Australia. *Chemosphere* 70, 712–720.
- Yjeda, C.B., Rojas, F.S., 2011. Separation and preconcentration by dispersive liquid–liquid microextraction procedure: recent applications. *Chromatographia* 74, 651–679.
- Yadrón, M.E.T., Ferrera, Z.S., Rodríguez, J.J.S., 2006. Optimisation of solid-phase microextraction coupled to HPLC–UV for the determination of organochlorine pesticides and their metabolites in environmental liquid samples. *Anal. Bioanal. Chem.* 386, 332–340.
- Yandit, G.G., Sharma, S., Srivastava, P.K., Sahu, S.K., 2002. Persistent organochlorine pesticide residues in milk and dairy products in India. *Food Addit. Contam.* 19 (2), 153–157.
- Yicó, Y., Viana, E., Font, G., Mañes, J., 1995. Determination of organochlorine pesticide content in human milk and infant formulas using solid phase extraction and capillary gas chromatography. *J. Agric. Food Chem.* 43 (6), 1610–1616.
- Yicó, Y., Fernández, M., Ruiz, M.J., Font, G., 2007. Current trends in solid-phase-based extraction techniques for the determination of pesticides in food and environment. *J. Biochem. Biophys. Methods* 70, 117–131.
- Yolder, A., Odland, J.O., Tkachev, A., Føreid, S., Savinova, T.N., Skaare, J., 2003. Geographic variation of chlorinated pesticides, toxaphenes and PCBs in human milk from sub-arctic and arctic locations in Russia. *Sci. Total Environ.* 306, 179–195.
- Yoon, B.H.T., Leung, C.K.M., Wong, C.K.C., Wong, M.H., 2005. Polychlorinated biphenyls and organochlorine pesticides in human adipose tissue and breast milk collected in Hong Kong. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 49, 274–282.
- Yrado, G., Díaz, G., Noa, M., Méndez, I., Cisneros, I., Castorena, F., Pinto, M., 2004. Niveles de pesticidas organoclorados en leche humana de la Ciudad de México. *Agro Sur* 32 (2), 60–69.
- Yrado, G., González, G.D., Tolentino, R.G., León, S.V., Pérez, M.N., García, E.C., 2007. Residuos de plaguicidas organoclorados en leche de cabra de Querétaro, Querétaro, México. *Vet. México* 28 (3), 291–301.
- Yu, W., Suri, R.P.S., Bi, X., Sheng, G., Fu, J., 2010. Exposure of young mothers and newborns to organochlorine pesticides (OCPs) in Guangzhou, China. *Sci. Total Environ.* 408, 3133–3138.
- Yaynie, D.E., 2006. Modern extraction techniques. *Anal. Chem.* 78 (12), 3997–4003.
- Real, M., Ramírez, A., Pérez, E., Noa, M., 2005. Residuos de plaguicidas organoclorados en leche cruda y pasteurizada de la Zona Metropolitana de Guadalajara, México. *Rev. Salud Anim.* 27 (1), 48–54.
- Rodas-Ortiz, J.P., Ceja-Moreno, V., González-Navarrete, R.L., Alvarado-Mejía, J., Rodríguez-Hernández, M.E., Gould-Bouchot, G., 2008. Organochlorine pesticides and polychlorinated biphenyls levels in human milk from Chelem, Yucatán, México. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 80, 255–259.
- Rodrigues, F.M., Mesquita, P.R.R., Oliveira, L.S., Oliveira, F.S., Filho, A.M., Pereira, P.A.P., Andrade, J.B., 2011. Development of a headspace solid-phase microextraction/gas chromatography–mass spectrometry method for determination of organophosphorus pesticide residues in cow milk. *Microchem. J.* 98 (1), 56–61.
- Röhrig, L., Meisch, H.-U., 2000. Application of solid phase micro extraction for the rapid analysis of chlorinated organics in breast milk. *Fresenius J. Anal. Chem.* 366, 106–111.
- Romero, M.L.L., Dorea, J.G., 2000. Concentrations of organochlorine pesticides in milk of Nicaraguan mothers. *Arch. Environ. Health* 55 (4), 274–278.
- Sannino, A., Bolzoni, L., Bandini, M., 2004. Application of liquid chromatography with electrospray tandem mass spectrometry to the determination of a new generation of pesticides in processed fruits and vegetables. *J. Chromatogr., A* 1036, 161–169.
- Schenck, F.J., Casanova, J., 1999. Rapid screening for organochlorine and organophosphorus pesticides in milk using C18 and graphitized carbon black solid phase extraction clean-up. *J. Environ. Sci. Health B34* (3), 349–362.
- Schinas, V., Leotsinidis, M., Alexopoulos, A., Tsapanos, V., Kondakis, X.G., 2000. Organochlorine pesticide residues in human breast milk from Southwest Greece: associations with weekly food consumption patterns of mothers. *Arch. Environ. Health: Int. J.* 55 (6), 411–417.
- Sharaf, N.E., Elserougy, S.M., Hussein, A.S.E.-D.A., 2008. Organochlorine pesticides in breast milk and other tissues of some Egyptian mothers. *American-Eurasia J. Agric. Environ. Sci.* 4 (4), 434–442.
- Smith, R.M., 2003. Before the injection – modern methods of sample preparation for separation techniques. *J. Chromatogr., A* 1000, 3–27.
- Stockholm Convention, 2009. <<http://chm.pops.int/Convention/ThePOPs/ListingofPOPs/tabid/2509/Default.aspx>> (accessed June, 2012).
- Stuetz, W., Prapamontol, T., Erhardt, J.G., Classen, H.G., 2001. Organochlorine pesticide residue in human milk of a Hmong hill tribe in Northern Thailand. *Sci. Total Environ.* 273, 53–60.
- Tsydenova, O.V., Sudaryanto, A., Kajiwaru, N., Kunisue, T., Batoev, V.B., Tanabe, S., 2007. Organohalogen compounds in human breast milk from Republic of Buryatia, Russia. *Environ. Pollut.* 146, 225–232.
- Tue, N.M., Sudaryanto, A., Minh, T.B., Nhat, B.H., Isobe, T., Takahashi, S., Viet, P.H., Tanabe, S., 2010. Kinetic differences of legacy organochlorine pesticides and polychlorinated biphenyls in Vietnamese human breast milk. *Chemosphere* 81, 1006–1011.
- Vidal, J.L.M., Plaza-Bolaños, P., Romero-González, R., Frenich, A.G., 2009. Determination of pesticide transformation products: a review of extraction and detection methods. *J. Chromatogr., A* 1216, 6767–6788.
- Waliszewski, S.M., Sedas, V.T.P., Infanzón, R.M., Rivera, J., 1995. Determination of organochlorine pesticide residues in human adipose tissue: 1992 study in Mexico. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 55, 43–49.
- Waliszewski, S.M., Pardío, V.T., Waliszewski, K.N., Chantiri, J.N., Aguirre, A.A., Infanzón, R.M., Rivera, J., 1997. Organochlorine pesticide residues in cow's milk and butter in Mexico. *Sci. Total Environ.* 208, 127–132.
- Waliszewski, S.M., García, X.M., Infanzón, R.M., Dermitz, D.M.B., Zarrabal, O.C., 2008. Uso del ácido sulfúrico en las determinaciones de plaguicidas organoclorados. I. Calidad química-analítica de la precipitación de grasas por el ácido sulfúrico concentrado en muestras con alto contenido de lípidos. *Rev. Int. Contam. Amb.* 24 (1), 33–38.
- Wang, X.P., Xu, B.O., Kang, S.C., Cong, Z.Y., Yao, T.D., 2008. The historical residue trends of DDT, hexachlorocyclohexanes and polycyclic aromatic hydrocarbons in an ice core from Mt. Everest, central Himalayas, China. *Atmos. Environ.* 42, 6699–6709.
- Wilkowska, A., Biziuk, M., 2011. Determination of pesticide residues in food matrices using the QuEChERS methodology. *Food Chem.* 125, 803–812.
- Yu, H.-F., Zhao, X.-D., Zhao, J.-H., Zhu, Z.-Q., Zhao, Z., 2006. Continuous surveillance of organochlorine pesticides in human milk from 1983 to 1998 in Beijing, China. *Int. J. Environ. Health Res.* 16 (1), 21–26.
- Yu, Z., Palkovicova, L., Drobna, B., Petrik, J., Kocan, A., Trnovec, T., Hertz-Picciotto, I., 2007. Comparison of organochlorine compound concentrations in colostrum and mature milk. *Chemosphere* 66, 1012–1018.
- Zhou, P., Wu, Y., Yin, S., Li, J., Zhao, Y., Zhang, L., Chen, H., Liu, Y., Yang, X., Li, X., 2011. National survey of the levels of persistent organochlorine pesticides in the breast milk of mothers in China. *Environ. Pollut.* 159, 524–531.
- Zwir-Ferenc, A.Z., Biziuk, M., 2004. An analysis of pesticides and polychlorinated biphenyls in biological samples and foods. *Crit. Rev. Anal. Chem.* 34, 95–103.

7.1.2. Artículo enviado

7.1.2.1. Carta de confirmación de envío

From: **Chemosphere** <chem-ee@elsevier.com>
Date: 2015-11-09 9:52 GMT-06:00
Subject: Thank you for your submission to Chemosphere
To: aamayac@uaemex.mx, amayacha8789@gmail.com

Dear Dr. Amaya-Chávez,

Thank you for sending your manuscript Infants' exposition to organochlorine pesticides through breast milk contaminated. A case study of two Mexican populations for consideration to Chemosphere. Please accept this message as confirmation of your submission.

When should I expect to receive the Editor's decision?

We publicly share the average editorial times for Chemosphere to give you an indication of when you can expect to receive the Editor's decision. These can viewed here: http://journalinsights.elsevier.com/journals/0045-6535/review_speed

What happens next?

Here are the steps that you can expect as your manuscript progresses through the editorial process in the Elsevier Editorial System (EES).

1. First, your manuscript will be assigned to an Editor and you will be sent a unique reference number that you can use to track it throughout the process. During this stage, the status in EES will be "With Editor".
2. If your manuscript matches the scope and satisfies the criteria of Chemosphere, the Editor will identify and contact reviewers who are acknowledged experts in the field. Since peer-review is a voluntary service, it can take some time but please be assured that the Editor will regularly remind reviewers if they do not reply in a timely manner. During this stage, the status will appear as "Under Review". Once the Editor has received the minimum number of expert reviews, the status will change to "Required Reviews Complete".
3. It is also possible that the Editor may decide that your manuscript does not meet the journal criteria or scope and that it should not be considered further. In this case, the Editor will immediately notify you that the manuscript has been rejected and may recommend a more suitable journal.

For a more detailed description of the editorial process, please see Paper Lifecycle from Submission to Publication: http://help.elsevier.com/app/answers/detail/a_id/160/p/8045/

How can I track the progress of my submission?

You can track the status of your submission at any time at <http://ees.elsevier.com/CHEM>

Once there, simply:

1. Enter your username: Your username is: aamayac@uaemex.mx
- If you need to retrieve password details, please go to: http://ees.elsevier.com/CHEM/automail_query.asp
2. Click on [Author Login]. This will take you to the Author Main Menu
3. Click on [Submissions Being Processed]

Many thanks again for your interest in Chemosphere.

Kind regards,

Jacob de Boer
Shane Snyder
Co-Editors in Chief

7.1.2.2. Resumen

El objetivo del presente trabajo fue evaluar la exposición de los bebés a los plaguicidas organoclorados (OCPs) a través de la ingesta de leche materna. Se consideraron dos grupos de mujeres procedentes de dos estados diferentes de México, Estado de México (EM) y Veracruz (VC), con diferentes características geográficas y climáticas, así como con diferentes políticas de uso de plaguicidas. Se analizaron 42 muestras de leche materna de EM y 43 de VC para la presencia de aldrín, dieldrín, 4,4'-DDT, 2,4'-DDD, 4,4'-DDE, HCB y lindano, a través de la metodología SPME-GC / MS. Se encontró que 10% de las muestras de EM estaban contaminados con al menos uno de los siguientes plaguicidas: 2,4'-DDD, DDE y 4,4'-HCB y 37% de las muestras de leche de Veracruz con 4,4'-DDE y / o HCB. La frecuencia de contaminación de las muestras de leche fue mayor para el grupo VC cuando comparado con el grupo EM. Los plaguicidas 4,4'-DDT, lindano, aldrín y dieldrín no se detectaron en las muestras de leche analizadas. Los factores con una correlación significativa con la presencia de al menos uno de los plaguicidas detectados fueron la edad, el número de partos anteriores, la duración del período de lactancia, el consumo de tubérculos, cereales y huevos, el clima de la región, la temperatura media anual, precipitación anual y la altitud ($p < 0,05$; Spearman Rho). Los niveles de contaminación de las muestras de leche sugieren que la exposición a los OCPs detectados aún puede suponer un riesgo inaceptable (especialmente la exposición al HCB para el grupo EM) para los lactantes alimentados con leche materna a pesar de que estos compuestos no han sido utilizados desde hace mucho tiempo. Por lo tanto, el análisis de plaguicidas organoclorados persistentes debe seguir siendo un elemento importante en el biomonitorio y en la evaluación de riesgos asociados a la contaminación del medio ambiente por estos compuestos.

7.1.2.3. Artículo enviado

Infants' exposition to organochlorine pesticides through breast milk intake. A case study of two Mexican populations

Keywords: persistent organic pollutants, breast milk, infant health, SPME-GC/MS

1. Introduction

The extensive worldwide use of persistent organic pollutants (POPs), such as organochlorine pesticides (OCPs), has resulted in their release to environment, posing an environmental and human risk (Hassine et al., 2012). Although OCPs have been banned decades ago in developed countries, some of these compounds are still used in developing countries and have been determined in different environment media around the world (UNEP/POPS/COP.6/33, 2013; Qu et al., 2010; Minh et al., 2004; F.-Alvarez et al., 2008).

In Mexico, DDT was used in public health programs to combat malaria vectors for more than five decades up to 1999 (Waliszewski et al., 1998; Waliszewski et al., 1999). Its manufacture in the country began in 1968 and production reached an average of close to 80,000 tons per year (Bremauntz et al., 2004). Lindane was used in agriculture for soil sanitation, as seed dresser and in the combat of ectoparasites in livestock and humans (Waliszewski et al., 1999). Aldrin was used in large quantities to protect corn and potato crops. Aldrin and dieldrin were used in the combat of soil insects and to protect wooden structures from termites. HCB was used for seed treatment and is a by-product of some industrial chlorination processes (Waliszewski et al., 2003). The above mentioned pesticides were banned in Mexico, with the exception of DDT which is listed as a restricted pesticide, for exclusive use of the Secretary of Health, in health campaigns. (COFEPRIS, 2015).

Because of OCPs' relative stability and bioaccumulation property, these persistent chemicals can be transferred and magnified to higher trophic levels through the food chain. OCPs residues can be found in fatty foods, both foods of animal origin, such as meat poultry, fish, eggs, and milk, and of plant origin, such as vegetable oil, nuts, avocado, sesame, oat and olives (Chung and Chen, 2011).

Due to its lipophilic nature, milk has been used to monitor the occurrence of environmentally persistent organic pollutants, such as OCPs (G.-Rodríguez et al., 2005). Organochlorine pesticides are accumulated in milk-producing animals, such as cows, if

they feed on contaminated grass/hay and/or if they inhale contaminated air. OCPs are primarily stored in fat-rich tissues of these animals and they are subsequently translocated and excreted through milk fat (Pandit et al., 2002). Concerning human exposure to OCPs, accumulation through food ingestion and abiotic factors are the main routes (Kim et al., 2013). On the other hand, human milk, at the top of the food chain, represents the major route of elimination of OCPs by lactating women (Stuetz et al., 2001). The human milk monitoring provides simultaneous information on the contaminants body burden in women of reproductive age, as well as on the perinatal exposure of the fetus and the nursing infant (Abballe et al., 2008). There are several factors which may affect the transfer of OCP residues to breast milk such as temperature, humidity, altitude of the residence zone, diet, age, parity and/or length of previous lactation, body weight of the women (Harris et al., 2001).

Organochlorine pesticides have been reported in milks from different regions of Mexico. Waliszewski et al. reported the presence of OCPs in breast milk (Waliszewski et al., 1996; Waliszewski et al., 1999) and in cow's milk (Waliszewski et al., 1997; Waliszewski et al., 1998; Waliszewski et al. 2003) in tropical region of Mexico. Similarly, these contaminants were reported in human milk of mothers from Aguascalientes (Terrones et al., 2000), human milk from Yacatán (R.-Ortíz et al., 2008), infant formulas (Izquierdo et al. 2004), cow's milk from the metropolitan zone of Guadalajara (Real et al., 2005) and goat milk from Querétaro (Flores et al., 2007).

Different methodologies for OCPs determination in milk have been developed and reported. Increasing attention, nowadays, is pointed to techniques which are environmentally friendly by minimizing the use of organic solvents and hazardous waste production. Recent researches have focused on the development of efficient, economical and miniaturized sample preparation methods (Martins et al., 2013).

The solid-phase microextraction (SPME) is an alternative extraction method to traditional techniques. Contrary to liquid-liquid extraction (LLE) and solid-phase extraction (SPE), which require large amounts of organic solvent, SPME is a solvent-free extraction technique (Martins et al., 2011). The SPME technique is a non-exhaustive extraction method and integrates sampling, isolation and concentration in a single step (Ouyang and Pawliszyn, 2008). Regarding the application of SPME for the determination of OCPs in milk, some works have been developed (F.-Alvarez et al., 2008; G.-Rodríguez et al., 2005; Merib et al., 2014; Röhrig and Meisch, 2000).

This extraction technique has been widely used with both gas chromatography (GC) and liquid chromatography (LC). However, resolution and sensitivity often are limited by sample matrix effects (Martins et al., 2013). According to Wong and Cooks (1997), mass spectrometry (MS) in combination with chromatographic separation has been widely used in organic analysis in the environmental sciences and in the characterization of biological compounds. The high sensitivity and chemical specificity of mass spectrometry are appropriate even when the samples are presented to the mass spectrometer as mixtures (Wong and Cooks, 1997).

The aim of this study was the evaluation of the infants' exposure to organochlorine pesticides through breast milk intake. For that, the determination of OCPs in human milk samples from mothers of two different regions of Mexico (Estado de México and Veracruz) was carried out, followed by the evaluation of the principal factors affecting the transfer of OCP residues to milk and the estimation of infants daily intake. Finally, it was conducted risk assessment to infants associated with the ingest of contaminated milk.

2. Material and methods

2.1. Sampling

A total of 85 samples of human milk were collected to carry out this study. 42 samples were collected in the Hospital of Gynecology and Obstetrics of Toluca (samples from Estado de México) and 43 samples were collected in the Hospital of Social Security of Veracruz (samples from Veracruz). A questionnaire was applied to the volunteer mothers to obtain personal data, anthropometric measurements, previous pregnancies, occupation, residence, mother diet and pregnancy and baby background. Breast milk samples were stored at -8 ° C for later analysis.

2.2. Ethical considerations

Before collecting human milk samples, all women participants were informed about the characteristics and objectives of the study. Signed informed consent was obtained from the participants.

2.3. Solutions and reagents

The organochlorine pesticide analytical standards used for the development and validation of the presented methodology were supplied by Chem Service (West Chester, United States of America): Aldrin (100 mg/L solution, in methanol), dieldrin (100 mg/L

solution, in methanol), 4,4' – DDT (98.2%); and by Sigma Aldrich (Steinheim, Germany): 2,4-DDD (99 %), 4,4-DDE (99.8%), , HCB (99 %) and lindane (99 %). Individual pesticide stock solutions (concentrations between 142.6 – 190.9 mg/L) were prepared in methanol (HPLC grade), supplied by Fermont (Monterrey, Mexico), and stored under refrigeration (-5 °C). A stock standard mixture solution containing all pesticides (10 mg/L aldrin, 10 mg/L dieldrin, 20.24 mg/L 2,4' – DDD, 20.12 mg/L 4,4' – DDE, 22.91 mg/L 4,4' – DDT, 19.96 mg/L HCB, 20.91 mg/L lindane) was also prepared in methanol, weekly, and stored under refrigeration (2 – 6 °C).

2.4. SPME extraction procedure

The SPME extraction procedure described by Merib et al. (2014) were used with minor modifications. The extractions were performed using the DVB/CAR/PDMS coated fiber (50/30 µm). SPME fibers (Supelco, Bellefonte, USA) were conditioned according to the supplier's instructions. The extraction procedure was performed using 4 ml clear glass vials (Agilent, USA) and a total sample volume of 2 mL were extracted at 90 °C, for 45 min with agitation, in headspace mode.

2.5. Gas chromatographic analysis

Gas chromatographic analyses were performed in Varian 3900 GC (Varian, Mississauga, ON, Canada), equipped with a split/splitless injector. The analytical column used was a VF-Xms, 30 × .025 mm ID × 0.25 µm film thickness (Varian, Mississauga, ON, Canada). The carrier gas used was high-purity helium (99.99 %). The split/splitless injector was operating in the splitless mode and programmed to return to the split mode after 2 min. The SPME desorption was carried out in the injector port for 5 min and the desorption temperature was 270 °C (higher desorption times were studied without significant improvements). The oven temperature program used was as follows: 100 °C hold 1.0 min, rate 40.0 °C/min to 160 °C, rate 2.0 °C/min to 200 °C hold 3 min, rate 8.0 °C/min to 260 °C hold 8.0 min, with a total acquisition program of 41 min.

2.6. Mass spectrometry detection

Retention times of each organochlorine pesticide were determined in full scan mode. A Saturn 2100T ion trap mass spectrometer (Varian, Mississauga, ON, Canada) operated in the electron impact mode (1750 V) was used. The trap, manifold and transfer

line temperatures were set at 180, 80 and 300 °C, respectively. The analyses were carried out with a filament-multiplier delay of 5 min. Retention times and MS quantification fragment are shown in Table 1.

Instrument control and data acquisition were managed by a personal computer running the MS Workstation, version 6.9.3 (Varian).

2.7. Quality assurance

Matrix-matched standards were prepared in commercial cow milk, previously analyzed for the absence of the studied compounds. The milk samples were spiked with different volumes of the standard mixture solution and kept under refrigeration (2 – 6 °C) for 24 hours. The quantification was based on five-point external calibration graph, obtained by plotting the peak areas against the theoretical standard concentration.

The values of slope and the correlation coefficient of regression (R^2) of the calibration curves obtained for each pesticide are presented in Table 2. Good linearity was achieved for all the compounds with $R^2 > 0.99$.

Recovery values were determined using pesticide free milk samples, spiked with pesticides at four concentration level (three concentration levels for dieldrin and 4,4'-DDT), with three replicates. Recovery results were satisfactory for all values (recovery between 70 and 120% and RSDs ≤ 20 %) in agreement with the EC SANCO/12571/2013.

2.8. Statistical analysis

Firstly, a descriptive statistical analysis was performed to characterize both populations included in the study, considering the information collected with surveys. Afterward, Spearman's correlation coefficients were used to test the association between the OCPs concentration and factors which may influence on milk contamination. A p-value < 0.05 was considered to indicate statistical significance. The statistical analysis was done using the Minitab software (version17).

3. Results and discussion

The aim of this study was the evaluation of the infants' exposure to organochlorine pesticides through breast milk intake, as mentioned above. For that, the determination of OCPs in human milk samples from mothers of two Mexico states with different geographical and climatic characteristics, as well as different policies on the application of

the studied pesticides, was carried out. Afterwards, it was conducted an evaluation of the principal factors affecting the transfer of OCP residues to milk, the estimation of infants daily intake and finally it was evaluated the infants health risk associated.

3.1. Study areas

The Estado de México (EM) is a region with a predominantly humid temperate climate, an annual average temperature of 15 °C, an annual average rainfall of 900 mm and an average altitude of 2320 m. Milk samples from EM group were collected in the year of 2012. Veracruz (VC) is a region with a warm subhumid (54% of its territory) and warm humid climate (41% of its territory), an annual average temperature of 23 °C and an annual average rainfall of 1500 mm. Between 1988 and 1999 they were used 45 tons of DDT in the Estado de México and 740 tons of the same compound in the state of Veracruz (Torres et al., 2009). This OCP, as it was mentioned above, were used mainly in public health programs to combat malaria vectors. As Veracruz state present a more favorable climate for the development of these vectors, higher amounts of DDT were required. According with the National Institute of Statistics and Geography (INEGI, 2015) the Estado de México is more industrialized than the Veracruz state.

3.2. Study groups

The age of participant women are summarized in Table 3. 79% of the participant women from EM group are from urban zones and 21% are from rural zones. All participant mothers from VC group were from urban zones. The age of the volunteer women were similar between both groups.

The main characteristics of infants whose mothers participated in the study are summarized in Table 4.

3.3. Organochlorine pesticides detected in the breast milk samples

Aldrin, dieldrin, 4, 4' – DDT, 2, 4'-DDD, 4, 4'-DDE, HCB and lindane were the OCPs considered in this study. Of these pesticides, 2,4'-DDD, 4, 4'-DDE and HCB were detected in the 10 % of the human milk samples from Estado de México with at least one of these pesticides. HCB was found in all contaminated samples, 4,4'-DDE in two and 2,4'-DDD in one sample (in which it was also detected HCB, 4,4'- DDE). The 50 % of the volunteers with contaminated milk are from rural zones and 50% of urban zones.

37 % of the total milk samples from the VC group were found contaminated with 4,4'-DDE and HCB (present in only one sample). All contaminated milk samples from Veracruz State are from urban zones. The frequency of milk samples contaminated with OCPs was higher for VC group than EM group. The pesticides 4,4'-DDT, lindane, aldrin and dieldrin were not detected in the milk samples analyzed. The frequency (%) and the concentration of the detected OCPs for both regions are shown on table 5.

3.4. Factors influencing the contamination of breast milk by OCPs

There are several factors reported in literature which may affect the occurrence of organochlorine pesticide residues in breast milk (Harris et al., 2001; Tanabe and Kunisue, 2007; Freire et al., 2011). In the present work, they were considered factors such as diet, residence, occupation, age, parity, length of previous lactation, body mass index, climatic (climate type, temperature, humidity) and geographic conditions (altitude).

Factors which present correlation (considering p -value < 0.05 and Spearman Rho) with the presence of at least one pesticide, were: mother's age, parity, duration of lactation period, consumption of tubers, cereals, eggs, climate of the region, annual average temperature, annual rainfall and altitude.

3.4.1. Age

Age has been reported as one of the most significant contributors to residues of OCPs in human milk. Due to the lipophilic nature of these compounds and their extreme persistence in the environment, they have a considerable potential to accumulate in human tissues (Harris et al., 2001). Generally, in the case of primiparae mothers, it is found that levels of POPs such as OCPs in human breast milk were positively correlated with the age of volunteers (Harris et al., 2001; Tanabe and Kunisue, 2007). Analyzing age of women included in this study, it is possible to observe that age range of both groups are similar. Considering contaminated milk samples from EM group, 75% correspond to samples of participants aged between 31 to 35 years and 25% correspond to participants aged between 26 and 30 years. Regarding contaminated milk samples from VC group, 63% of them corresponded to samples of women aged between 21 to 30 years, 12% corresponded to participants aged between 31 to 35 years and 25% corresponded to mothers aged between 36 and 40 years. The positive correlation found in previously reported works (Harris et al., 2001; Tanabe and Kunisue, 2007) was not observed in the

case of this study, perhaps because the majority of the participants were not primiparae. The 75% of the contaminated samples from EM group and the 84% of the contaminated samples from VC group are from multiparae mothers. Considering the Spearman correlation analysis for age factor and the concentration of OCPs in milk samples from the EM group, it was observed a positive association, although not very high, with 4,4' – DDE ($R = 0.312$; $p = 0.047$) and HCB ($R = 0.390$; $p = 0.012$). For the VC group, it was also observed a low positive correlation with 4,4'-DDE and the factor age ($R=0.320$; $p = 0.036$).

3.4.2. Parity and/or length of previous lactation

Parity and/or length of previous lactation have been cited as factors influencing concentrations of OCPs in breast milk. Lactation is potentially the most significant activity likely to reduce concentrations of stored organochlorine pesticides in the human body. Therefore, parity may be an important factor in the prediction of OCPs concentration in human milk. Nevertheless, a better indicator may be the number and length of previous lactations. According with reported information, OCPs concentrations in milk samples decrease during the course of lactation (Harris et al., 2001; Minh et al., 2004; T.-Sánchez and L.-Carrillo, 2007; Tanabe and Kunisue, 2007; Waliszewski et al., 2009). Concerning this study, most of the milk samples collected in both states corresponded to multiparae mothers: 62% of cases for the EM group and 58% for VC group. The 75% of the contaminated milk samples from EM group belong to multiparous mothers (50% with 2 previous pregnancies and 25% with one). Regarding the VC group, 100 % of milk samples contaminated with OCPs correspond to multiparous mothers (62.5% with one previous pregnancy, 18.8% with two previous pregnancy and 18.8% with three previous pregnancy).

The Spearman correlation analysis between the parity factor and length of lactation with the concentration of OCPs in milk samples of the VC group, shows a positive correlation with the 4,4'-DDE concentration ($R=0.494$; $p = 0.001$). It would be expected a negative association, nevertheless, in some cases the period between childbirths may have a significant effect (Harris et al., 2001). Regarding contaminated milk samples from VC group, it was observed a negative association ($R=-0.646$; $p= 0.007$) with length of lactation and the 4,4'-DDE concentration, as it would be expected (Waliszewski et al., 2009). Association between parity and length of lactation and OCPs concentration was not observed for EM group.

3.4.3. Diet

The ingestion of contaminated food has been mentioned as one of the principal exposure sources to the organochlorine pesticides (Harris et al., 2001; Freire et al., 2011; T.O-Sánchez and L.-Carrillo, 2007). Fat foods are most likely to be contaminated with lipophilic compounds such as organochlorine pesticides. Fish consumption had been noted as a particular source of dietary OCPs since these compounds were frequently detected in a wide range of fish types from a variety of sources (Harris et al., 2001; Abballe et al., 2008). Concerning the diet factor, it was observed a negative association (Spearman correlation) between 4,4'-DDE ($R = -0.503$; $p = 0.001$) and HCB ($R = -0.500$; $p = 0.001$) concentration in milk samples with consumption of tubers and cereals and a positive association between the 4,4'-DDE ($R = 0.384$; $p = 0.013$) and the consumption of eggs, for the EM group. The results obtained for tubers and cereals consumption may be explain by the low fat content of these foods. Once OCPs are lipophilic compounds, a diet rich in cereals and tubers will result to lower milk contamination. The eggs, as a food with fat (mainly in the yolk), is more likely to be contaminated with OCPs, therefore, its consumption may contribute for the breast milk contamination.

Regarding the contaminated milk samples from VC group, it was observed a positive association (Spearman correlation) between HCB concentration and the red meat consumption ($R = 0.576$; $p = 0.020$). This trend can be explained by the high fat content and the high frequency of consumption.

Other foods with high content of fat such as fish and milk were included in the study. Nevertheless, the low frequency of fish consumption may be the reason for having no association with the milk samples contamination. In the case of milk, the low-fat version is often preferred which may justify a lower content of lipophilic compounds, such as OCPs.

3.4.4. Climatic and geographical factors

A correlation analysis of Spearman including information on environmental and geographic factors and OCPs concentrations of all milk samples from Veracruz and the Estado de Mexico was performed. It was observed an association between the factors climate of the state, annual average temperature, annual average precipitation and altitude with the concentration of the pesticide 4,4-DDE (with p values < 0.05 were considered). For the first three factors, climate of the state ($R = 0.355$; $p = 0.001$), annual average temperature ($R = 0.363$; $p = 0.001$) and annual average precipitation ($R = 0.336$; $p = 0.002$), the

association was positive, thus for warmer climates, higher average temperatures and precipitation, higher concentrations of 4,4'-DDE would be observed. On the other hand, the association between 4,4'-DDE concentration with altitude is negative ($R=-0.345$; $p=0.001$), the 4,4'-DDE increases with decreasing altitude. These trends are observed in the average concentration of 4,4'-DDE found in both states. Milk samples from Veracruz, state with warmer climate, higher average temperature, greater precipitation value and lower altitude, presented a 4,4'-DDE concentration mean of $79.1 \mu\text{g/L}$ while milk samples from Estado de México presented a concentration mean of $39.4 \mu\text{g/l}$ (whole milk basis).

The climatic and geographical conditions of Veracruz favor the occurrence of insect vectors of diseases like malaria. Therefore, large amounts of OCPs, particularly DDT, were used to malaria control. In consequence, it was expected to find higher concentrations of DDT in Veracruz, however, as this compound is no applied since years ago, DDT was not detected but the metabolite 4,4'-DDE was the most frequent OCP in the milk samples of VC group, indicating an old exposition.

A negative association between the annual average temperature and the concentration of HCB was also observed ($R=-0.215$; $p=0.049$), it suggesting that this compound is present mainly in the coldest area included in this study. HCB may be generated like by-product of some industrial chlorination processes (Waliszewski et al., 2003), for this reason and considering that the samples of the EM group are from a more industrialized area, the higher concentration of HCB is justified.

No association of environmental factors considered in the study pesticide concentration was observed for the pesticide 2,4'-DDD.

Regarding the Spearman correlation analysis but considering only the contaminated samples, they were observed a negative association between the annual average temperature and the pesticide concentration of 2,4'-DDD ($R=-0.513$; $p=0.021$) and a positive association with altitude ($R=0.513$; $p=0.021$). In both cases, the correlation coefficients are higher than the coefficients obtained in the previous analysis. For the HCB a strong negative association was found with state climate ($R=-0.883$; $p=0.000$), average annual temperature ($R=-0.881$; $p=0.000$) and precipitation ($R=-0.873$; $p=0.000$) and a positive association was found with the altitude ($R=0.886$; $p=0.000$). In this study no association of environmental factors was observed in the presence of 4, 4'-DDE.

3.4.5. Other studied factors

Association between OCPs concentration in the milk samples and other studied factors such as body mass index of the participants, type of parturition, lactation length, residence and occupational and environmental exposure were not observed.

3.4.6. Estimation of infant's daily intake of the OCPs detected in the breast milk sample

Considering an infant with a mean body weight of 5 kg (average weight of the infants included in the study), a mean milk daily intake of 0.8 L (Waliszewski et al., 1996) and the concentration detected on the breast milk samples, it were estimated the daily intake of 2,4'-DDD, 4,4'-DDE and HCB for each contaminated sample. Estimated daily intake for the pesticides 4,4'-DDE and HCB are presented on figures 1 and 2. The pesticide 2,4'-DDD was detected in a single sample and the estimated daily intake corresponding is 7.8 µg/kg body weight/day. The Food Agriculture Organization of the United Nations (FAO, 2015) set the acceptable daily intake (ADI) at 20 µg/kg body weight/day for Σ-DDT and 0.1 µg/kg body weight/day for HCB. Considering these ADI values, it is possible to observe that in the case of the 4,4'-DDE, two of the contaminated samples, VC7 and VC8, represent an estimated daily 4,4'-DDE intake that exceed the ADI set for this compound by 1.4 and 2.1 respectively. It is important to take into account that this ADI is set for the Σ-DDT and not all compounds included in this group were analyzed. Therefore, if other compounds such as 4,4'-DDT or metabolites not included in this study, are present, the ADI corresponding would be increased. The milk sample contaminated with 2,4'-DDD was also contaminated with 4,4'-DDE, although the sum of both pesticides does not exceed the ADI set for Σ-DDT. The results of this study are not considering all compounds included on the Σ-DDT group.

All contaminated samples with HCB represent an estimated daily intake that exceed ADI set for this pesticide between 17.8 (EM3) and 165.8 times (EM4). The higher frequency of HCB for EM group may be due to the higher industrialization of the Estado de México, as it was mentioned above. Samples EM1, EM2 and VC1 are from urban zone. Although samples EM3 and EM4 are from rural zones, the highest concentration of HCB in the sample EM4 may be due to the parity of the mother, since it correspond to the only primiparae mother, considering these 5 cases.

Waliszewski et al. (1996) reported concentrations of 4,4'-DDE of 2.71 mg/kg milk fat basis and 8.25 mg/kg milk fat basis for human milk from urban zones and suburban

zones of Veracruz, respectively. Considering a mean milk fat content approximately of 3.5% and a milk density of 1.0 g/ml, concentrations of 4,4'-DDE in milk reported by these authors are 94.85 µg/l whole milk basis and 288.75 µg/l whole milk basis for urban zones and suburban zones, respectively. Comparing these concentrations with concentrations reported in the present work (average concentration of 4,4'-DDE in human milk samples from Veracruz was of 79.1 µg/l whole milk basis), it is possible to observe that contamination of human milk with 4,4'-DDE decreased through the years. This behavior was expected since 4,4'-DDE was banned and concentrations in the environment should be decreasing, as well as the frequency. In the same work, these authors reported concentrations of HCB of 0.065 mg/kg milk fat basis and 0.021 mg/kg milk fat basis in human milk samples from urban and suburban zones of Veracruz, respectively. Standardizing unit values for comparison with the present work, the corresponding concentrations are 2.28 µg/l whole milk basis and 0.74 µg/l whole milk basis, for urban and suburban zones, respectively. Analyzing these results it is also possible to observe that higher concentrations of HCB are detected in the urban zone probably due to the unintentional industrial production of this compound. On the other hand, considering concentrations determined in the present work for HCB in human milk samples of Veracruz, it is possible to verify that there was an increase through the years. Despite HCB are also already banned, since it is still produced (unintentionally) and because of their persistent, it continues to accumulate in the environment.

In the case of Estado de México, there are not reported works about OCPs determination in human milk. Concentrations of 2,4'-DDD and 4,4'-DDE found in samples from this region does not seem to be of a great concern. On the other hand, concentration of HCB determined in human milk samples of this Mexican state seems to pose an unacceptable risk to the breast-fed infants. Despite this compound have not been used for more than one decade, their unintentionally production may be causing an accumulation in the environment.

Regarding Veracruz state, the results obtained suggest that exposure to 4,4'-DDE may still pose an unacceptable risk to the breast-fed infants despite that OCPs have not been used for decades. Probably the time elapsed since that these compounds were banned it has not been enough to warrant their disappearance of the environment, being persistent compounds. Even though, the HCB frequency is low in this region, the concentration determined pose a risk to the breast-fed infants.

It would be important to think of a way to reduce emissions of HCB to the atmosphere, while still being produced and keep monitoring the presence of OCPs in milk to verify if concentrations continues to decline.

4. Conclusions

The aim of this study was to evaluate the principal factors affecting the transfer of organochlorine pesticides to human milk and to estimate the neonates' exposition and the health risk associated. Two women groups were considered from two Mexico states with different geographical and climatic characteristics, as well as different policies on the application of the studied pesticides. 42 samples were collected in the Estado de México (EM group) and 43 samples were collected Veracruz (VC group). Breast milk samples donated were analyzed for the determination of OCPs concentration using a SPME-GC/MS methodology. Good linearity and recovery values were obtained with this technique, allowing the determination of the study OCPs quickly and minimizing the use of organic solvents and hazardous waste production. Frequency of milk samples contaminated with OCPs was higher for the VC group than for the EM group. 10% of the samples from EM were contaminated with at least one of the following pesticides: 2,4'-DDD, 4,4'-DDE and HCB. HCB were detected in all contaminated samples. 37% of the milk samples from Veracruz were contaminated with at least one of the following pesticides: 4,4'-DDE and HCB. 4'4 – DDE was detected in all contaminated samples. The pesticides 4,4'-DDT, lindane, Aldrin and dieldrin were not detected in the milk samples analyzed. According with the statistical analysis, the factors which are influencing milk samples contamination are: mother's age, parity, duration of lactation period, consumption of tubers, cereals, eggs, climate of the region, annual average temperature, annual rainfall and altitude. Concerning the estimation of infant's daily intake of the OCPs detected in the breast milk samples, the results suggest that exposure to the detected OCPs may still pose an unacceptable risk (especially the exposure to HCB for the EM group) to the breast-fed infants. Therefore, the analysis of the studied and other persistent organochlorine pesticides should still be an important element in biomonitoring and in the risk assessment associated with their intakes from the environment. This is particularly important in the case of infant exposure, as their detoxification mechanisms are not fully developed whilst at the same time their main source of nourishment is derived from breast

milk which constitutes the main route of elimination of these compounds from the women body.

5. Acknowledgements

The financial support by the Secretary of Research and Advanced Studies of the Autonomous University of the Estado de México through the project 3721/2014/CI is gratefully acknowledged. The authors wish to thank Hospital of Gynecology and Obstetrics of Toluca and Hospital of Social Security of Veracruz where breast milk samples were collected. In the same way, authors thank Dr. Moisés Tejocote Perez (Autonomous University of the Estado de México) for the statistical analysis support.

6. Compliance with Ethical Standards

6.1. Conflicts of interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

7. References

- Abballe, A., Ballard, T.J., Dellatte, E., Di Domenico, A., Ferri, F., Fulgenzi, A.R., Grisanti, G., Iacovella, N., Ingelido, A.M., Malisch, R., Miniero, R., Porpora, M.G., Risica, S., Ziemacki, G., De Felip, E., 2008. Persistent environmental contaminants in human milk: concentrations and time trends in Italy. *Chemosphere* 73, S220-S227.
- Bremauntz, A. F., Ramírez, M. A., Díaz J. C., 2004. Las sustancias tóxicas persistentes, primera ed. Secretaria del Medio Ambiente y Recursos Naturales, México.
- Chung, S.W.C., Chen, B.L.S., 2011. Determination of organochlorine pesticide residues in fatty foods: A critical review on the analytical methods and their testing capabilities. *J. Chromatogr. A* 1218, 5555-5567.
- COFEPRIS - Federal Commission for the Protection against Sanitary Risks, Secretary of Health of the United Mexican States. Catalog of pesticides: <http://www.cofepris.gob.mx/AZ/Paginas/Plaguicidas%20y%20Fertilizantes/CatalogoPlaguicidas.aspx> (Accessed August 2015).

European Commission SANCO/12571/2013 - Guidance document on analytical quality control and validation procedures for pesticide residues analysis in food and feed. http://ec.europa.eu/food/plant/pesticides/guidance_documents/docs/qualcontrol_en.pdf (Accessed December 2014).

F.-Alvarez, M., Llompart, M., Lamas, J.P., Lores, M., G.-Jares, C., Cela, R., Dagnac, T., 2008. Development of a solid-phase microextraction gas chromatography with microelectron-capture detection method for a multiresidue analysis of pesticides in bovine milk. *Anal. Chim. Acta* 617, 37-50.

FAO – Food and Agriculture Organization of the United Nations: <http://www.fao.org/agriculture/crops/thematic-sitemap/theme/pests/jmpr/en/> (Accessed September 2015)

Flores, G. P., González, G. D., Tolentino, R. G., Vega, S., Pérez, M. N., García, E. C., 2007. Residuos de plaguicidas organoclorados en leche de cabra de Querétaro, Querétaro, México. *Vet. Mex.* 38 (3), 291-301.

Freire, C., Amaya, E., Fernández, M. F., G.-Galarzo, M. C., Ramos, R., M.-Molina, J. M., Arrebola J. P., Olea, N., 2011. Relationship between occupational social class and exposure to organochlorine pesticides during pregnancy. *Chemosphere* 83, 831-838.

G.-Rodríguez, M.J., Liébanas, F.J.A., Frenich, A.G., Vidal, J.L.M., López, F.J.S., 2005. Determination of pesticides and some metabolites in different kinds of milk by solid-phase microextraction and low-pressure gas chromatography-tandem mass spectrometry. *Anal. Bioanal. Chem.* 382, 164-172.

Harris, C. A., Woolridge, M. W., Hay A. W. M., 2001. Factors affecting the transfer of organochlorine pesticide residues to breastmilk. *Chemosphere* 43, 243-256.

Hassine, S.B., Ameer, W.B., Gandoura, N., Driss, M.R., 2012. Determination of chlorinated pesticides, polychlorinated biphenyls, and polybrominated diphenyl ethers in human milk from Bizerte (Tunisia) in 2010. *Chemosphere* 89, 369-377.

INEGI - National Institute of Statistics and Geography: <http://www.inegi.org.mx/> (Accessed October 2015).

Izquierdo, P., Allara, M., Torres, G., García, A., Piñero, M., 2004. Residuos de plaguicidas organoclorados en fórmulas infantiles. *Rev. Científica XIV* (2), 1-13.

Kim, M., Song, N.R., Hong, J., Lee, J., Pyo, H., 2013. Quantitative analysis of organochlorine pesticides in human serum using headspace solid-phase microextraction coupled with gas chromatography–mass spectrometry. *Chemosphere* 92, 279-285.

Martins, J., Esteves, C., L.-Faria, A., Barros, P., Ribeiro, N., Simões, T., Correia, M., D.-Matos, C., 2011. Multiresidue method for the determination of organophosphorus pesticides in still wine and fortified wine using solid-phase microextraction and gas chromatography – tandem mass spectrometry. *Anal. Lett.* 44, 1021-1035.

Martins, J.G., Amaya Chávez, A., Waliszewski, S.M., Colín, Cruz, A., García Fabila, M.G., 2013. Extraction and clean-up methods for organochlorine pesticides determination in milk. *Chemosphere* 92, 233-246.

Merib, J., Nardini, G., Carasek, E., 2014. Use of Doehlert design in the optimization of extraction conditions in the determination of organochlorine pesticides in bovine milk samples by HS-SPME. *Anal. Methods* 6, 3254-3260.

Minh, N.H., Someya, M., Minh, T.B., Kunisue, T., Iwata, H., Watanabe, M., Tanabe, S., Viet, P.H., Tuyen, B.C., 2004. Persistent organochlorine residues in human breast milk from Hanoi and Hochiminh city, Vietnam: contamination, accumulation kinetics and risk assessment for infants. *Environ Pollut.* 129, 431-441.

Ouyang, G., Pawliszyn, J., 2008. A critical review in calibration methods for solid-phase microextraction. *Anal. Chim. Acta* 627, 184-197.

Pandit, G.G., Sharma, S., Srivastava, P.K., Sahu, S.K., 2002. Persistent organochlorine pesticide residues in milk and dairy products in India. *Food Addit. Contam.* 19(2), 153-157.

Qu, W., Suri, R.P.S., Bi, X., Sheng, G., Fu, J., 2010. Exposure of young mothers and newborns to organochlorine pesticides (OCPs) in Guangzhou, China. *Sci. Total Environ.* 408, 3133-3138.

R.-Ortiz, J. P., C.-Moreno, V., G.-Navarrete, R. L., A.-Mejía, J., R.-Hernández, M. E., G.-Bouchot G., 2008. Organochlorine pesticides and polychlorinated biphenyls levels in human milk from Chelem, Yucatán, México. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 80, 255-259.

Real, M., Ramírez, A., Pérez, E., Noa, M., 2005. Residuos de plaguicidas organoclorados en leche cruda y pasteurizada de la zona metropolitana de Guadalajara, México. *Rev. Salud Anim.* 27 (1), 48-54.

Röhrig, L., Meisch, H.-U., 2000. Application of solid phase micro extraction for the rapid analysis of chlorinated organics in breast milk. *Fresenius J. Anal. Chem.* 366, 106-111.

Stuetz, W., Prapamontol, T., Erhardt, J.G., Classen, H.G., 2001. Organochlorine pesticide residues in human milk of a Hmong hill tribe living in Northern Thailand. *Sci. Total Environ.* 273, 53-60.

- T.-Sánchez, L., L.-Carrillo, L., 2007. Human health effects and p,p'-DDE and p,p'-DDT exposure. The case of Mexico. *Ciencia e saúde coletiva* 12(1), 51-60.
- Tanabe, S., Kunisue, T., 2007. Persistent organic pollutants in human breast milk from Asian countries. *Envir. Poll.* 146, 400-413.
- Terrones, M. C., Llamas, J., Jaramillo, F., Espino, M. G., Leon, J. S., 2000. DDT y plaguicidas relacionados presentes en la leche materna y otros tejidos de mujeres sanas con embarazos de término. *Ginecol. Obstret. Mex.* 68 (3), 97-104.
- Torres, T. R., Nava, C. C., Avedoy, V. G., 2009. Diagnóstico nacional sobre la situación de los contaminantes orgánicos persistentes en México, primera ed. Instituto Nacional de Ecología y Cambio Climático, México.
- UNEP/POPS/COP.6/33, 2013. Stockholm Convention on Persistent Organic Pollutants. <http://chm.pops.int/TheConvention/ConferenceoftheParties/Meetings/COP6/tabid/3074/mc/tl/ViewDetails/EventModID/870/EventID/396/xmid/10240/Default.aspx> (Accessed November 2014).
- Waliszewski, S. M., Sedas, V. T. P., Chantiri, J. N., Infanzon, R. M., Rivera, J., 1996. Organochlorine pesticide residues in human breast milk from tropical areas in Mexico. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 56: 22-28.
- Waliszewski, S.M., Pardío, V.T., Waliszewski, K.N., Chantiri, J.N., Aguirre, A.A., Infanzón, R.M., Rivera, J., 1997. Organochlorine pesticide residues in cow's milk butter in Mexico. *Sci. Total Environ.* 208, 127-132.
- Waliszewski, S.M., Aguirre, A.A., Infanzón, R.M., Rivera, J., Infanzón, R., 1998. Time trend of organochlorine pesticide residues in human adipose tissue in Veracruz, Mexico: 1988-1997 survey. *Sci. Total Environ.* 221, 201-204.
- Waliszewski, S. M., Aguirre, A. A., Infanzon, R. M., 1999. Comparison of organochlorine pesticide residue levels in colostrum and mature milk from mothers living in Veracruz, Mexico. *Fresenius Envir. Bull.* 8, 678-684.
- Waliszewski, S. M., V.-Pietrini, R., G.-Arroyo, S., Infanzón, R. M., 2003. Persistent organochlorine pesticide levels in cow's milk samples from tropical regions of Mexico. *Food Addit. Cont.* 20 (3), 270-275.
- Waliszewski, S.M., M.-Santiesteban, G., V.-Pietrini, R., G.-Arroyo, S., A.-Muñoz, O., H.-Mercado, M., Carvajal, O., 2009. Breast Milk Excretion Kinetic of beta-HCH, pp'DDE and pp'DDT. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 83(6), 869-873.

Wong, P.S.H., Cooks, R.G., 1997. Bioanal. Systems, Inc. Ion Trap Mass Spectrometry 16 (3) <http://www.currentseparations.com/issues/16-3/cs16-3c.pdf> (Accessed 17 September 2014).

TABLES

Table 1.

Pesticide	Retention time (min)	MS quantification fragment (<i>m/z</i>)
Aldrin	20.40	66, 79, 263
Dieldrin	28.43	79, 263, 279
2,4'-DDD	28.52	165, 235
4,4'-DDE	28.08	176, 246, 318
4,4'-DDT	31.75	165, 235
HCB	11.79	284, 142
Lindano	13.89	109, 181, 219

Table 2.

Pesticide	Range ($\mu\text{g/L}$)	Slope	R ²
Aldrin	15.63 – 250.00	2534.7	0.9981
Dieldrin	31.25 – 500.00	543.83	0.9986
2,4'-DDD	18.97 – 303.53	536.34	0.9857
4,4'-DDE	18.86 – 301.80	506.37	0.9875
4,4'-DDT	42.95 – 687.24	163.36	0.9983
HCB	9.36 – 149.69	8831.1	0.9981

Lindane	19.60 – 313.63	3822.9	0.9988
----------------	----------------	--------	--------

Table 3.

Group	Number of participants	Range of age (years)	Average age (years)
EM	42	16 - 39	26
VC	43	17 - 40	27

Table 4.

Infant groups	Number of infants	Range of age (days)	Average age (days)	Average weight (Kg)	Gender	
					Female	Male
EM	42	15 - 127	70	4.75	16	26
VC	43	6 - 143	73	5.61	19	24

Table 5.

OCP	Frequency (%)	EM group		Frequency (%)	VC group	
		Conc. mean (µg/L whole milk basis)	Conc. range (µg/L whole milk basis)		Conc. mean (µg/L whole milk basis)	Conc. range (µg/L whole milk basis)
2,4'-DDD	2	48.7*	-	-	-	-
4,4'-DDE	5	39.4	20.5 to 58.3	37	79.1**	<18.9 to 265.4
HCB	10	44.8	11.1 to 103.6	2	11.2	-

* Concentration of the only contaminated sample.

** Concentration mean considering concentration values above quantification limit (LOQ).

TABLE CAPTIONS

Table 1. Retention times and MS fragments for the quantification of the studied compounds.

Table 2. Calibration range adopted, slopes and correlation coefficients (R^2) of the calibration curves, for the studied compounds.

Table 3. Age of the women from the study groups.

Table 4. Characteristics of the infants whose mothers participated in the study.

Table 5. Frequency (%) and concentration of the detected OCPs in the studied groups.

FIGURES

Fig. 1.

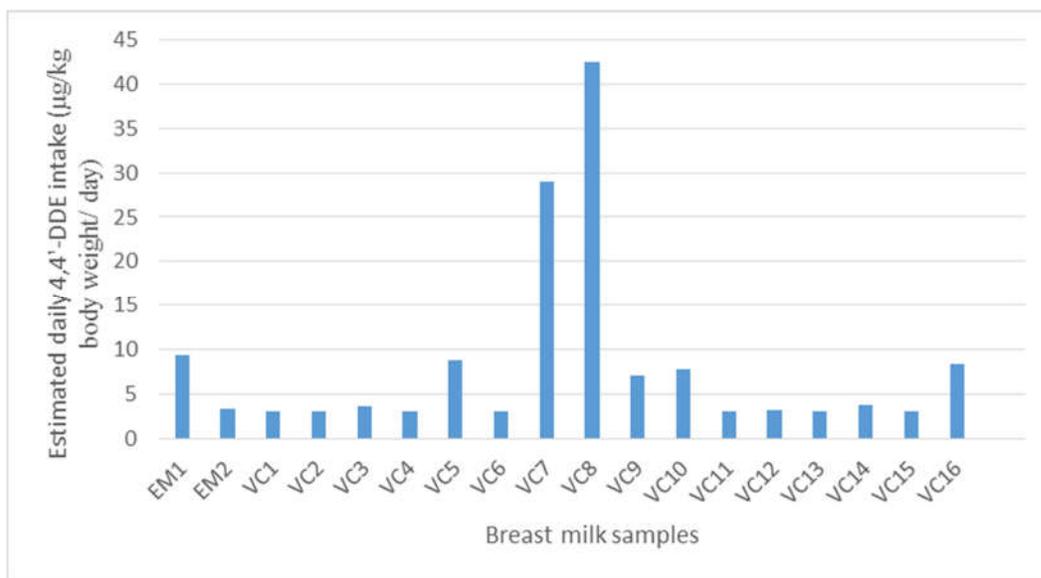


Fig. 2.

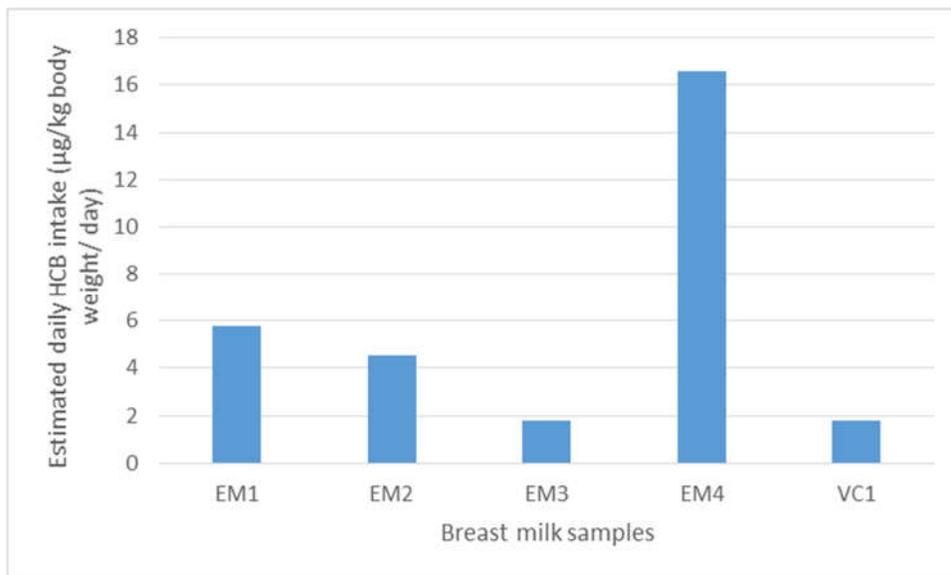


FIGURE CAPTIONS

Figure 1. Estimated daily 4,4'-DDE intake calculated for all contaminated breast milk samples.

Figure 2. Estimated daily HCB intake calculated for all contaminated samples.

7.2. Resultados y discusión no publicados

7.2.1. Población en estudio

Se eligieron dos poblaciones de diferentes estados de la República Mexicana (Veracruz y Edo. De México) con diferentes características geográficas y de uso de plaguicidas OCPs. A las madres voluntarias donantes se les aplicó un cuestionario (Anexo 1) para obtener información sobre datos personales, medidas antropométricas, anteriores embarazos, ocupación, residencia y alimentación de la madre, así como historial del embarazo y del bebé. Así mismo las participantes firmaron una carta de consentimiento informado (Anexo 2). En el Estado de México, las muestras de leche se colectaron en el Hospital de Ginecología y Obstetricia de Toluca (grupo EM) y en Veracruz, se colectaron en el Hospital del Seguro Social de Veracruz (grupo VS). Con los datos de los cuestionarios, se realizó un análisis estadístico descriptivo para una caracterización de las poblaciones consideradas para el estudio.

7.2.1.1. Procedencia de las muestras

El Estado de México tiene 125 municipios, que por sus características geográficas y demográficas se agrupan en 16 regiones socioeconómicas. La capital es Toluca de Lerdo. Las madres donantes del Estado de México eran procedentes de 15 municipios diferentes, pertenecientes a zonas distintas del Estado. 76% de las participantes pertenecen a la zona XIII-Toluca (oriundas de los municipios de Toluca, Tenango del Valle, Calimaya, Zinacantepec, Almoloya de Juárez y Metepec), 12% de las madres donantes pertenecen a la zona VII-Lerma (oriundas de los municipios de Lerma, Xonacatlán, San Mateo Atenco, Tenango del Valle y Santiago Tianguistengo), 7% pertenecen a la zona XV-Valle de Bravo (oriundas de los municipios de Villa de Allende y Villa Victoria), 2.4% pertenecen a la zona VI-Ixtapan (oriundas del municipio de Tenancingo) y otros 2.4% pertenecen a la zona VIII-Naucalpan (oriundas del municipio de Huixquiluca). De los plaguicidas incluidos en este estudio (aldrín, dieldrín, 2,4'-DDD, 4,4'-DDE, 4,4'-DDT, lindano y HCB), se detectaron los plaguicidas 2,4'-DDD, 4,4'-DDE y HCB. El 10% de las muestras procedentes de este estado estaban contaminadas con uno o más de estos plaguicidas. Se detectó HCB en todas las muestras contaminadas, 4,4'-DDE

en dos de las muestras contaminadas y 2,4'-DDD en una de las muestras contaminadas (en la cual se detectó, además de HCB, 4,4'-DDE). De las muestras contaminadas, todas pertenecían a participantes oriundas de la zona XIII-Toluca, una era procedente del municipio de Toluca, dos del municipio de Zinacantepec y una del municipio de Almoloya de Juárez.

Relativamente a las muestras de leche de Veracruz, la gran mayoría (95%) era procedente de la ciudad de Veracruz y una pequeña parte (5%) era procedente de Boca del Río. En el caso del estado de Veracruz, el número de muestras de leche contaminadas con los OCPs en estudio fue superior a las muestras contaminadas del Estado de México. Se detectaron dos de los plaguicidas estudiados en 37% de las muestras de la población de Veracruz, 4,4'-DDE y HCB, de los cuales el HCB fue detectado en apenas una muestra. Todas las muestras contaminadas eran oriundas de la ciudad de Veracruz.

7.2.1.2. *Edad de las madres voluntarias*

Las madres donantes del Estado de México tenían edades comprendidas entre los 16 y los 39 años (Fig. 1). De estas, la mayoría tenía entre 21 y 35 años. Relativamente a las muestras de leche contaminadas, el 75% corresponden a muestras de madres donantes con edades entre 31 y 35 años y el 25% corresponden a madres donantes con edades entre 26 y 30 años. La edad es un factor biológico importante en la contaminación de la leche materna por plaguicidas organoclorados por su persistencia y liposolubilidad que les permiten acumularse en el tejido adiposo a lo largo de los años [21; 35]. Así, sería de esperar que las madres con más edad presentaran mayor contaminación en su leche, como sucedió.

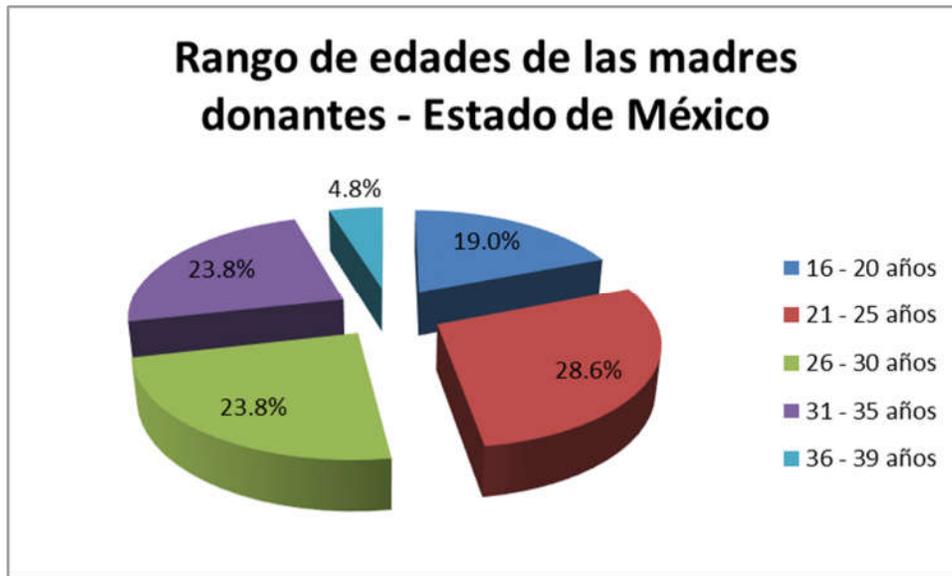


Figura 1. Rango de edades de las madres donantes del Estado de México.

Las madres donantes de Veracruz tenían edades comprendidas entre los 17 y los 40 años (Fig. 2). De estas, la mayoría tenía entre 21 y 30 años. Relativamente a las muestras de leche contaminadas, el 63% corresponden a muestras de madres donantes con edades entre 21 y 30 años, el 12% corresponden a madres donantes con edades entre 31 y 35 años y el 25% corresponden a madres donantes con edades entre 36 y 40 años. En el caso de este estado no se verificó la misma tendencia que se observó para el Estado de México (contaminación mayor para muestras procedentes de madres más grandes), probablemente por una mayor influencia de otros factores tales como número y duración de anteriores periodos de lactancia, que contribuyen para la disminución de la carga de estos contaminantes en el organismo de las madres [35].

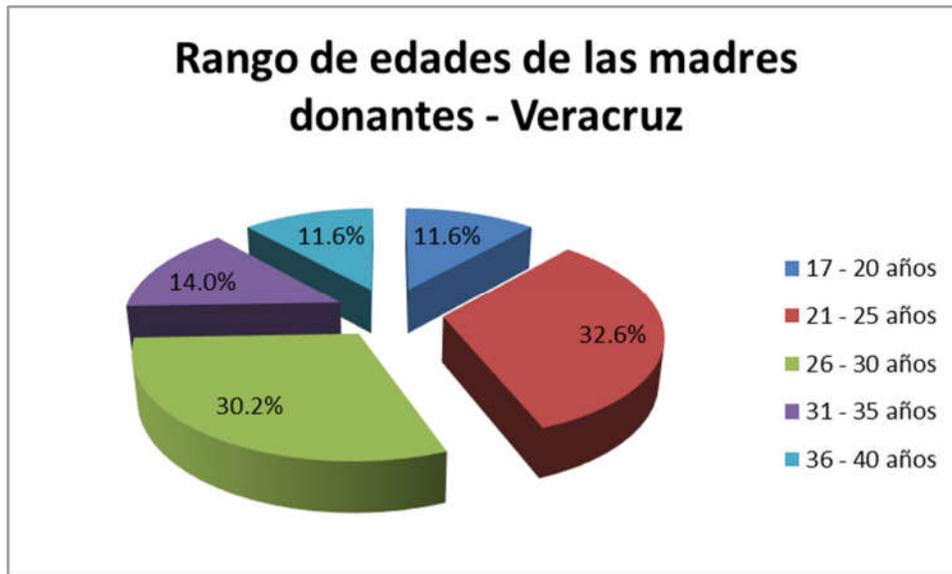


Figura 2. Rango de edades de las madres donantes del estado de Veracruz.

7.2.1.3. Edad de los bebés cuyas madres participaron en el estudio

La edad de los bebés a la fecha de la colecta nos permite saber el tiempo de lactancia de las madres donantes. Este tiempo es inversamente proporcional a la contaminación de la leche materna pues mientras la madre amamanta se está llevando a cabo una descontaminación de su organismo. Considerando las muestras procedentes del Estado de México, los bebés cuyas madres participaron en el estudio tenían edades comprendidas 15 y los 127 días, siendo que el 50% de estos bebés tenían edades comprendidas entre los 61 y 90 días (Fig. 3). Por otro lado, considerando apenas las muestras contaminadas, el 75% de estas muestras correspondían a madres con bebés con edades comprendidas entre los 31 y los 60 días.

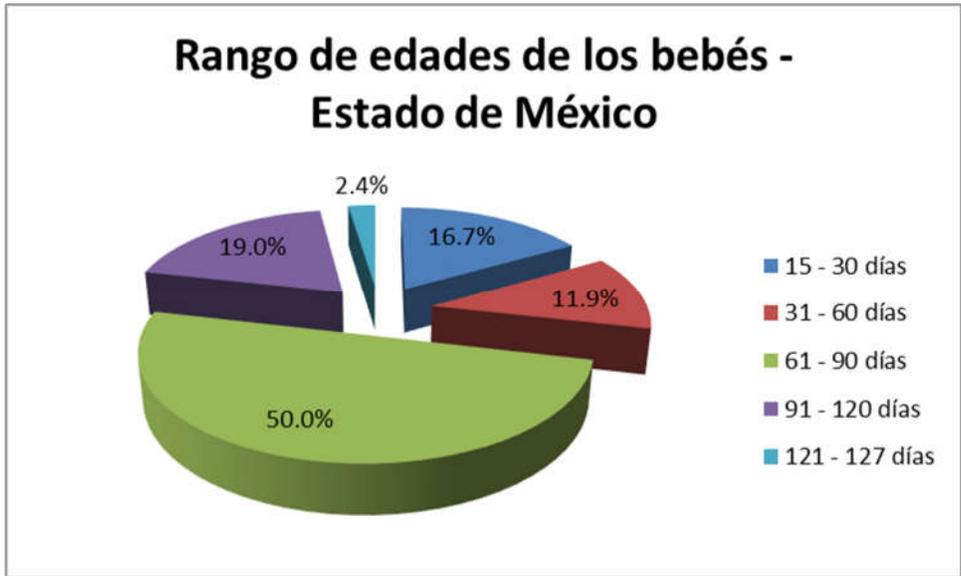


Figura 3. Rango de edades de los bebés procedentes del Estado de México, cuyas madres participaron en el estudio.

Relativamente a las muestras procedentes de Veracruz, el rango de edades de los bebés cuyas madres participaron en el estudio estaba comprendido entre 6 y 143 días (Fig. 4). La mayoría de estos bebés (63% aproximadamente) tenían edades comprendidas entre los 31 y los 90 días. El mayor % de muestras contaminadas (56% aproximadamente) también se relacionaron con los bebés en este rango de edades.

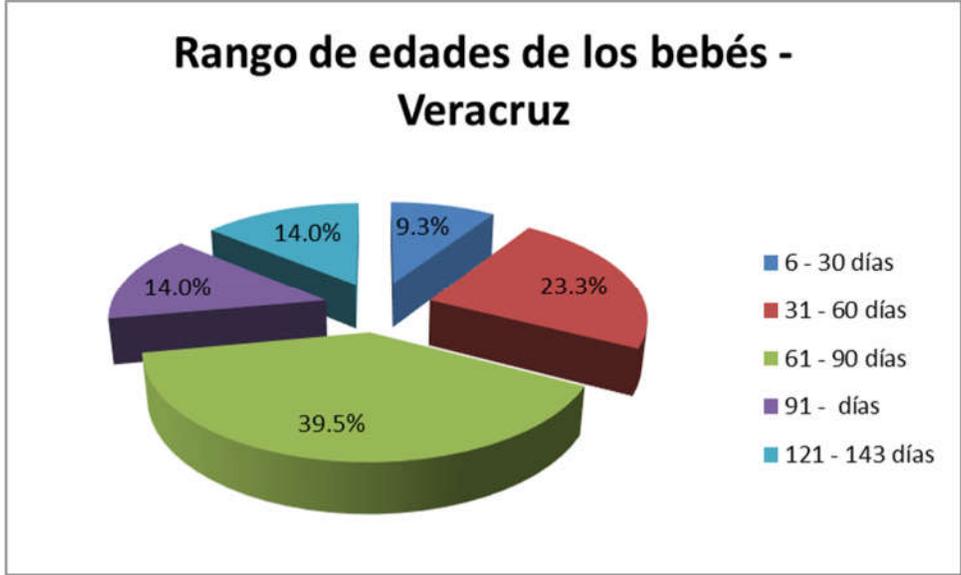


Figura 4. Rango de edades de los bebés procedentes de Veracruz, cuyas madres participaron en el estudio.

7.2.1.4. Problemas de salud presentados por los bebés al nacer

Los problemas de salud que presentan al nacer parte de los bebés incluidos en el estudio, pueden estar asociados a una contaminación por plaguicidas organoclorados del organismo de las madres [48]. En este estudio se verifica que la población que presenta menos contaminación en la leche materna, la población del Estado de México, es la que presenta más casos de bebés con problemas de salud al nacer.

Se encontró que 43% de los bebés incluidos en el estudio, provenientes del Estado de México presentaron algún problema de salud al nacer. Los problemas más frecuentemente encontrados fueron problemas respiratorios, intestinales y bajo peso asociados a partos prematuros. Por otro lado, en la población de Veracruz se verificó que apenas 12% de los bebés incluidos en el estudio presentaron algún tipo de problema de salud al nacer. Los problemas encontrados fueron problemas a nivel respiratorio y reflujo. Los bebés que presentaron algún problema de salud al nacer, no están relacionados con muestras de leche contaminadas con OCPs. Este dato nos puede indicar que los problemas de salud presentados por parte de los bebés incluidos en este estudio podrán estar asociados a otra causa y no a la contaminación por plaguicidas organoclorados.

7.2.1.5. Índice de masa corporal de las madres participantes en el estudio

El índice de masa corporal (IMC) es un importante factor biológico cuando evaluamos la contaminación de la leche materna por plaguicidas organoclorados ya que estos compuestos, siendo liposolubles, se acumulan en el tejido adiposo. La movilización de las reservas de grasa es una de las razones más citadas para la transferencia de plaguicidas organoclorados hacia la leche materna [35]. Analizando la información obtenida a través de los cuestionarios realizados, se puede verificar que el 50% de las madres donantes provenientes del Estado de México presentan sobrepeso y el 43% presentan peso normal (Fig. 5).



Figura 5. Índice de masa corporal de las madres procedentes del Estado de México.

Relativamente a las madres donantes procedentes de Veracruz, el 58% presentan peso normal y el 35% presentan sobrepeso (Fig. 6). Una vez más, se verifica una tendencia contraria a la esperada ya que la población con menor número de muestras contaminadas (Estado de México) es la población que presenta un mayor número de casos de sobrepeso. Cuando analizamos apenas los casos de las madres cuyas muestras de leche estaban contaminadas se verifica que, en ambos casos, la mayoría de las madres donantes (55% en el caso de Veracruz y 50% en el caso del Estado de México) presentaban peso normal. En este caso, otros factores como el tiempo de exposición y la cantidad de OCPs a la que están expuestas las mamás podrán tener un peso más relevante que el IMC.

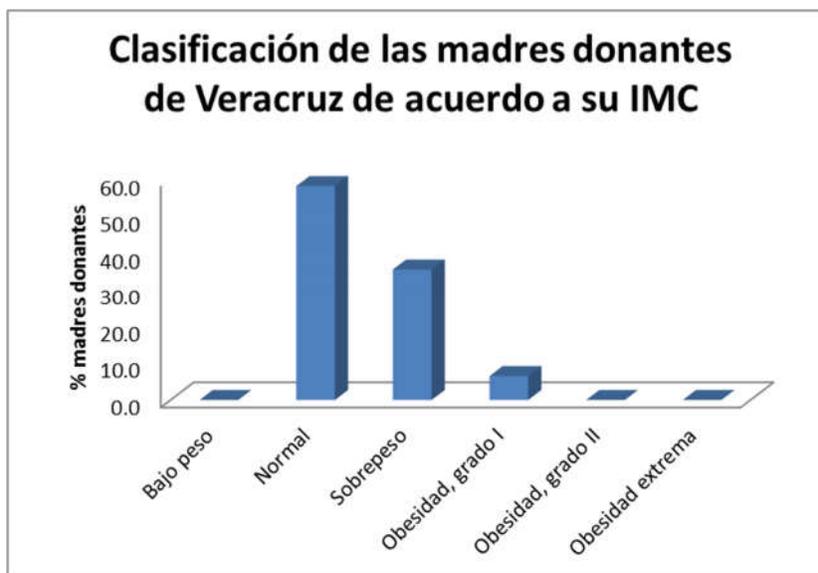


Figura 6. Índice de masa corporal de las madres procedentes de Veracruz.

7.2.1.6. Duración del embarazo

La duración del embarazo es otro de los factores que puede estar asociado a la contaminación por OCPs. Se ha reportado que la duración del embarazo puede ser menor para madres que presentan contaminación por algunos de estos compuestos [48]. Para este estudio, esta tendencia no fue observada. Se verificó un mayor porcentaje de embarazos con duración inferior a 38 semanas (29%) para la población procedente del Estado de México. Sin embargo, el 100% de las muestras contaminadas procedentes del Estado de México correspondían a embarazos de término (con una duración de 38 a 42 semanas). Para las madres procedentes de Veracruz se verificó un total de 25% de partos prematuros (Fig. 7). Considerando las muestras contaminadas, 31% correspondían a embarazos con duración inferior a 38 semanas.

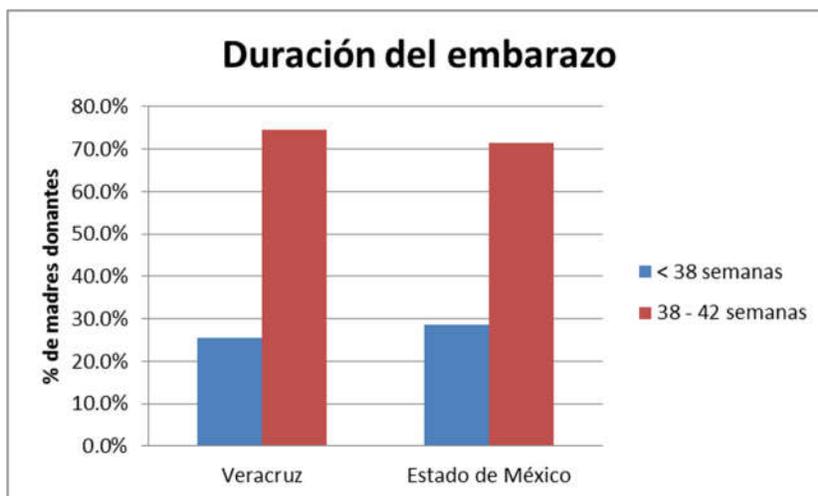


Figura 7. Duración del embarazo para las madres procedentes de ambos estados.

7.2.1.7. Embarazos anteriores

El número de embarazos anteriores al que se consideró para el estudio es también un factor relevante cuando se habla de contaminación por OCPs [36]. Como la leche materna es una de las principales fuentes de excreción de contaminantes liposolubles del organismo de las madres que amamantan, cuanto mayor el número de hijos, considerando que fueron alimentados exclusivamente con leche materna, mayor será la descontaminación del organismo de las madres. En el caso de este estudio, la mayoría de las muestras colectadas en ambos estados correspondían a madres multigestas, 62% de los casos para el Estado de México y 58% en el caso de Veracruz. Considerando las muestras contaminadas, el 75% de las muestras procedentes del Estado de México pertenecen a madres multigestas (50% con 2 embarazos anteriores y 25% con 1 embarazo anterior). En el caso de Veracruz, el 100% de muestras contaminadas con OCPs corresponden a madres multigestas (62.5% con 1 embarazo anterior, 18.8% con 2 embarazos anteriores y 18.8% con 3 embarazos anteriores).

7.2.1.8. Alimentación de la madre

La alimentación es una de las principales fuentes de exposición a los OCPs [35, 49 - 51]. Los alimentos con altos contenidos de grasa son los que en la mayoría de los casos presentan una considerable concentración de estos contaminantes. Sin embargo, se pueden detectar plaguicidas organoclorados en alimentos con bajo contenido de grasa ya sea por la aplicación directa de estos compuestos en plantaciones o por la contaminación del ambiente.

Considerando el consumo de carnes rojas, se verifica que, para Veracruz, el 77% de las participantes consumo este tipo de alimento 1 a 3 veces a la semana. Para la misma frecuencia de consumo, el porcentaje de participantes del Estado de México que consumen este alimento es de 55%. Para consumos más frecuentes de carnes rojas, el porcentaje de madres donantes que consumen este alimento es cercano o inferior a 10% para los dos estados. En el caso de las participantes del Estado de México, el 29% consume carnes rojas 1 a 3 veces al mes (Fig. 8).

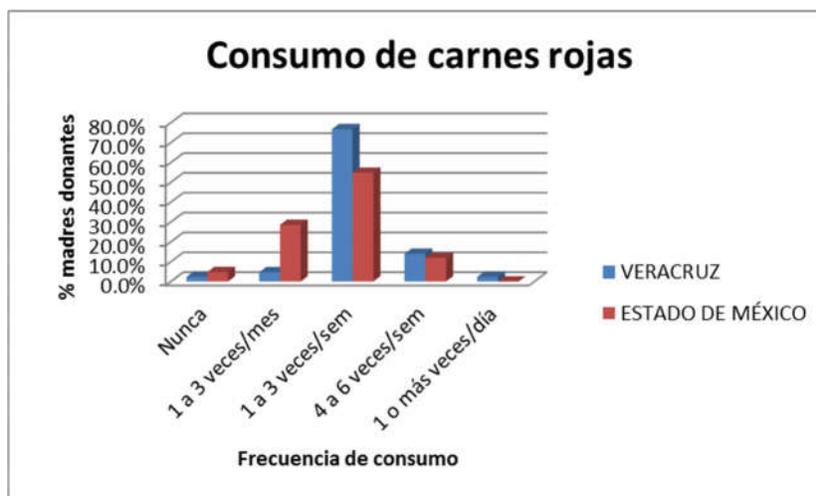


Figura 8. Frecuencia de consumo de carnes rojas para las madres participantes, de ambos estados.

Considerando el consumo de carnes blancas, se verifica que, para Veracruz, el 56% de las participantes consume este tipo de alimento 1 a 3 veces a la semana. Para la misma frecuencia de consumo, el porcentaje de participantes del Estado de México que consumen este alimento es de 79%. Para un consumo más frecuente de carnes blancas (4 a 6 veces a la semana), el porcentaje de madres donantes que consumen este

alimento es de 37% para participantes de Veracruz y 10% para participantes del Estado de México. Para frecuencias menores a 1 vez a la semana, el porcentaje de madres donantes que consumen este alimento es inferior a 10% (Fig. 9).

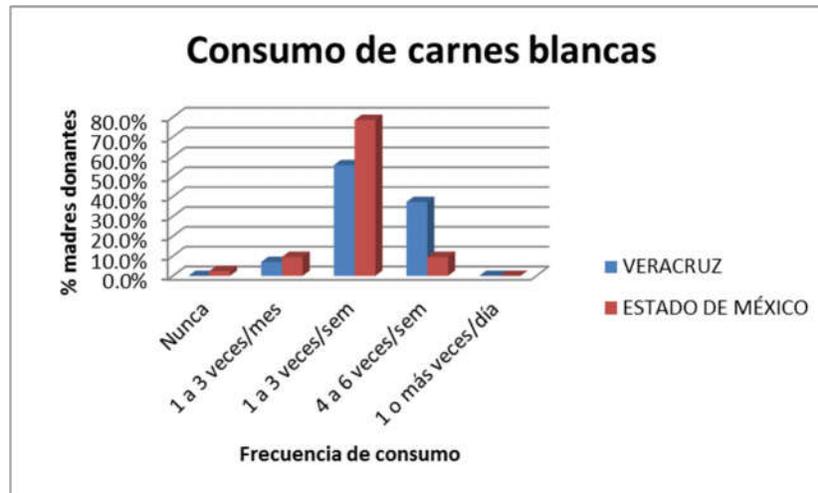


Figura 9. Frecuencia de consumo de carnes blancas para las madres participantes, de ambos estados.

Analizando los datos de consumo de embutidos, se verifica que, para Veracruz, el 44% de las participantes consumió este tipo de alimento 1 a 3 veces al mes y 40% 1 a 3 veces a la semana. En el caso de las participantes del Estado de México, la gran mayoría de las participantes (79%) consumió este tipo de alimento 1 a 3 veces a la semana (Fig. 10).

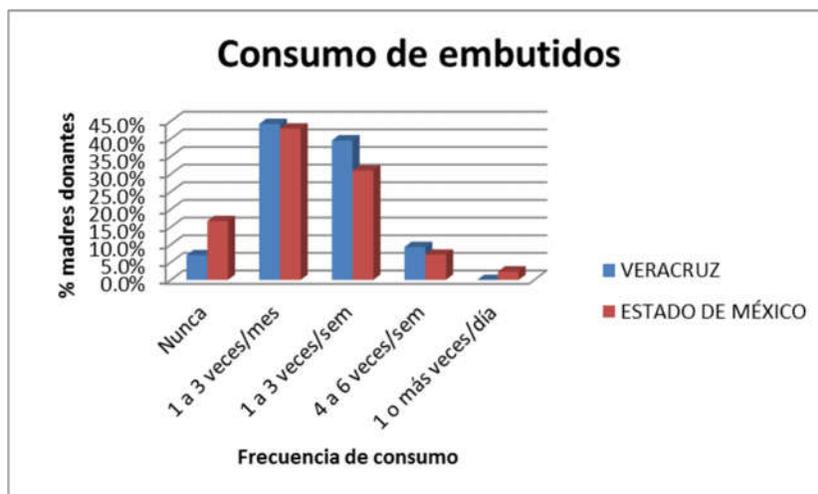


Figura 10. Frecuencia de consumo de embutidos para las madres participantes, de ambos estados.

Analizando los datos de consumo de huevos, se verifica que, para Veracruz, el 23% de las participantes consumió este tipo de alimento 1 a 3 veces al mes, 44% 1 a 3 veces a la semana y 33% 4 a 6 veces a la semana. En el caso de las participantes del Estado de México, la mayoría de las participantes (55%) consumió este tipo de alimento 1 a 3 veces a la semana y 29% 1 a 3 al mes (Fig. 11).

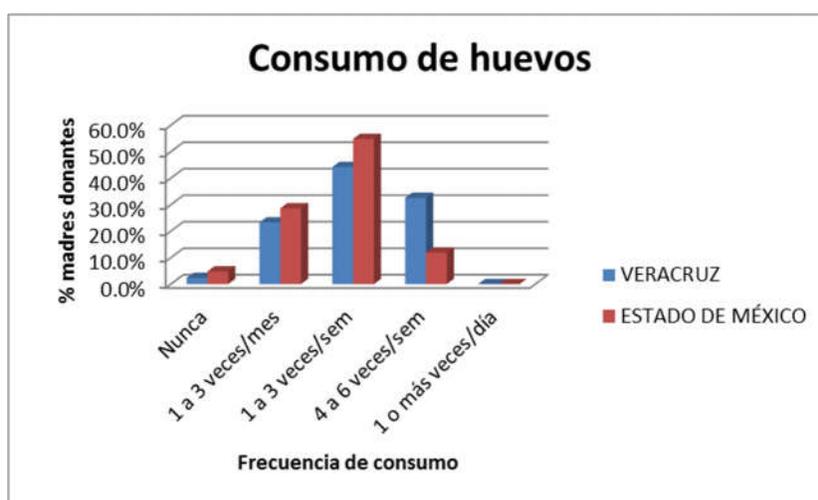


Figura 11. Frecuencia de consumo de huevos para las madres participantes, de ambos estados.

Considerando el consumo de pescado, se verifica que, para Veracruz, el 49% de las participantes consumió este tipo de alimento 1 a 3 veces al mes y 27% 1 a 3 veces a la semana. En el caso de las participantes del Estado de México, la mayoría de las participantes (57%) consumió este tipo de alimento 1 a 3 veces al mes y 26% 1 a 3 veces a la semana (Fig.12).

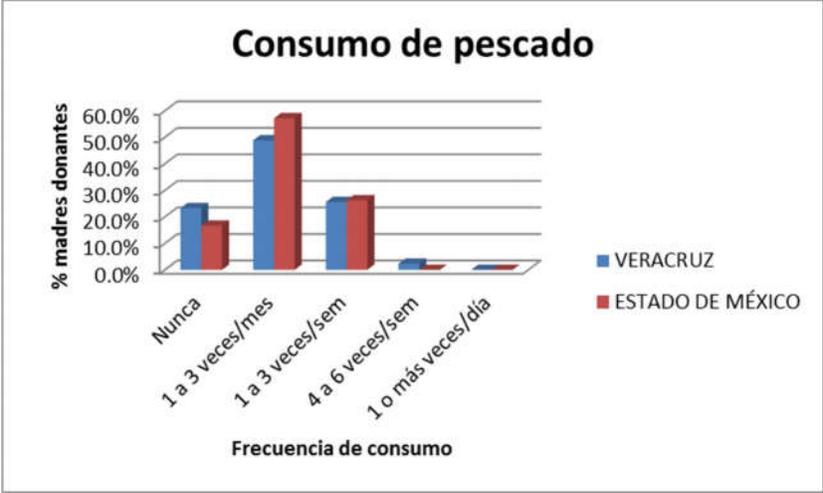


Figura 12. Frecuencia de consumo de pescado para las madres participantes, de ambos estados.

El consumo de mariscos no fue muy frecuente para las poblaciones de ambos estados. Se verifica que, para Veracruz, el 44% de las participantes nunca consumió este tipo de alimento y el 47% de la población incluida en el estudio consumió este alimento 1 a 3 veces al mes. En el caso de las participantes del Estado de México, el 71% nunca consumió este tipo de alimento y el 26% lo consumió 1 a 3 veces al mes (Fig. 13).

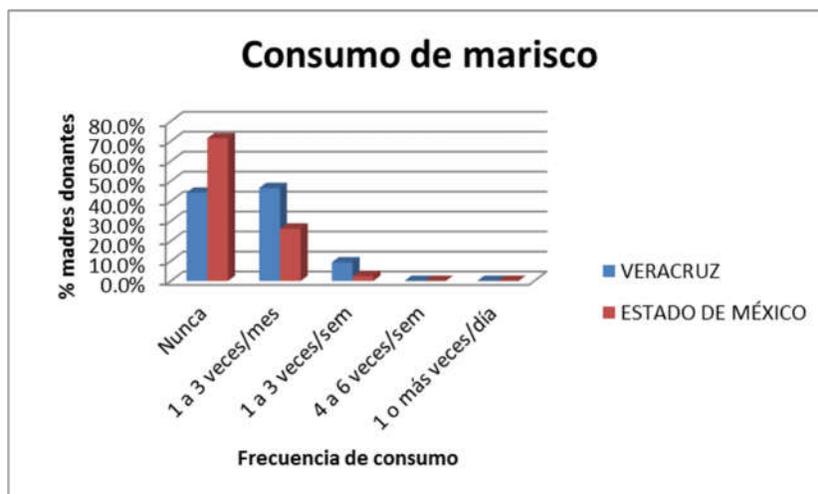


Figura 13. Frecuencia de consumo de mariscos para las madres participantes, de ambos estados.

El consumo de tubérculos y cereales fue de los alimentos que con más frecuencia se consumieron, para las poblaciones de ambos estados. El 65% de las participantes de Veracruz consumió este tipo de alimento 1 o más veces al día y el 21% lo consumió 4 a 6 veces a la semana. En el caso de las participantes del Estado de México, la gran mayoría de las participantes (83%) consumió este tipo de alimento 1 o más veces al día (Fig. 14).

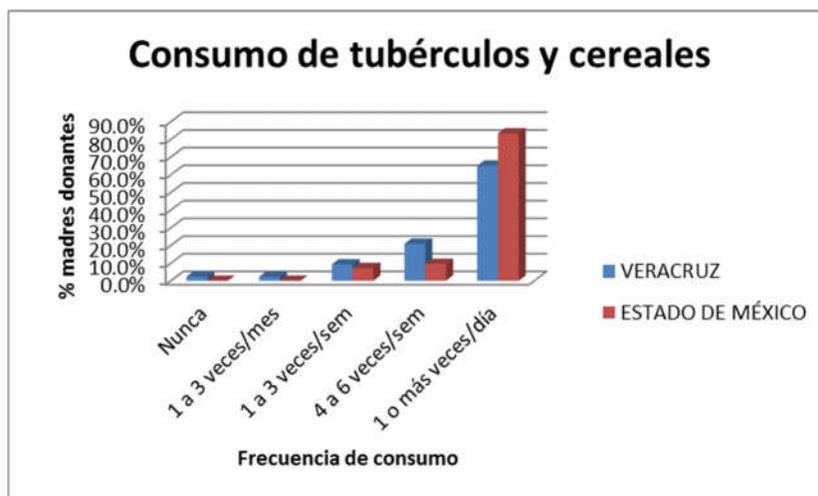


Figura 14. Frecuencia de consumo de tubérculos y cereales para las madres participantes, de ambos estados.

Los lácteos fueron otro tipo de alimentos consumidos con más frecuencia, para las poblaciones de ambos estados. El 84% de las participantes de Veracruz consumió este tipo de alimento 4 a 6 veces a la semana. En el caso de las participantes del Estado de México, la gran mayoría de las participantes (74%) consumió este tipo de alimento 1 o más veces al día (Fig. 15).

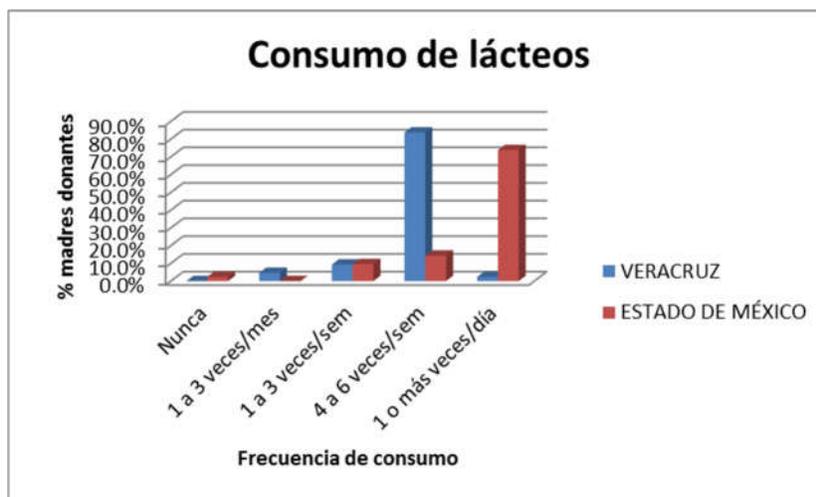


Figura 15. Frecuencia de consumo de lácteos para las madres participantes, de ambos estados.

La manteca de puerco fue de los productos consumidos con menos frecuencia, para las poblaciones de ambos estados. El 77% de las participantes de Veracruz nunca consumió este tipo de alimento. En el caso de las participantes del Estado de México, el 93% nunca consumió este tipo de alimento (Fig. 16).

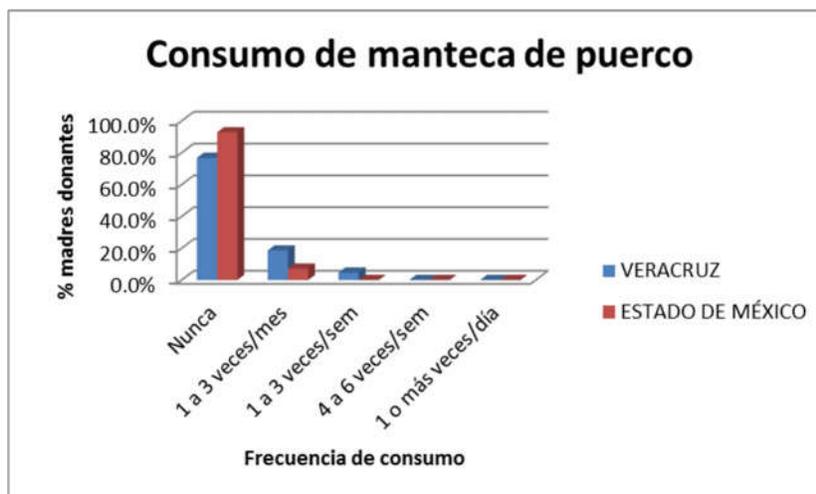


Figura 16. Frecuencia de consumo de lácteos para las madres participantes, de ambos estados.

El aceite vegetal, al igual que los tubérculos y cereales y que los productos lácteos, fue de los productos consumidos con más frecuencia, para las poblaciones de ambos estados. El 47% de las participantes de Veracruz consumió este producto 1 a 3 veces a la semana y el 42 % lo consumió 4 a 6 veces a la semana. En el caso de las participantes del Estado de México, la gran mayoría de las participantes (86%) consumió este tipo de alimento 1 o más veces al día (Fig. 17).

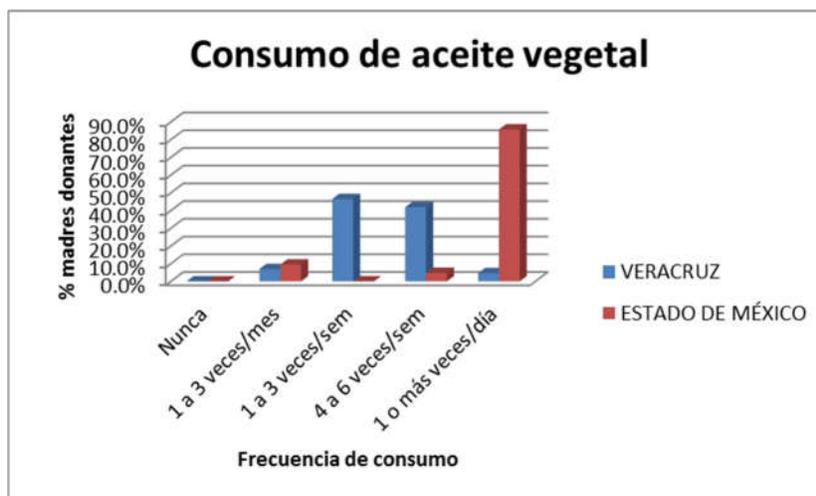


Figura 17. Frecuencia de consumo de aceite vegetal para las madres participantes, de ambos estados.

Analizando las gráficas que reflejan la dieta de las madres donantes que participaron en el estudio se puede observar que los alimentos consumidos con más frecuencia (frecuencia igual o superior a 1 a 3 veces a la semana) son las carnes rojas, las carnes blancas, los huevos, los tubérculos y cereales, los lácteos y el aceite vegetal. La mayoría de estos alimentos son ricos en grasas lo que puede incrementar la exposición a contaminantes lipofílicos como son los plaguicidas organoclorados. La contaminación de alimentos como los tubérculos y cereales puede ocurrir siempre y cuando se hayan utilizado los OCPs en los respectivos cultivos o a través de la presencia de estos contaminantes en el ambiente.

7.2.1.9. Exposición ocupacional y/o ambiental a los plaguicidas organoclorados.

Considerando la exposición ambiental, el 79% de las madres donantes de Veracruz afirma vivir cerca de algún foco de contaminación (rio contaminado, basurero, zona de agricultura intensiva u otros). En el caso de las madres donantes de este estado que viven cerca de lugares donde se aplican plaguicidas, ninguna de las participantes sabe que plaguicida (s) se usan. Relativamente a las madres donantes del Estado de México, el 38% afirma vivir cerca de algún foco de contaminación (mencionados anteriormente) y al igual que Veracruz, las participantes que viven cerca de lugares donde se aplican plaguicidas, no saben que tipo de plaguicidas usan. El 52% de las madres procedentes de Veracruz realizan rociamiento intradomiciliar. De las madres procedentes del Estado de México, apenas 2% realizan rociamiento domiciliar. En ambos casos, los productos que afirman usar no contienen plaguicidas organoclorados en su formulación. Los productos más utilizados a nivel doméstico son Raid, H24 y Baygon. Analizando esta información se puede verificar que la mayoría de las madres donantes de Veracruz están ambientalmente expuestas a diferentes tipos de contaminantes. Sin embargo, no hay información clara sobre la exposición específica a OCPs. Lo que sí se sabe es que grandes cantidades de plaguicidas organoclorados, como es el caso del DDT, fueron utilizadas por décadas en Veracruz [52] y aunque ya no se usen, se siguen detectando en diferentes matrices como ya se mencionó anteriormente y como se pudo verificar en las muestras de leche analizadas. En el caso del Estado de México, la exposición a diferentes contaminantes por la cercanía con algún foco de contaminación conocido es menor, siendo el valor de 38%. También en este caso, no hay información precisa sobre una posible exposición a plaguicidas organoclorados.

Relativamente a la exposición ocupacional de las madres consideradas para el estudio, se pudo verificar que en Veracruz no hay casos de participantes ocupacionalmente expuestas. Por otro lado, en el Estado de México se encontró un caso de una madre participante ocupacionalmente expuesta a plaguicidas (campesina). Sin embargo, ninguno de los plaguicidas incluidos en este estudio fue detectado en la muestra de leche correspondiente. Lo más probable es que en el grupo de plaguicidas con los cuales esta participante está en contacto, no están incluidos los plaguicidas que se están estudiando.

7.2.2. Estimación del consumo de plaguicidas OC en el Estado de México y en el Estado de Veracruz.

México inició la producción de plaguicidas organoclorados, como el DDT, en la década de 50. Como consecuencia del apoyo del gobierno a la industrialización y tecnificación agrícola en esa época, la industria de agroquímicos aumentó su crecimiento drásticamente, posicionando a México como el principal productor de DDT en América Latina a partir de 1959 y aumentando su capacidad para la producción de otros insecticidas como el lindano y el toxafeno [39].

Los productos más consumidos en el grupo de clorados producidos en México fueron: el lindano, seguido por el DDT. Entre 1975 y 1981, el promedio anual de consumo fue de 3 550 toneladas, posteriormente su tendencia de consumo fue decreciendo, hasta que en 1984, sólo representaba 10% del total de los clorados [39].

En el año 1981, se calcula que se aplicaba más de la mitad de los plaguicidas usados en el país, en los cultivos de algodón y de hortalizas, que representaban solo el 2.5% de la superficie agrícola. Otro hecho importante, es que la agricultura había estado prácticamente estancada después de 1990 y que la interrupción del crédito para el avío de los pequeños agricultores y ejidatarios por parte de BANRURAL, junto con la crisis económica de 1994, contribuyeron a disminuir el consumo de agroquímicos. Esta situación, junto con la quiebra de pequeñas formuladoras privadas o pertenecientes a sociedades de producción rural, puede que haya contribuido a la generación de plaguicidas caducados o fuera de uso. En lo que respecta a la distribución geográfica de las zonas con mayor uso de plaguicidas en la agricultura o con fines sanitarios, respectivamente, la Tabla 5 ilustra la situación hasta 2000 [52].

Tabla 5. Zonas con mayor uso de plaguicidas en México, 2000. [52]

LUGAR	ESTADO O ZONA
1	SINALOA
2	CHIAPAS
3	VERACRUZ
4	JALISCO-NAYARIT-COLIMA
5	SONORA-BAJA CALIFORNIA
6	TAMAULIPAS
7	MICHOACÁN
8	TABASCO
9	ESTADO DE MÉXICO
10	PUEBLA-OAXACA

NOTA: ALREDEDOR DEL 70% DE LOS PLAGUICIDAS SE CONSUMEN EN LAS PRIMERAS SEIS ENTIDADES Y DE ELLAS, SINALOA ES EL PRIMER CONSUMIDOR.

En el marco del Convenio de Estocolmo se prevé la eliminación de ciertos plaguicidas organoclorados que son contaminantes orgánicos persistentes, entre los cuales se encuentran el aldrín, clordano, DDT, dieldrín, endrín, heptacloro, HCB, mirex y toxafeno [39].

El uso del DDT en México se extendió rápidamente a partir de la década de los 50s por la Campaña Nacional para la Erradicación del Paludismo (CNEP). Cuando se iniciaron las operaciones, la CNEP estableció que la superficie de las viviendas a rociar era en promedio 181 m² y que cada rociador rendía en promedio de 8.6 casas/día. En años posteriores la superficie de la vivienda fue de 250 m² con un rendimiento de 7 a 8/días/trabajador. Al principio de la campaña, la intensidad de los rociados fue alta. De 1957 a 1960 el promedio anual fue de 5.7 millones, descendiendo en el periodo de 1961 a 1980 a 3.3 millones. En la década de los ochentas se redujo al mínimo con 829 mil rociados en promedio anual. La reducción de rociados resultó en un deterioro importante del programa, incrementando la transmisión, por lo que se inició una nueva estrategia llamada Plan de Acciones Intensivas Simultaneas (PAÍS). Sin embargo, su herramienta básica fue nuevamente el rociado domiciliario con DDT, el cual se fue reduciendo cada

vez por el impacto positivo del programa. De 1989 a 1991 se aplicaron en promedio 1, 778 375 rociamientos. De 1992 a 1999, la media anual descendió al 21% del periodo anterior. En los últimos dos años del programa, su aplicación fue de manera ocasional [53]. En la Tabla 6 se ilustra el uso de DDT para el control del paludismo en México, entre 1988 – 1999.

Tabla 6. Uso de DDT para el control de paludismo en México, 1988-1999. [51]

Estado	DDT al 75%, tons
Chiapas	1,365.305
Oaxaca	1,301.530
Guerrero	1,099.480
Quintana Roo	892.287
Michoacán	797.460
Veracruz	739.510
Sinaloa	668.956
Tabasco	534.962
Campeche	350.238
Puebla	288.360
Morelos	245.230
Nayarit	189.649
Hidalgo	156.092
Sonora	146.69
Jalisco	121.05
Colima	109.97
San Luis Potosí	104.571
Querétaro	61.99
Chihuahua	59.117
Estado de	44.799
México	
Durango	38.306
Zacatecas	26.462
Tamaulipas	16.308
Guanajuato	10.063

Estado	DDT al 75%, tons
Aguascalientes	2.41
Nuevo León	1.642
Baja California	1.106
Sur	
Total	8,900.181

Como se puede observar, el uso del DDT fue dieciséis veces superior, aproximadamente, para Veracruz cuando comparado con la cantidad del mismo compuesto usada en el Estado de México.

7.2.3. Desarrollo y validación de la metodología analítica para la determinación de los niveles de plaguicidas OC en las muestras de leche materna.

Para la determinación de los plaguicidas organoclorados se llevó a cabo el desarrollo y validación de una metodología analítica que incluye microextracción en fase sólida, cromatografía de gases y espectrometría de masas. Se utilizó leche entera de vaca comercial para el desarrollo del método por su semejanza con la leche materna y fácil adquisición. De todos modos, se pretendía desarrollar una técnica que pudiera ser aplicada al análisis de diferentes tipos de leche. Se han propuesto varios métodos para la determinación de OCPs en la leche [6, 46]. Sin embargo, pocos de ellos reportan el uso de SPME como técnica de extracción.

7.2.3.1. Optimización de la técnica de extracción (SPME)

En lo que respecta al modo de extracción, el modo de *headspace* (“espacio de cabeza” que sería el espacio del vial no ocupado por la muestra) es preferible debido a la complejidad de la matriz, que podría causar la rápida saturación de la fibra y por lo tanto disminuir su tiempo de vida significativamente. Los estudios preliminares para la optimización de las condiciones de SPME se llevaron a cabo, para algunos de los pesticidas seleccionados (2,4'-DDD; 4,4'-DDE; HCB; lindano).

En cuanto al recubrimiento de la fibra, se compararon cuatro diferentes tipos de revestimientos: 75 µm CAR/PDMS, 100µm PDMS, 65 µm PDMS/DVB, y 50/30 µm DVB/CAR /PDMS. Se obtuvieron los mejores resultados para la fibra de DVB/CAR/PDMS,

excepto para el plaguicida 2,4'-DDD (Fig. 18). Por esta razón, la fibra DVB/CAR/PDMS fue la elegida.

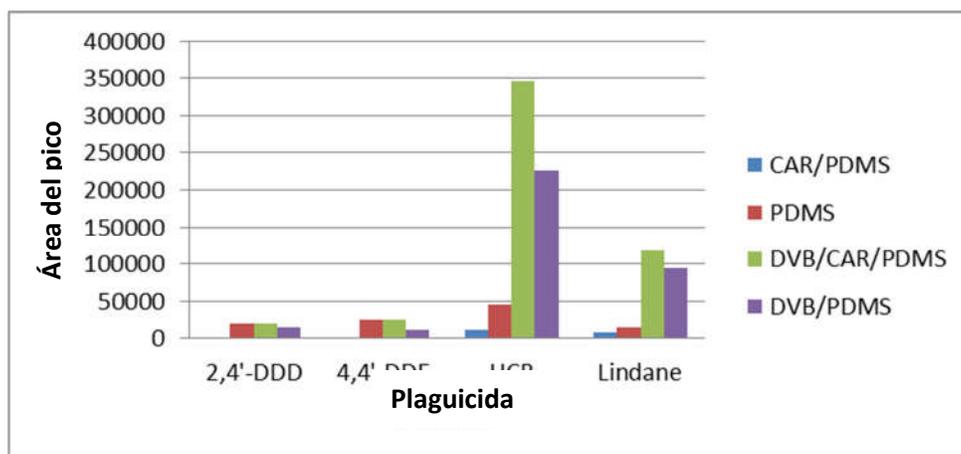


Figura 18. Influencia del revestimiento de las fibras en las áreas cromatográficas de los picos obtenidos, para algunos de los plaguicidas estudiados.

Variables como la agitación, temperaturas de extracción, tiempos de extracción, y el tiempo de desorción también se consideraron para optimizar la técnica de extracción. Se estudiaron tres temperaturas de extracción: 70, 80 y 90 °C (Fig. 19). Se obtuvieron Los mejores resultados para la temperatura de 90 °C. Por lo tanto, se seleccionó la temperatura de extracción de 90 °C.

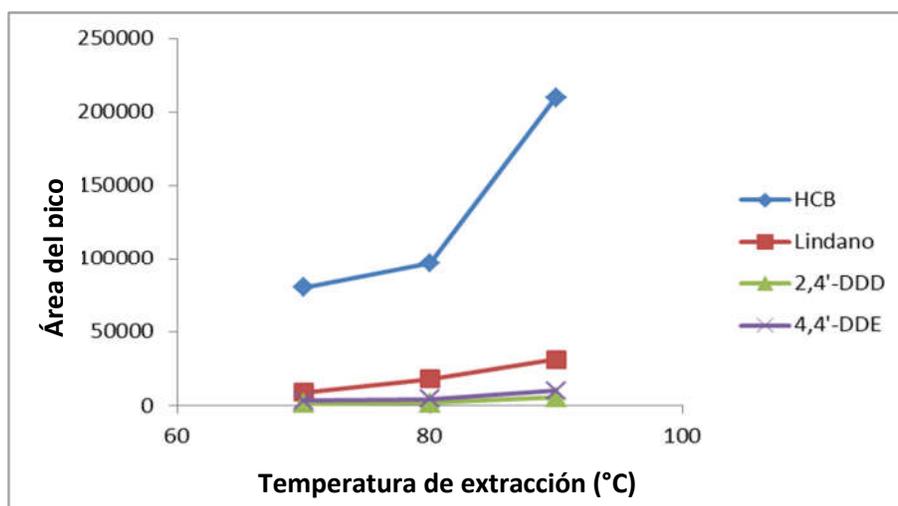


Figura 19. Influencia de la temperatura de extracción en las áreas cromatográficas de los picos obtenidos, para algunos de los plaguicidas estudiados.

Las extracciones con agitación presentaron mejores resultados que las extracciones sin agitación (datos no publicados). La agitación se realizó con una barra de agitación magnética. Se estudiaron tres tiempos de extracción: 30, 45 y 60 min (Fig. 20). Se obtuvieron los mejores resultados para los tiempos de extracción de 45 y 60 min, sin diferencias significativas entre ellos. Se eligió el tiempo de extracción de 45 min para reducir el tiempo de análisis de las muestras.

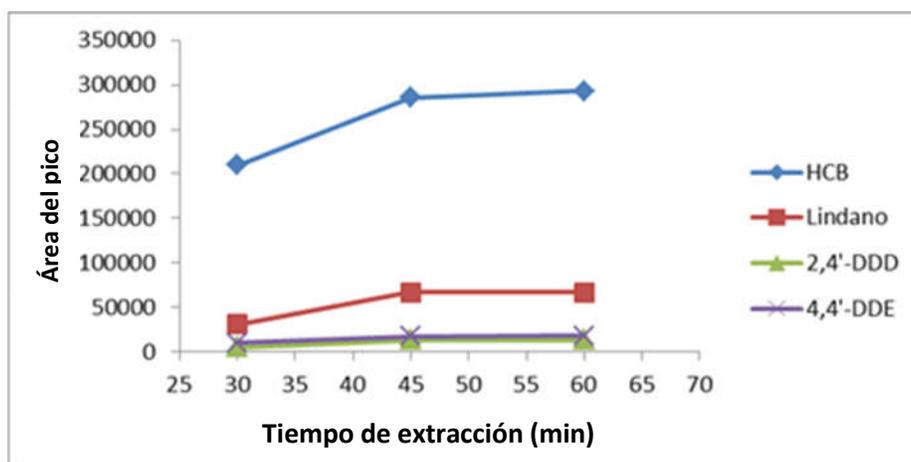


Figura 20. Influencia del tiempo de extracción en las áreas cromatográficas de los picos obtenidos, para algunos de los plaguicidas estudiados.

Se estudiaron dos tiempos de desorción (2 y 5 min), entre los cuales no se verificó una diferencia significativa (datos no publicados). Se eligió el tiempo de desorción de 5 min para garantizar una limpieza efectiva de la fibra. La desorción de la fibra se llevó a cabo en el inyector.

Se estudió también el efecto de la adición de sal y ácido (datos no publicados). Sin embargo, se obtuvieron peores resultados con la adición de cada uno de ellos. El uso de ácido, permite la determinación de los plaguicidas que se encuentran en forma libre y/o conjugada y la degradación de los ftalatos que interfieren en el análisis cromatográfico de los plaguicidas [16, 46]. Sin embargo, este procedimiento puede limitar la determinación de algunos OCPs que son sensibles al tratamiento ácido [17, 46]. En el caso del presente estudio, el bajo rendimiento obtenido con el uso del ácido puede ser debido a la sensibilidad / degradación de los compuestos. En cuanto a la adición de sal, una vez que ayuda a la liberación de compuestos de la solución acuosa, en el caso de los pesticidas estudiados no es un factor relevante pues los OCPs se solubilizan en la fase lipídica.

7.2.3.2. Validación de la metodología analítica

Las curvas de calibración se obtuvieron fortificando las muestras de leche con la mezcla de los plaguicidas en estudio. Se usaron cinco niveles de concentración, con tres repeticiones cada uno, de acuerdo con los rangos de calibración adoptados (Tabla 3). Estos rangos fueron elegidos de acuerdo a la sensibilidad del equipo GC/MS a los compuestos en estudio.

En la tabla 5 se presentan los valores de la pendiente y del coeficiente de correlación (R^2) de las curvas de calibración obtenidas para cada plaguicida. Se obtuvo una buena linealidad para todos los compuestos (con $R^2 > 0,99$), con la excepción del 2,4'-DDD (0.9857) y del 4,4'-DDE (0.9875).

Los límites de detección (LOD) y cuantificación (LOQ) para cada plaguicida se determinaron experimentalmente y se presentan también en la Tabla 7. Se obtuvieron valores aceptables para los LOD y LOQ, para la mayoría de los OCPs estudiados. Los límites de detección y cuantificación varían entre 7,81 y 21,48 $\mu\text{g} / \text{L}$ y entre 9,36 y 42,95 $\mu\text{g} / \text{L}$, respectivamente.

Tabla 7. Valores de pendientes y coeficientes de correlación (R^2) de las curvas de calibración, límites de detección (LOD, $\mu\text{g}/\text{L}$) y cuantificación (LOQ, $\mu\text{g}/\text{L}$), porcentajes de recobro (R, %) y correspondiente porcentaje de desviación estándar relativa (% RSD, $n \geq 3$) para cada plaguicida.

Plaguicida	Pendiente	R^2	LOD ($\mu\text{g}/\text{L}$)	LOQ ($\mu\text{g}/\text{L}$)	R (%)*	RSD (%)
Aldrín	2534.7	0.9981	7.81	15.63	81.1	9.5
Dieldrín	543.83	0.9986	15.63	31.25	90.9	12
2,4'-DDD	536.34	0.9857	9.49	18.97	135.9	18.6
4,4'-DDE	506.37	0.9875	9.43	18.86	124.7	8.8
4,4'-DDT	163.36	0.9983	21.48	42.95	114.9	12.5
HCB	8831.1	0.9981	n.d.	9.36	104.4	13.1
Lindano	3822.9	0.9988	9.80	19.60	88.2	16.8

* - Valores de recobro para muestras de fortificadas con una concentración igual a la concentración del límite de cuantificación (con la excepción del HCB: 18.71 µg/L).

n.d. – no determinado.

Los valores de porcentaje de recobro se determinaron fortificando muestras de leche, analizadas previamente para comprobar la ausencia de plaguicidas. Este estudio se realizó para un nivel de concentración, con tres repeticiones. Los valores de porcentaje de recobro y correspondiente desviación estándar relativa (% RSD) se presentan en la tabla 5. Los valores obtenidos para este parámetro fueron satisfactorios para la mayoría de los compuestos estudiados (valores de recobro entre 70 y 120%, con RSDs \leq 20%), con la excepción del 2,4'-DDD y del 4'-DDE (con valores de recobro de 135.9 y 124.7 %, respectivamente), de acuerdo al documento de orientación sobre los procedimientos de control y validación de calidad analítica de residuos de plaguicidas en el análisis de alimentos, establecido por la Comisión Europea para la Salud y Protección del Consumidor [54]. La ocurrencia de la degradación del DDT en el inyector del cromatógrafo es un fenómeno conocido. Este compuesto puede degradarse a DDD y DDE durante el análisis cromatográfico, lo que puede justificar los valores de recobro elevados ($>$ 120%) del 2,4'-DDD y del 4,4'-DDE [55]. La repetibilidad fue determinada en las muestras de leche fortificadas con la mezcla de los OCPs en estudio. Se realizó la prueba en los tres niveles de concentración más bajos de la curva de calibración (en los dos niveles más bajos para el dieldrín y 4,4'-DDT), con tres repeticiones para cada nivel de concentración. Los resultados para la repetibilidad, en la forma de desviación estándar relativa (RSD, %) se presentan en la Tabla 8. Considerando el mismo documento establecido por la Comisión Europea, SANCO/12571/2013 [54], se obtuvieron buenos resultados para la repetibilidad para la mayoría de los compuestos estudiados (valores de RSDs entre 7.3 – 23.6%). Los peores resultados fueron obtenidos para el aldrín (31.25 y 62.50 µg/L) y para el 2,4'-DDD (37.94 µg/L), con RSD $>$ 20 %. La precisión intermedia fue determinada en muestras de leche fortificadas con las mismas concentraciones utilizadas para las pruebas de repetibilidad. El estudio de la precisión intermedia se llevó a cabo usando cuatro preparaciones diferentes y cada preparación fue analizada en días diferentes. Los valores de la precisión intermedia, en la forma de RSD (%), se presentan en la tabla 6. También se observaron buenos resultados para este estudio, para la mayoría de los OCPs analizados (valores de RSD entre 2.2 – 20.8%), de acuerdo al mismo documento

anteriormente mencionado (EC SANCO/12571/201 [54]. Los peores resultados fueron obtenidos para el aldrín (15.63 µg/L), para el dieldrín (31.25 µg/L) y para el lindano (19.69 µg/L) con RSD > 20 %.

Table 8. Repetibilidad ($n \geq 3$) y precisión intermedia (RSD, %) de los plaguicidas en estudio.

Plaguicidas	Conc. (µg/L)	Repetibilidad (RSD, %)	Precisión intermedia (RSD, %)
Aldrín	15.63	9.5	20.8
	31.25	21.2	17.0
	62.50	22.5	19.2
Dieldrín	31.25	20.0	20.4
	62.50	10.4	17.1
2,4'-DDD	18.97	18.6	19.3
	37.94	23.6	19.1
	75.88	12.1	19.0
4,4'-DDE	18.86	8.8	18.4
	37.72	19.2	14.3
	75.45	7.9	18.8
4,4'-DDT	42.95	12.5	19.9
	85.91	9.3	19.5
HCB	18.71	13.1	18.3
	37.42	7.3	8.4
	74.84	16.9	17.7
Lindano	19.60	16.8	20.2
	39.20	19.6	4.9
	78.41	22.4	2.2

Los efectos de la matriz dependen de numerosos factores como son el número y tipo de centros activos en el inyector y en la columna cromatográfica, la naturaleza del plaguicida, el tipo de matriz, entre otros. La estrategia más efectiva para compensar este efecto suele ser el uso de estándares internos deuterados. Sin embargo, estos compuestos son caros y no están disponibles para todos los compuestos [55]. La dilución de las muestras podría

ser otra opción para reducir los efectos de la matriz. No obstante, una dilución de una muestra original de leche con una concentración baja de OCPs podría omitir la presencia de los compuestos, impidiendo su cuantificación. Por esta razón, se adoptó el análisis de las muestras de leche maternal sin dilución. Otro problema de la matriz leche es la imposibilidad de obtener una mezcla homogénea pues este alimento se presenta como emulsión. Para reducir este efecto, se usó la agitación Vórtex.

Además de los efectos de la matriz de estudio, es difícil mantener todas las condiciones más ventajosas para el análisis desde el primero hasta el último análisis de la secuencia de trabajo, porque se necesitan 90 minutos (aproximadamente) para la obtención de un resultado. Durante una secuencia de trabajo, la fibra DVB/CAR/PDMS, el liner del inyector, la columna y, en particular, el detector se van ensuciando, perdiendo sensibilidad. Esto puede explicar porque algunos resultados de repetibilidades son más altos cuando comparados con los valores de precisión intermedia para el mismo plaguicida y la misma concentración. También por esa razón se pueden observar valores de desviación estándar relativa más altos (en el caso de la repetibilidad y precisión intermedia) para las concentraciones más altas, cuando comparados con los valores obtenidos para las concentraciones más bajas y para el mismo plaguicidas. Estas variaciones pueden también justificar los valores más altos de recobro así como los valores LOD y LOQ.

Por otro lado, debido a la espectrometría de masas, se pudo obtener una metodología sensible pues el método de detección utilizado permite la identificación de todos los compuestos presentes en la muestra.

7.2.4. Evaluación de la influencia de los factores ambientales y biológicos, en los niveles de exposición de los lactantes.

Los resultados y discusión relativos a este punto se encuentran en el artículo con el título "Infants' exposition to organochlorine pesticides through breast milk intake. A case study of two Mexican populations" enviado a la revista Chemosphere.

7.2.5. Evaluación de la exposición de los lactantes a plaguicidas organoclorados por ingesta de leche materna.

Los resultados y discusión relativos a este punto se encuentran en el artículo con el título “Infants’ exposition to organochlorine pesticides through breast milk intake. A case study of two Mexican populations” enviado a la revista Chemosphere.

7.2.6. Asociación con el riesgo a su salud.

Los efectos tóxicos de los plaguicidas organoclorados han sido reportados en diversos trabajos. Se ha demostrado que estos compuestos provocan efectos estrogénicos o anti-estrogénicos, actúan como disruptores endocrinos [9, 10] pueden causar hepatotoxicidad, inmunotoxicidad, anormalidades en el desarrollo y efectos neuroconductuales [10], entre otros, como ya se mencionó anteriormente. La exposición a plaguicidas organoclorados ha sido asociada con un incremento de riesgo de cáncer de mama en humanos. Los plaguicidas aldrín y dieldrín tienen el mayor potencial carcinogénico. El lindano ha sido relacionado como causa de anemia aplásica. Se ha reportado también el potencial del DDT para causar cáncer y problemas reproductivos [51]. Los fetos humanos y los infantes son significativamente más sensibles a los contaminantes ambientales que los adultos [10], debido a su crecimiento dinámico y a sus procesos de desarrollo [6], por lo tanto los efectos adversos de estos compuestos tendrán un mayor impacto. Se ha reportado una fuerte asociación entre los niveles de 4,4’ – DDE en suero materno con nacimientos prematuros y bajo peso de los bebés al nacer [48]. Se ha sugerido también que la exposición prenatal a altos niveles de DDE puede estar asociada con alteraciones en el crecimiento de bebés e infantes [57]. Pérez-Maldonado y su equipo (2006) reportaron dos tipos de efectos en niños por exposición al plaguicida DDT: efectos neurológicos e de inmunodeficiencia [58].

En el presente estudio, se detectaron los plaguicidas 2,4’-DDD, 4, 4’-DDE y HCB en las muestras contaminadas. En el caso del Estado de México no se encontraron estudios anteriores donde se reporte el monitoreo de estos plaguicidas. Sin embargo, a pesar de que solo el 10 % de las muestras de esta región presentaron alguno de los contaminantes estudiados, las dosis de exposición diaria por ingesta de leche materna para el HCB, que se calcularon con base en los niveles de plaguicida determinados, son preocupantes siendo hasta 165 veces más elevada que la dosis de ingesta diaria admisible para este

compuesto. Los bebés cuyas madres presentaron una carga de contaminante considerable en su organismo nacieron sanos, sin embargo, por los niveles de OCPs alarmantes encontrados (principalmente para el HCB) sería adecuado seguir de cerca su desarrollo pues los efectos de esta contaminación pueden hacerse notar más tarde. En el caso del estado de Veracruz, la frecuencia de muestras contaminadas fue de 37% siendo que el 4,4'-DDE fue detectado en todas las muestras de esta región y el HCB en apenas una. También en este estado los niveles detectados de OCPs son preocupantes. Para el plaguicida HCB, la dosis de exposición diaria por ingesta de leche materna es casi 20 veces superior a la dosis de ingesta diaria admisible (ADI). En el caso del plaguicida 4,4'-DDE, dos de las muestras representan dosis de exposición 1.5 y 2 veces superior al valor del ADI para este compuesto. A pesar de que la mayoría de las muestras procedentes de Veracruz contaminadas con 4,4'-DDE corresponden a dosis de exposición diaria por ingesta de leche materna inferiores al ADI no dejan de ser valores preocupantes pues el valor de ADI que se considera es un valor establecido para la suma de DDT y sus metabolitos (como es el caso del 4,4'-DDE). En este estudio no se analizaron todos los metabolitos del DDT y por lo tanto no se puede garantizar que, aunque el 4,4'-DDT y el 2,4'-DDD no hayan sido detectados y los niveles del 4,4'-DDE correspondan a dosis de exposición diaria inferiores a la dosis de ingesta diaria admisible, la suma de las dosis de exposición diaria para el DDT y sus metabolitos no estén rebasando el ADI. Comparando los resultados de este trabajo con resultados anteriormente publicados relativos a la contaminación de la leche materna por OCPs en el estado de Veracruz [28], se puede verificar que los niveles de plaguicidas organoclorados detectados han disminuido. Sin embargo, los valores que se reportan en este estudio siguen representando un riesgo para los lactantes. A pesar de que estos compuestos ya no se está usando en México, por su elevada persistencia, probablemente el tiempo que ha transcurrido desde que fueron prohibidos no fue suficiente para garantizar su total desaparecimiento del ambiente. Los bebés procedentes de Veracruz cuyas madres estaban contaminadas con alguno de los OCPs estudiados nacieron igualmente sanos, pudiendo presentar algún tipo de problema relacionado con la contaminación por OCPs a lo largo de su desarrollo.

7.2.7. Elaboración de las recomendaciones o estrategias que apoyen a la protección de las poblaciones afectadas.

La relación entre las concentraciones de DDE y DDT (DDE/DDT) permiten describir las características de la exposición: a medida que el valor aritmético de este coeficiente es mayor que la unidad y se incrementa, refleja una exposición no reciente al DDT, además de la ingestión de alimentos contaminados preferentemente con DDE [59]. En el caso del presente estudio, ya no se detectó DDT por lo que se puede decir que la contaminación observada tiene origen en una exposición no reciente al DDT, sumándose alguna contaminación directa por DDE. Siendo compuestos ya prohibidos en México, sus concentraciones han venido a disminuir en el ambiente. Sin embargo, siguen detectándose niveles todavía preocupantes. Por lo tanto es importante seguir con programas de monitoreo para evaluar el nivel de exposición de los lactantes a estos compuestos. En el caso de madres cuyo organismo presenta una carga de contaminante (s) considerable, aunque su bebé haya nacido sano, sería recomendable evaluar el desarrollo del lactante/infante en sus primeros años de vida para verificar que efectos puede tener esta contaminación y si en casos similares posteriores es recomendable alimentar al bebé con leche materna o no. Relacionando valores de contaminación presentes en el organismo de las madres con efectos en el feto y en el lactante/infante (considerando una evaluación de su desarrollo en los primeros años de vida) se deberían establecer límites máximos de residuos para estos compuestos en leche materna (que no existen) a partir de los cuales no sería recomendable alimentar al lactante con leche materna. Obviamente, esta debería ser la última opción y solo si estrictamente necesaria teniendo en cuenta todos los beneficios que proporciona la leche materna para el bebé principalmente, pero también para la mamá.

En el caso del plaguicida HCB, a pesar de que también su uso está prohibido en México, este compuesto sigue siendo producido accidentalmente a nivel industrial, como ya se mencionó anteriormente. Para agravar el problema, hay que considerar su elevada persistencia que conlleva a su acumulación en el ambiente. En el caso de este plaguicida sería necesaria una legislación más estricta en lo que respecta a la liberación de residuos por parte de las empresas, sean sólidos, líquidos o gaseosos. De no ser así, se seguirá produciendo este peligroso contaminante que se acumula en las zonas industriales pero de ahí se puede transportar a otras zonas. Como ya se mencionó, se encontraron

muestras contaminadas con este compuesto cuya concentración representaba una dosis de exposición diaria por ingesta de leche materna hasta 165 veces superior al ADI. Estos valores son muy preocupantes y sería recomendable, como ya se sugirió anteriormente, evaluar el desarrollo de los bebés que están expuestos a estas cargas de contaminantes así como seguir con programas de monitoreo para evaluar la exposición de las poblaciones y en especial de fetos, bebés e infantes que son más sensibles a la presencia de los tóxicos.

8. CONCLUSIONES

Este trabajo tenía como principal objetivo la evaluación de los principales factores que pueden afectar la transferencia de los plaguicidas organoclorados a la leche materna y estimar la exposición infantil y el riesgo para la salud asociado. Se consideraron dos grupos de mujeres de dos estados de México con diferentes características geográficas y climáticas, así como diferentes políticas sobre la aplicación de los pesticidas estudiados. Se utilizó una metodología que incluye microextracción en fase sólida, cromatografía de gases y espectrometría de masas para la determinación de los OCPs en las muestras de leche materna. Se obtuvieron valores de linealidad, recobro, límites de detección y límites de cuantificación aceptables, permitiendo la determinación de los OCPs estudiados de una forma rápida y minimizando el uso de disolventes orgánicos y la producción de residuos peligrosos. 10% de las muestras de procedentes del EM estaban contaminados con al menos uno de los siguientes pesticidas: 2,4'-DDD, DDE y 4,4'-HCB. El HCB se detectó en todas las muestras contaminadas. 37% de las muestras de leche materna de Veracruz estaban contaminadas con al menos uno de los siguientes pesticidas: 4,4'-DDE y HCB. 4'4 - DDE se detectó en todas las muestras contaminadas de esta región. Los pesticidas 4,4-DDT, lindano, aldrín y dieldrín no fueron detectados en las muestras de leche analizadas.

De acuerdo con el análisis estadístico, los factores que influyeron en la contaminación de las muestras de leche fueron: edad de la madre, número de partos, duración del período de lactancia, consumo de tubérculos, cereales y huevos, clima de la región, temperatura media anual, precipitación anual y altitud. Considerando la estimación de la dosis de ingesta diaria admisible de los OCPs detectados, para el bebé, los resultados sugieren que la exposición a los compuestos detectados es alarmante y puede suponer un riesgo

inaceptable (especialmente la exposición al HCB para el grupo EM y la exposición al 4,4' – DDE para el grupo VC) para los lactantes alimentados con leche materna. A pesar de que la contaminación, en leche materna, en el estado de Veracruz parece estar disminuyendo, los valores de contaminación reportados en este trabajo siguen siendo preocupantes. En el caso del Estado de México, la producción accidental de HCB presenta un riesgo elevado para la población, en especial para fetos, bebés e infantes. Por lo tanto, el monitoreo de plaguicidas organoclorados persistentes (así como de otros contaminantes) debe ser llevado a cabo para evaluar la exposición a estos compuestos así como los riesgos asociados a su consumo desde el medio ambiente. Esto es particularmente importante en el caso de la exposición infantil, ya que los mecanismos de desintoxicación de los infantes no están completamente desarrollados, y por otro lado su principal fuente de alimento se deriva de la leche materna que constituye la principal vía de eliminación de estos compuestos por parte de las mamás.

9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] – Carvalho F. P., 2006. Agriculture, pesticides, food security and food safety. *Environmental Science and Policy*, 9, 685-692.
- [2] – Calva L. G., Torres M. R., 1998. Plaguicidas Organoclorados. *ContactoS* 30, 35 – 46.
- [3] – Mazariegos R. M. L., Septiembre 2007. EVALUACIÓN AMBIENTAL DE PESTICIDAS ORGANOCORADOS EN SEDIMENTOS DE LA LAGUNA DE CHANTUTO (CHIAPAS, MÉXICO) Y DE LA BAHÍA DE SANTANDER (CANTABRIA, ESPAÑA). Tesis Doctoral, Universidad de Cantabria (España), Escuela Técnica Superior de Ingenieros Industriales y de Telecomunicación, Departamento de Ingeniería Química y Química Inorgánica.
- [4] – Córdoba D., 2001. TOXICOLOGIA. Ed. Manual Moderno. Bogotá, Colombia (ISBN: 958 – 9446 – 04 - 3)
- [5] - http://www.alanwood.net/pesticides/index_cn_frame.html.
- [6] – Zhou P., Wu Y., Yin S., Li J., Zhao Y., Zhang L., Chen H., Liu Y., Yang X., Li X., 2011. National survey of the levels of persistent organochlorine pesticides in the breast milk of mothers in China. *Environmental Pollution*, 159, 524-531.
- [7] – Polder A., Skaare J. U., Skjerve E., Løken K. B., Eggesbø, 2009. Levels of chlorinated pesticides and polychlorinated biphenyls in Norwegian breast milk (2002-2006), and factors that may predict the level of contamination. *Science of the Total Environment*, 407, 4584-4590.

- [8] – Cabrera M. A. M., 2002. Toxicología Clínica. 3ª edición, Mendez Editores, México D. F. (ISBN: 9686596 98-4)
- [9] – Chao H. R., Wang S. L., Lin T. C., Chung X. H., 2006. Levels of organochlorine pesticides in human milk from central Taiwan. *Chemosphere*, 62, 1774-1785.
- [10] – Qu W., Suri R. P. S., Bi X., Sheng G., Fu J., 2010. Exposure of young mothers and newborns to organochlorine pesticides (OCPs) in Guangzhou, China. *Science of the Total Environment*, 408, 3133-3138.
- [11] – Polder A., Thomsen C., Lindström G., Løken K. B., Skaare J. U., 2008. Levels and temporal trends of chlorinated pesticides, polychlorinated biphenyls and brominated flame retardants in individual human breast milk samples from Northern and Southern Norway. *Chemosphere*, 73, 14-23.
- [12] – Azeredo A., Torres J. P. M., Fonseca M. F., Britto J. L., Bastos W. R., Silva C. E. A., Cavalcanti G., Meire R. O., Sarcinelli P. N., Claudio L., Markowitz S., Malm O., 2008. DDT and its metabolites in breast milk from the Madeira River basin in the Amazon, Brazil. *Chemosphere*, 73, S246-S251.
- [13] – Alawi M. A., Ammari N., Al-Shuraiki Y., 1992. Organochlorine pesticide contaminations in human milk samples from women living in Amman, Jordan. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 23, 235-239.
- [14] – Craan A. G., Haines D. A., 1998. Twenty-five years of surveillance for contaminants in human breast milk. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 35, 702-710.
- [15] – Abballe A., Ballard T. J., Dellatte E., Domenico A., Ferri F., Fulgenzi A. R., Grisanti G., Iacovella N., Ingelido A. M., Malisch R., Miniero R., Porpora M. G., Risica S., Ziemacki G., Felip E., 2008. Persistent environmental contaminants in human milk: Concentrations and time trends in Italy. *Chemosphere* 73, S220-S227.
- [16] – Esteban M., Castaño A., 2009. Non-invasive matrices in human biomonitoring: A review. *Environmental International*, 35, 438-449.
- [17] – Jaraczewska K., Lulek J., Covaci A., Voorspoels S., Skotarczak A. K., Drews K., Schepens P., 2006. Distribution of polychlorinated biphenyls, organochlorine pesticides and polybrominated diphenyl ethers in human umbilical cord serum, maternal serum and milk from Wielkopolska region, Poland. *Science of the Total Environment*, 372, 20-31.
- [18] – Tanabe S., Kunisue T., 2007. Persistent organic pollutants in human breast milk from Asian countries. *Environmental Pollution*, 146, 400-413.
- [19] – Haraguchi K., Koizumi A., Inoue T., Arada K. H., Hitomi T., Minata M., Tanabe M., Kato Y., Nishimura E., Yamamoto Y., Watanabe T., Takenaka K., Uehara S., Yang H. R., Kim M. Y., Moon C. S., Kim H. S., Wang P., Liu A., Hung N. N., 2009. Levels and regional

trends of persistent organochlorines and polychlorinated biphenyl ethers in Asian breast milk demonstrate POPs signatures unique to individual countries. *Environmental International* 35, 1072-1079.

[20] – Fujii Y., Haraguchi K., Harada K. H., Hitomi T., Inoue K., Itoh Y., Watanabe T., Takenaka K., Uehara S., Yang H. R., Kim M. Y., Moon C. S., Kim H. S., Wang P., Liu A., Hung N. N., Koizumi A., 2011. Detection of dicofol and related pesticides in human breast milk from China, Korea and Japan. *Chemosphere*, 82, 25-31.

[21] – Ennaceur S., Gandoura N., Driss M. R., 2008. Distribution of polychlorinated biphenyls and organochlorine pesticides in human breast milk from various locations in Tunisia: Levels of contamination, influencing factors, and infant risk assessment. *Environmental Research*, 108, 86-93.

[22] – Tsydenova O. V., Sudaryanto A., Kajiwara N., Kunisue T., Batoev V. B., Tanabe S., 2007. Organohalogen compounds in human breast milk from Republic of Buryatia, Russia. *Environmental Pollution*, 146, 225-232.

[23] – Mueller J. F., Harden F., Toms L. M., Symons R., Fürst P., 2008. Persistent organochlorine pesticides in human milk samples from Australia. *Chemosphere* 70, 712-720.

[24] – Kumar A., Dayal P., Shukla G., Singh G., Joseph P. E., 2006. DDT and HCH residue load in mother's breast milk: A survey of lactating mother's from remote villages in Agra region. *Environment International* 32, 248-251.

[25] – Yu Z., Palkovicova L., Drobna B., Petrik J., Kocan A., Trnovec T., Picciotto I. H., 2007. Comparison of organochlorine compound concentrations in colostrum and mature milk. *Chemosphere*, 66, 1012-1018.

[26] – Schade G., Heinzow B., 1998. Organochlorine pesticides and polychlorinated biphenyls in human milk of mothers living in northern Germany: Current extent of contamination, time trend from 1986 to 1997 and factors that influence the levels of contamination. *The Science of the Total Environment* 215, 31-39.

[27] – Brunetto R., León A., Burguera J. L., Burguera M., 1996. Levels of DDT residues in human milk of Venezuelan women from various rural populations. *The Science of the Total Environment*, 186, 203-207.

[28] - Waliszewski S. M., Pardío V. T., Chantiri J. N., Infanzón R. M., Rivera J., 1996. Organochlorine pesticide residues in human breast milk from tropical areas in Mexico. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 57: 22-28.

[29] – Prado G., Díaz G., Noa M., Méndez I., Cisneros I., Castorena F., Pinto M., 2004. Niveles de pesticidas organoclorados en leche materna de la Ciudad de México. *Agro Sur*, vol. 32, N° 2, 60-69.

- [30] – Waliszewski S. M., Sedas V. T. P., Infanzon R. M., Rivera J., 1995. Determination of organochlorine pesticide residues in human adipose tissue: 1992 Study in Mexico. *Environmental Contamination and Toxicology*, 55, 43-49.
- [31] – Waliszewski S. M., Pardío V. T., Waliszewski K. N., Chantiri J. N., Aguirre A. A., Infanzón R. M., Rivera J., 1997. Organochlorine pesticide residues in cow's milk and butter in Mexico. *The Science of the Total Environment* 208, 127-132.
- [32] – Waliszewski S. M., Pardío V. T., Waliszewski K. N., Chantiri J. N., Aguirre A. A., Infanzón R. M., Rivera J., 1998. Time tendency of organochlorine pesticide residues in cow's milk from agricultural region of Veracruz (México). *Fresenius Envir. Bull.* 7:238-243.
- [33] – Albert L. A., Septiembre 2005. Panorama de los plaguicidas en México. 7º Congreso de Actualización en Toxicología Clínica (<http://www.bvsde.paho.org/bvsacd/cd56/panorama.pdf>).
- [34] – Landis W. G., Yu M. H.. Introduction to Environmental Toxicology: Impacts of chemicals upon ecological systems. Ed. Lewis Publishers, 3ª Edición. U.S.A., 2004 (ISBN: 1-56670-660-2).
- [35] – Harris C. A., Woolridge M. W., Hay A. W. M., 2001. Factors affecting the transfer of organochlorine pesticide residues to breastmilk. *Chemosphere*, 43, 243-256.
- [36] – Stuetz W., Prapamontol T., Erhardt J. G., Classen H. G., 2001. Organochlorine pesticide residues in human milk of a Hmong hill tribe living in Northern Thailand. *The Science of the Total Environment*, 273, 53-60.
- [37] – ATSDR, 1992. Evaluación de Riesgos en Salud por la Exposición a Residuos Peligrosos. Departamento de Salud Humana y Servicios de los E.E.U.U., Servicio de Salud Pública, Agencia para las Substancias Tóxicas y el Registro de Enfermedades. Atlanta, Georgia 30333.
- [38] – Waliszewski S. M., Aguirre A. A., Infanzón R. M., Rivera J., Infanzón R., 1998. Time trend of organochlorine pesticide residues in human adipose tissue in Veracruz, Mexico: 1988 – 1997 survey. *The Science of the Total Environment* 221, 201-204.
- [39] - Torres, T. R., Nava, C. C., Avedoy, V. G., 2009. Diagnóstico nacional sobre la situación de los contaminantes orgánicos persistentes en México, primera ed. Instituto Nacional de Ecología y Cambio Climático, México.
- [40] – Wilkowska A., Biziuk M., 2011. Review: Determination of pesticide residues in food matrices using the QuEChERS methodology. *Food Chemistry*, 125, 803-812.
- [41] - Smith, R.M., 2003. Before the injection – modern methods of sample preparation for separation techniques. *J. Chromatogr., A* 1000, 3–27.

- [42] - Focant, J.-F., Sjödin, A., Turner, W.E., Patterson Jr., D.G., 2004. Measurement of selected polybrominated diphenyl ethers, polybrominated and polychlorinated biphenyls and organochlorine pesticides in human serum and milk using comprehensive two dimensional gas chromatography isotope dilution time-offlight mass spectrometry. *Anal. Chem.* 76, 6313–6320.
- [43] - Aguilera-Luiz, M.M., Plaza-Bolaños, P., Romero-González, R., Vidal, J.L.M., Frenich, A.G., 2011. Comparison of the efficiency of different extraction methods for the simultaneous determination of mycotoxins and pesticides in milk samples by ultra high-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Anal. Bioanal. Chem.* 399, 2863–2875.
- [44] - Mezcua, M., Repetti, M.R., Agüera, A., Ferrer, C., García-Reyes, J.F., Fernández-Alba, A.R., 2007. Determination of pesticides in milk-based infant formulas by pressurized liquid extraction followed by gas chromatography tandem mass spectrometry. *Anal. Bioanal. Chem.* 389, 1833–1840.
- [45] - Röhrig, L., Meisch, H.-U., 2000. Application of solid phase micro extraction for the rapid analysis of chlorinated organics in breast milk. *Fresenius J. Anal. Chem.* 366, 106–111.
- [46] – Martins, J. G., Chávez, A. A., Waliszewski, S. M., Cruz, A. C., Fabila, M. M. G., 2013. Extraction and clean-up methods for organochlorine pesticides determination in milk. *Chemosphere*, 92, 233 – 246.
- [47] - Merib, J., Nardini, G., Carasek, E., 2014. Use of Doehlert design in the optimization of extraction conditions in the determination of organochlorine pesticides in bovine milk samples by HS-SPME. *Analytical Methods* 6, 3254-3260.
- [48] - Minh, N.H., Someya, M., Minh, T.B., Kunisue, T., Iwata, H., Watanabe, M., Tanabe, S., Viet, P.H., Tuyen, B.C., 2004. Persistent organochlorine residues in human breast milk from Hanoi and Hochiminh city, Vietnam: contamination, accumulation kinetics and risk assessment for infants. *Environmental Pollution* 129, 431-441.
- [49] - Freire, C., Amaya, E., Fernández, M. F., González-Galarzo, M. C., Ramos, R., Molina-Molina, J. M., Arrebola J. P., Olea, N., 2011. Relationship between occupational social class and exposure to organochlorine pesticides during pregnancy. *Chemosphere* 83, 831-838.
- [50] - Sánchez, L. T., Carrilo, L. L., 2007. Human health effects and p,p'-DDE and p,p'-DDT exposure. The case of Mexico. *Ciencia e saúde colectiva* 12(1), 51-60.

[51] - Izquierdo, P., Allara, M., Torres, G., García, A., Piñero, M., 2004. Residuos de plaguicidas organoclorados en fórmulas infantiles. Revista Científica XIV (2), 1-13.

[52] – Nava, C. C., 2001. Situación en México de las existencias de plaguicidas sujetos al Convenio de Estocolmo (http://siscop.inecc.gob.mx/descargas/diagnos/diag_situacion_plaguicidas_convenio_estocolmo.pdf)

[53] – Instituto de Salud, Ambiente y Trabajo. Diagnostico situacional del uso de DDT y el control de la malaria. Informe regional para México y Centroamérica: <http://www3.cec.org/islandora/es/item/1755-diagnostico-situacional-del-uso-de-ddt-y-el-control-de-la-malaria>

[54] - European Commission, Guidance document on analytical quality control and validation procedures for pesticide residues analysis in food and feed, SANCO/12571/2013, 19 November 2013 (implemented by 01/01/2014).

[55] - Gfrerer, M., Lankmayr, E., 2005. DDT degradation during enhanced solid-liquid extractions: A consideration. Journal of Chromatography A 1072 (1): 117-125. DOI: 10.1016/j.chroma.2005.03.024

[56] - Cunha, S. C., Fernandes, A. Alves, Oliveira M. B. P. P., 2009. Fast low-pressure gas chromatography-mass spectrometry method for the determination of multiple pesticides in grapes, musts and wines. Journal of Chromatography A 1216: 119-126.

[57] – Cupul-Uicab, L. A., Hernández-Ávila, M., Terrazas-Medina, E. A., Pennell, M. L., Longnecker, M. P., 2010. Prenatal exposure to the major DDT metabolite 1,1-dichloro-2,2-bis(p-chlorophenyl)ethylene (DDE) and growth in boys from Mexico. Environmental Research 110, 595-603.

[58] – Pérez-Maldonado, I. N., Athanasiadou, M., Yáñez, L., González-Amaro, R., Bergman, A., Díaz-Barriga, F., 2006. DDE-induced apoptosis in children exposed to the DDT metabolite. Science of the Total Environment 370, 343-351.

[59] – Terrones, M. C., Llamas V., J., Jaramillo J., F., Espino L., M. G., Leon B., J. S., 2000. DDT y plaguicidas relacionados presentes en la leche materna y otros tejidos de mujeres sanas con embarazos de término. Ginecol. Obstret. Mex. 68(3), 97-104.

ANEXO 1

CUESTIONARIO

Estudio sobre los factores ambientales y biológicos que influyen en la exposición de lactantes a plaguicidas organoclorados a través de la ingesta de leche materna

1. Datos personales de la madre

NOMBRE DE LA MADRE (por favor, escribir en letras mayúsculas)	
EDAD	
ESTADO CIVIL	
TELÉFONO	
DIRECCIÓN	
Calle / N°	
Colonia	
C. P. / Ciudad	
Estado	
FECHA EN LA QUE COMPLETÓ EL CUESTIONARIO	
FECHA DEL PARTO	
FECHA DE LA COLECTA DE LECHE	

2. Medidas antropométricas de la madre (a la fecha de la colecta)

Altura (en centímetros)	Medida de cintura (en centímetros)	Peso (kilogramos)

3. Historial del embarazo y del bebé

3.1. Duración del embarazo, en semanas.

3.2. ¿Tuvo problemas de salud durante el embarazo?

No Sí ¿Cuáles? _____

3.3. Tipo de parto

Parto normal Cesárea ¿Por qué? _____

3.4. Sexo del bebé.

M F

3.5. Medidas antropométricas del bebé.

	Altura del bebé (en centímetros)	Peso del bebé (en gramos)
A la fecha del nacimiento		
A la fecha de la colecta		

3.6. ¿Cuántas veces amamanta su bebé, por día?

3.7. ¿Su bebé nació con algún problema de salud?

No Sí ¿Cuál? _____

4. Anteriores embarazos

4.1. ¿Ha estado embarazada anteriormente?

Sí (por favor complete la siguiente tabla)

No (ir a la **pregunta 5.1.**)

N°	Año	Duración emb. (semanas)	Sexo	Peso (g) al nacer	Aborto	Parto normal	Cesárea	Duración del período de lactancia (meses)	Problemas de salud/ Malformaciones
Ejemplo	2008	39	Niña	3250	-	X	-	6	-
1									
2									
3									
4									
5									
6									
7									
8									
9									
10									

5. Alimentación de la madre

5.1. ¿Con que frecuencia y en que cantidad consume los siguientes alimentos?

Alimento	Frecuencia				
	Nunca	1-3 veces /mes	1-3 veces /semana	4-6 veces /semana	Una o más veces /día
Carnes rojas (vaca, cerdo, cordero,...)					
Carnes blancas (pollo, pavo, conejo,...)					
Embutidos					
Huevos					
Pescado					
Marisco fresco o congelado					
Pan, papas, arroz o pasta					
Cereales (Avena,...)					
Productos lácteos (leche, crema, queso, yogurt)					
Manteca de puerco					
Aceite vegetal					

6. Residencia de la madre

6.1. ¿Ha tenido siempre el mismo domicilio?

No (responda por favor a la pregunta que sigue) Sí (ir a la **pregunta 6.3.**)

6.2. ¿Qué domicilio tenía anteriormente?

6.3. ¿Vive cerca de alguna zona contaminación?

- No Sí ¿Cuál o cuales?
- Rio contaminado
- Zona de agricultura intensiva
- Basurero
- Zona industrial
- Otros

6.4. ¿Vive cerca de algún lugar donde se apliquen plaguicidas ó fumigos?

(Plaguicidas pueden ser: insecticidas, fungicidas, herbicidas, rodenticidas)

No (ir a la pregunta 6.6.) Sí

6.5. ¿Con qué frecuencia se aplican esos plaguicidas?

No sé	Diario	1 vez/semana	2 veces/semana	Otro (¿Cada cuanto tiempo?)

6.6. ¿Realiza rociamiento / fumigación intradomiciliar, en su habitación?

No (ir a la **pregunta 7.1.**) Sí (responda por favor a la pregunta que se sigue)

6.7. ¿Con que frecuencia?

1 vez/semana

1 vez/mes

1 vez/año

Otra ¿Con que frecuencia?

6.8. ¿Conoce el nombre de lo que aplican cerca o dentro de su domicilio?

No (ir a la pregunta 7.1.)

Sí (llene por favor la tabla que sigue)

NOMBRE DEL COMPUESTO	¿QUIÉN APLICA?

7. Ocupación de la madre

7.1. ¿Cuál es su ocupación?

7.2. ¿En su ocupación está en contacto directo con plaguicidas?

No (ir a la pregunta 7.6.)

Sí

7.3. ¿Con que frecuencia está en contacto con plaguicidas?

Todos los días 9 veces al año

4 a 6 veces a la semana 6 veces al año

1 a 3 veces a la semana 3 veces al año

1 a 3 veces al mes Menos de una vez al año

7.4. ¿Qué marcas comerciales de plaguicidas maneja?

7.5. ¿Hace cuanto tiempo desarrolla esa ocupación (en años)?

7.6. ¿Vive con alguien que trabaja directamente con plaguicidas?

No Sí ¿Quién? _____

Ya ha finalizado este cuestionario. Muchas gracias por todo el tiempo y esfuerzo que ha puesto. Si tiene algún comentario/crítica por favor escríbala aquí:

ANEXO 2

CARTA DE

CONSENTIMIENTO

INFORMADO

CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

Título del estudio: “Factores biológicos y ambientales que influyen en la exposición de lactantes a plaguicidas organoclorados a través de la ingestión de leche materna”

Investigadores: M. en I.Q. Joana Gomes Martins, Dra. Araceli Amaya Chávez, Dr. Arturo Colín Cruz y Dr. Stefan Waliszewski

Lugar de realización del estudio: **Facultad de Química de la Universidad Autónoma del Estado de México.**

Los plaguicidas organoclorados son sustancias tóxicas que pueden provocar daños graves a la salud humana y al ambiente. Son compuestos muy persistentes y por eso se pueden encontrar en el ambiente, aunque ya no se usen desde hace muchos años. La contaminación por organoclorados puede ocurrir por ejemplo a través de los alimentos, en el lugar de trabajo (si trabajan principalmente en la agricultura), en la residencia (si se realiza fumigación para combatir los mosquitos), si el domicilio esta en una zona contaminada (suelos, agua ó , aire contaminados). Con este estudio se pretende conocer los niveles de contaminación, por estas sustancias, de la leche materna de madres donantes de dos estados de la Republica Mexicana (Edo de México y Veracruz). Así mismo, se pretenden conocer los factores ambientales y biológicos que influyen en los niveles de exposición de los bebés lactantes a organoclorados y los posibles riesgos a su salud.

SI ACEPTO PARTICIPAR EN EL ESTUDIO:

1. Responderé a un cuestionario que incluye información sobre datos personales, medidas antropométricas de la madre, historial del bebé, último embarazo y previos, alimentación, salud y hábitos de la madre, así como residencia y ocupación de la madre y del padre.
2. Se me hará una exploración física rutinaria en donde se tomarán medidas de mi peso, altura y diámetro de la cintura.
3. Donaré la cantidad de leche que me sea posible en el momento.

BENEFICIOS

1. Se me dará a conocer cuál es el estado de contaminación de mi leche.
2. Conoceré si la concentración de los contaminantes presentes en mi leche podrá ser perjudicial para mi bebé.
3. Conoceré los factores que posiblemente influyen en la contaminación que presenta mi leche.

CONFIDENCIALIDAD

Los resultados de todas las pruebas del estudio se discutirán conmigo y podré usarlos para consultar con mi médico familiar. Toda la información obtenida en este estudio será considerada confidencial y será usada sólo para efectos de investigación. La identidad de mi hijo se mantendrá de forma confidencial en la medida en que la ley lo permita.

IMPORTANTE

LA PARTICIPACIÓN EN ESTE ESTUDIO ES COMPLETAMENTE VOLUNTARIA, GRATUITA Y NO PRESENTA CUALQUIER TIPO DE RIESGO A LA SALUD

ASENTIMIENTO

Yo _____ acepto participar en esta investigación de manera libre y voluntaria. Me han explicado su objetivo, en qué consiste y los beneficios que obtendré.

Firma _____

Fecha. _____

CONSENTIMIENTO

(Para participantes con una edad menor a 18 años)

Acepto que mi hija participe en esta investigación DE FORMA LIBRE Y VOLUNTARIA. He recibido una copia de este impreso y he tenido la oportunidad de leerlo.

Nombre y firma del padre o tutor

Nombre y firma de la menor de edad

Fecha_____

ANEXO 3

PARTICIPACIONES EN

CONGRESOS

- I. Participación en el XI Congreso Internacional y XVII Congreso Nacional de Ciencias Ambientales, en junio de 2012, en Mazatlán, Sinaloa, México, con la ponencia “Metodologías para la determinación de plaguicidas organoclorados en leche: revisión”.



ANCA
ACADEMIA NACIONAL
DE CIENCIAS AMBIENTALES

**La Academia Nacional de Ciencias Ambientales
y La Universidad Autónoma Indígena de México**
Institución Intercultural del Estado de Sinaloa



uaim

Otorga la presente

CONSTANCIA

**A: Martins Joana, Amaya Araceli, Waliszewski Stefan,
Colín Arturo y García Magdalena**

Por su participación con la ponencia: “Metodologías para la determinación de plaguicidas organoclorados en leche: revisión”, en la modalidad cartel, llevada a cabo en el XI Congreso Internacional y XVII Congreso Nacional de Ciencias Ambientales: “Cuidar el planeta es tarea de todos”, los días 5, 6 y 7 de junio, en el Mazatlán International Center.

Mazatlán, Sinaloa, México; a 7 de junio de 2012.



Dra. María Guadalupe Ibarra Ceceña
Coordinadora General



Dr. Gustavo Enrique Rojo Martínez
Coordinador del Comité Científico

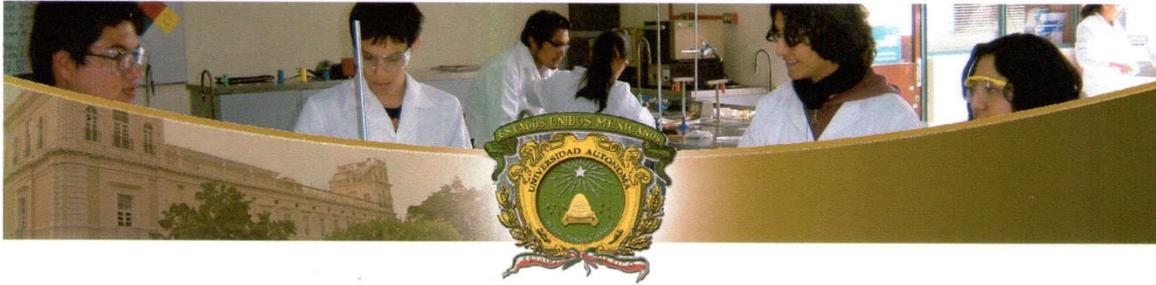
XI CONGRESO INTERNACIONAL Y
XVII CONGRESO NACIONAL DE
CIENCIAS AMBIENTALES

- II. Participación en el XIII Congreso Internacional y XIX Congreso Nacional de Ciencias Ambientales, en junio de 2014, en Acapulco, Guerrero, México, con la ponencia “SPME-GC/MS method for the determination of organochlorine pesticides in milk”.



ANEXO 4

RECONOCIMIENTO



UAEM | Universidad Autónoma
del Estado de México

Otorga el presente

Reconocimiento

A: Gómes Martins Joana

Alumno del Programa Educativo de
Doctorado en Ciencias Ambientales quinto
semestre por haber obtenido un promedio
general de 10.0

**30 de agosto del año 2013,
Semana de la Química XLIII Aniversario**

Patria, Ciencia y Trabajo
"2013, 50 Aniversario luctuoso del poeta Heriberto Enriquez"



Guadalupe Santamaría González
M. en A.P. Guadalupe Santamaría González

Directora

