



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

**MAESTRIA EN CIENCIAS DE LA
PRODUCCIÓN Y SALUD ANIMAL**

**Cinética de la eliminación de lindano en leche a diferentes
dosis en vacas en producción.**

T E S I S

PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRA EN CIENCIAS

PRESENTA

GABRIELA RIVERA PORTILLA

TUTOR: MSc. LUIS OCAMPO CAMBEROS

COMITÉ TUTORAL:
PhD. HÉCTOR SUMANO LOPEZ
M. en C. ISABEL GRACIA MORA

MÉXICO, D.F.

2007



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

DEDICATORIAS

A todos y cada uno de los profesores y profesoras que he tenido a lo largo de mis estudios, por la paciencia y dedicación a una de las tareas mas bellas, el enseñar y formar profesionales.

A mi familia, por el apoyo incondicional en momentos buenos y sobre todo en los malos.

AGRADECIMIENTOS

A la UNAM

A la facultad de medicina veterinaria y zootecnia.

Al departamento de fisiología y farmacología.

A la facultad de química.

Al departamento de toxicología.

A los compañeros y colegas.

CONTENIDO

Índice.

| | |
|--|------------|
| CUADRO DE FIGURAS | VII |
| INTRODUCCIÓN | 1 |
| MARCO CONCEPTUAL | 4 |
| Importancia de la producción láctea en nuestro país | 4 |
| Hexaclorociclohexano | 5 |
| Planteamiento del problema | 9 |
| Hipótesis | 11 |
| Objetivos | 11 |
| Metodología | 12 |
| Resultados | 16 |
| Discusión | 25 |
| Conclusiones | 27 |
| Bibliografía citada | 28 |

| | |
|--|-----------|
| Figura 1. Fórmula química de lindano | 5 |
| Figura 2. Cromatogramas de lindano (γ HCH) | 18 |
| Figura 3. Identificación de lindano por cromatografía de gases | 18 |
| Cuadro 1. Tamaño de respuesta de las repeticiones de lindano (lind) en cromatografía de gases y detector de captura de electrones | 19 |
| Cuadro 2. Promedios para obtener la regresión adicionando con lindano muestras de leche y sus porcentajes de recuperación | 19 |
| Figura 4. Regresión lineal de lindano para las muestras de leche adicionadas. | 20 |
| Cuadro 3. Estimado de la concentración con el uso de la regresión lineal a partir de intersección, pendiente y tamaño de la señal (ts). | 20 |
| Cuadro 4. Concentración de lindano ng/ml, en grasa de leche de vacas tratadas con 75 μg/kg. (Grupo A) | 21 |
| Figura 5. Cinética de eliminación de lindano en grasa leche, 75μg/kg (Grupo A) | 21 |
| Cuadro 5. Tamaño de la señal cromatográfica de lindano en grasa de leche de vacas 300 μg/kg (grupo B) | 22 |
| Figura 6. Cinética de eliminación de lindano en grasa leche, 300μg/kg (Grupo B) | 22 |
| Figura 7. Eliminación de lindano en grasa de leche de ambos grupos. | 23 |
| Cuadro 6. Estadística descriptiva de las concentraciones de lindano en leche de vacas tratadas vía dérmica. | 24 |
| Cuadro 7. Comparación entre tratamientos por cada día | 24 |
| Cuadro 8. Comparación de cada día en el mismo tratamiento. | 24 |

RESUMEN

Este trabajo tiene como objetivo determinar por medio de cromatografía de gases con detector de captura de electrones, el lindano en grasa de leche de vacas en producción, post tratamiento dérmico a 75 y 300 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Validar e implementar el método. Establecer los parámetros de la cinética: coeficiente de eliminación, vida media, tiempo de retiro. Se utilizaron 8 vacas por grupo con dos tratamientos con aspersion de 75 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ (grupo A) y 300 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (grupo B) por vaca de 500 kg. Se obtienen muestras de leche de 75 ml en cada cuarto desechando el despunte y congelándolas a -20°C hasta su análisis. En el proceso de validación se obtuvieron los siguiente datos: porcentajes de recuperación de 89.6 a 101.27 con un promedio de 99.37 ± 8.52 , con coeficiente de correlación (r) de ≥ 0.999 . Para el grupo "A" se obtuvo un coeficiente de eliminación de 0.3825 y una vida media de 1.81 días, obteniendo desde el día 6 de muestreo niveles inferiores al límite máximos permisible (MRL) señalado por la FAO/WHO de 0.01mg/kg en leche entera o 0.12mg/kg base grasa.. El grupo "B" se obtuvo un coeficiente de eliminación de 0.24369 y una vida media de 2.84 días, con niveles inferiores al MRL señalados el día 9 post tratamiento. El lindano en la grasa de la leche, se comporta como un fármaco de cinética de primer orden. Al aumentar las cantidades y frecuencia de aplicación; se aumenta la concentración en la leche. El método implementado fue validado y eficiente para satisfacer las condiciones rigurosas de su uso. Se identifico la cantidad mínima detectable de 0.001ppb y la mínima cuantificable 0.008ppb.

Palabras claves. Lindano, límites máximos permitidos. Cromatografía de gases.

ABSTRACT

The aim of this study was to determine lindane by gas chromatography and electron capture detector after a dermic treatment of 75 y 300 µg/kg group A and group B, to lactating cows. Validating and implementing as a secondary task the methodology. Establishing the kinetics parameters: excretion rate, half-life, and quarantine. There were 8 cows per group. The samples of 250 ml of milk (75 ml from each quarter) were frozen at - 20 °C until processing. The data obtain in the validation of the method was: recovery percentage 99.37 ± 8.52 standard deviation. A correlation coefficient of $(r) \geq 0.999$. For the group A the data was: an excretion rate of 0.3825, half-life of 1.81 days, reaching the maximum residue level of lindane established by WHO/FAO of 0.01 mg/kg or 0.12mg/kg fat basis since the sixth day of post treatment.. And for the group B an excretion rate of 0.24369, half-life of 2.84 days, with levels bellow the maximum residue level of lindane established by WHO/FAO on day 9th.. The lindane on milk fat behaves as a first order kinetics toxicant. While the doses and frequency of treatment increases, the concentration of the toxicant increase on the milk fat. The method was validated and is efficient, it satisfy the rigorous conditions required. The minimum detectable quantity was 0.001ppband the minimum quantify quantity was 0.008 ppb.

Key words: Lindane, maximum residue level, gas chromatography.

Cinética de la eliminación de lindano en leche a diferentes dosis en vacas en producción.

Introducción

Hoy en día no hay empresa que no tenga entre sus metas la calidad total de sus productos a fin de aumentar sus ventas y con visión de honestidad y competitividad mundial. Dentro del concepto de calidad total, en productos de origen animal no es factible concebir un producto de "calidad" que no cumpla con los lineamientos establecidos por las normas de sanidad del país productor, así como de los países donde se tenga planeado distribuir el producto final.

En nuestro país, tanto autoridades como productores, están concientes y comprometidos en preservar la salud pública y animal, así como mantener un nivel competitivo y de calidad en sus productos. Esto con el fin de establecer medidas que den mayor certeza a la inocuidad de los alimentos, al normar y controlar el uso de sustancias como aditivos, promotores de crecimiento, medicamentos veterinarios, plaguicidas entre los principales.¹

El gobierno federal mexicano, como responsable de la inocuidad de los alimentos, establece medidas sanitarias y fitosanitarias para asegurar el control en la presencia de residuos tóxicos y contaminantes; este trabajo se ejerce a través del "Comité intersecretarial para la revisión de los programas de residuos tóxicos y contaminantes en alimentos de origen animal" es coordinado por la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA) en el que participan otras dependencias como la Secretaría de Salud (SS), la Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT) y la Secretaría de Economía (SE). Así como delegados del sector privado, representado por los productores pecuarios. La industria farmacéutica y de los alimentos para animales, transformadores, comercializadores, sector académico y los consumidores. El grupo opera proponiendo y aprobando estrategias para el buen desempeño y manejo de los programas, asegurando que los productos cumplen requisitos internacionales de inocuidad y calidad, evitando la presencia de sustancias de alto riesgo para la salud de la población y el ambiente.

En el marco de las acciones para dar certeza al consumidor de la inocuidad de los alimentos que se producen en México, se publicó en 1984 en el diario oficial de la federación, el "Programa de Control de Residuos Tóxicos, Productos y Subproductos de Origen Animal".¹

A la fecha, las medidas están encaminadas a realizar acciones que tienen como finalidad mejorar el control y eliminación del uso de aquellos productos contaminantes, que se utilizan en la producción pecuaria; o que se integran a la cadena productiva derivadas de actividades industriales y/o comerciales principalmente.

En virtud de la calidad que requieren los productos mexicanos para consumo local y para la exportación, la vigilancia de la inocuidad es una responsabilidad compartida entre el sector oficial y el privado.

La SAGARPA, establece las funciones del Servicio Nacional de Sanidad Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SENASICA). Esta institución es la responsable de asegurar la calidad higiénico sanitaria de los alimentos de origen animal, producidos internamente y de los que ingresan al país. Esta misma institución elabora y evalúa programas de monitoreo y seguimiento epidemiológico (en caso de violación a los límites de tolerancia), además le corresponde ejercer el control de productos químicos farmacéuticos, plaguicidas, biológicos, equipos y servicios para animales.

En cuanto a la regulación de plaguicidas, fertilizantes y sustancias tóxicas, se creó la Comisión Intersecretarial para el Control de Proceso y Uso de Plaguicidas, Fertilizantes y Sustancias Tóxicas (CICLOPLAFEST), que inició sus funciones el 7 de diciembre de 1998. Tiene como objetivo realizar actividades coordinadas de regulación y control de plaguicidas, fertilizantes, y sustancias tóxicas, así como la expedición de registros y autorizaciones de importación, asegurándose que los productos autorizados cumplan con los requisitos internacionales de calidad; a fin de evitar el uso en México de sustancias de alto riesgo para el ambiente y la salud de la población.

Es importante definir lo que entendemos por “inocuidad” descrito en el diccionario de lengua española; del latín *innocuus* que no hace daño. Inocuidad en los alimentos: “La certeza práctica de que un alimento o ingrediente utilizado en una cantidad o manera acostumbrada no será causa de una lesión o daño en el consumidor”²

Es grande el esfuerzo que realizan la SAGARPA, SENASICA, y el sector privado para tratar de evitar que lleguen productos de origen animal con residuos de sustancias tóxicas al consumidor final; en la norma mexicana NOM-021-ZOO 1995, se establece el análisis de plaguicidas órganoclorados en grasa de bovinos, caprinos, porcinos y aves, por medio de estudios encaminados a verificar la presencia de estos contaminantes.

Los principales países exportadores han establecido sistemas de control que comprenden leyes, reglamentos y normas rigurosas, además de mecanismos de inspección, análisis y certificación externos, mediante los cuales los propios productores aplican medidas correctivas, que pueden llegar hasta la destrucción de los alimentos obtenidos de los lotes de animales, cuando se comprueba que no se han respetado las normas que regulan el empleo de sustancias químicas, o que los límites de aplicación de tales sustancias se han sobrepasado debido a malas prácticas de manejo que constituyan una contaminación endógena potencial, ya sea de tipo biológico o químico que afecten la salud pública.³

Se necesita llevar a México a la cumbre en competencia de productos de origen animal, para lo cual se requiere de una orientación y participación interdisciplinaria, la cual deberá incluir equipos multidisciplinarios de médicos expertos en salud ambiental, médicos especialistas en salud pública y salud animal, expertos en calidad total en alimentos, en tecnología de alimentos, en microbiología, química y toxicología para llevar a cabo todos los análisis y medidas necesarias para que los productos mexicanos compitan nacional e internacionalmente, abriendo un camino más ancho de exportaciones logrando al mismo tiempo cubrir las necesidades internas con la mejor calidad en alimentos de origen animal.

Es importante resaltar que todos los productos utilizados como terapéuticos de animales de consumo al humano, deben de contar con la información del tiempo de espera necesario para que estos productos no pasen en cantidades dañinas al consumidor final, el humano.

En este sentido, el trabajo esta encaminado a determinar la cinética de eliminación del plaguicida organoclorado gamma hexaclorociclohexano, "lindano", en grasa de leche vacas en producción tras su utilización tópica, determinando así el tiempo de retiro para obtener leche que cumpla con las normas de calidad mexicanas e internacionales.

Marco conceptual

Importancia de la producción láctea en nuestro país.

La producción de leche en México se considera prioritaria dentro de los programas de fomento, presentando el mayor potencial de expansión.⁴ Siendo la leche uno de los alimentos más completos por su alto contenido de nutrientes (aminoácidos esenciales) es considerado a nivel mundial un alimento necesario.

El valor de la producción de la leche y sus derivados en México para 2005, fue de 42 695 795 miles de pesos, con una producción de 4 688 598 toneladas, aún así, se importaron 505 587 miles de dólares en productos lácteos en el año 2005 y 508 636 miles de Dólares. En el primer semestre de 2006 (SAGARPA, INEGI, 2007), para poder cubrir la oferta interna, principalmente leche en polvo, obteniendo en promedio un consumo o disponibilidad *per capita* de 100 L al año. (273 ml al día).⁵

Los principales estados productores de leche (miles de litros) son, Coahuila 1,246,740, Jalisco 1,674,616, Durango con 1,013,414, Chihuahua 816,551, Veracruz 659,857, Guanajuato 665,007, para el año 2006, siendo principalmente la producción en las zonas de trópico, zonas de alta incidencia en ecto-parásitos, principalmente garrapata. Se sabe que las pérdidas relacionadas con enfermedades parasitarias son severas, tanto en producción como en ganancia de peso, estimando por cada garrapata una pérdida de peso de (0.26 a 1.29 Kg por garrapata al año).*, sin contar los problemas reproductivos, transmisión de hemoparásitos, y enfermedades severas, como piroplasmosis, anaplasmosis, hemoglobinuria, rickettsias bovinas, espiroquelosis bovina y anemias, calculando un costo de tratamiento y pérdidas de 47 millones de dólares por año entre Estados Unidos, Canadá y México.* En México se ha establecido zonas libres de garrapata, zonas en trabajo de erradicación y zonas de control, en la cual se localizan los principales productores de leche.

Históricamente han existido diferentes métodos de control para la garrapata entre ellos se encuentran los naturales, biológicos y los químicos. El principal método de control utilizado para combatir a la garrapata entre otros parásitos, es el químico y se logra por medio de plaguicidas aplicados por baños de aspersión, inmersión o tópicos, siendo de los principios activos más utilizados por muchos años los organoclorados y entre ellos, el lindano. En México se utilizan 19 toneladas de lindano al año para control de plagas en ganado.⁶

*/(www.siap.sagarpa.gob.mx/InfOMer/analisis/anleche.html#prodmexico)

El hexaclorociclohexano es un producto químico manufacturado que existe en 8 formas químicas diferentes llamadas estereoisómeros, El lindano (γ HCH) gamma hexaclorociclohexano es uno de los ocho estereoisómeros del 1,2,3,4,5,6, hexaclorociclohexano ($C_6H_6Cl_6$) cuyo peso molecular es 290.83 gramos/mol. Es un sólido blanco cristalino (CAS: 58-89-9) con punto de ebullición $112.8^\circ C$, presión de vapor $3,26 \times 10^{-5}$ mmHg a $20^\circ C$, densidad 1,85, insoluble en agua a $20^\circ C$, moderadamente soluble en etanol, éter, benceno-acetona, poco soluble en aceites minerales. Sumamente estable a la luz, calor, aire, dióxido de carbono y ácidos fuertes, es inestable en la presencia de álcalis (sufre dechlorinación) produciendo triclorobencenos y ácido hidrociorhídrico, así como a una exposición prolongada a altas temperaturas.⁷ Los isómeros de HCH se producen por medio de cloración fotoquímica del benceno y dan como resultado un producto llamado HCH técnico, (CAS: 608-73-1) éste se compone principalmente de 5 isómeros el alfa -HCH (53 a 70%), beta -HCH (3-14%), gamma-HCH (11-18%), delta -HCH (6-10%) y epsilon-HCH (3-5%). La mezcla fue ampliamente utilizada como un insecticida económico, pero el isómero gamma HCH fue el único que exhibe fuertes propiedades insecticidas, se le refina del HCH técnico y se comercializa con el nombre de lindano.⁷

El lindano se utiliza por primera vez en los años 40's como insecticida eficiente. El lindano puro (mayor a 99%) se concentra por tratamiento de mezclas de isómeros de HCH con metanol o ácido acético y cristalización. Aún el lindano puro contiene pequeñas cantidades de otros isómeros de HCH.⁸

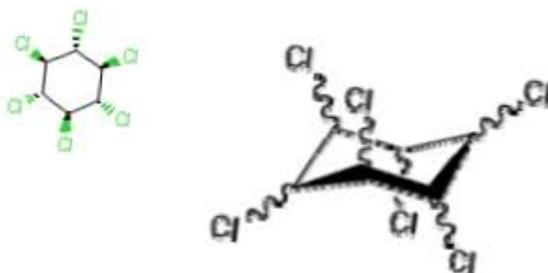


Figura1.-1,2,3,4,5,6, hexaclorociclohexano ($C_6H_6Cl_6$)

Sus principales metabolitos son: gamma-pentaclorociclohexano (dehidroclorinación), gamma-tetraclorohexano (dechlorinación), hexaclorociclohexano (hidroxilación). La metabolización hepática produce un gran número de metabolitos dentro de los cuales muchos permanecen aun sin identificar, aunque actualmente se conocen más de 80 metabolitos con diferentes estructuras químicas y actividades. Se metaboliza por enzimas dependientes del citocromo P-450.**

**(www.inchem.org/documents/jmpr/jmpmono/2002pr08.htm)

El lindano, también es conocido como gamma hexaclorociclohexano, (1 *alpha*, 2 *alpha*, 3 *beta*, 4 *alpha*, 5 *alpha*, 6 *beta*-1,2,3,4,5,6, hexaclorociclohexano) 1,2,3,4,5,6, hexacloruro de benceno, gamahexano, hexaclorano: Es un plaguicida y fumigante organoclorado con usos agrícolas, pecuarios, industriales y medicinales, así como en el control a vectores (campañas de salud pública).⁹ El lindano sigue siendo un ectoparasiticida de gran potencia y a pesar de que se le usa desde 1940, ha generado poca resistencia. Por su efecto larvicida, insecticida y acaricida, se le usa en diversas presentaciones en la industria pecuaria y agrícola, por tanto es factible que esté en contacto con el ganado productor de leche. Hay estudios en Francia donde relacionan la contaminación de la tierra y a el forraje como fuente de organoclorados al bovino.¹⁰ (Lindane (048) (R)***¹¹). Los Organoclorados son compuestos lipofílicos que pueden inducir alteraciones inmunológicas en el humano^{9, 12}, se les ha relacionado con riesgo de cáncer de próstata¹³, se sospecha posea influencias en el sistema endocrino.¹⁴ En esperma induce una rápida y transitoria despolarización de membrana y apertura de canales-voltaje de Ca²⁺, sin alterar la viabilidad celular.¹⁵ Existen evidencias de que el lindano causa efectos reproductivos y puede causar toxicidad en el desarrollo¹⁶. En un estudio de dos generaciones en ratas para evaluar su actividad como interruptor endocrino, no se encontró cambios en los niveles de hormonas sanguíneas, hay relación dosis dependiente de la capacidad de elevar las enzimas hepáticas, y disminución en el tamaño del timo, aumento en el tamaño de la tiroides como efecto de toxicidad en neonatos a dosis de 300 ppm en los F1, sin cambios histológicos, ni efectos en el ciclo estral, espermatogénesis, apareo, fertilidad, gestación o parto¹⁷. Estudios en poblaciones expuestas durante décadas a plaguicidas, se demostró influencia de estos en la glándula tiroides, acrecentó en el volumen de la glándula, aumento en la hipoecogenicidad, y provoco exageración de anticuerpos sanguíneos a tirodoperoxidasa.¹⁸ Experimentos en animales indican que el lindano en grandes dosis produce toxicidad testicular: ratas macho inyectadas con lindano a una dosis de 4 u 8 mg/kg por un lapso de 10 días, por vía intraperitoneal mostraron degeneración del tejido testicular. El lindano también se concentra en la leche materna y grasa corporal.¹⁹

Actualmente se encuentra clasificado por la Internacional Agency for Research in Cancer.(IARC)²⁰ como clase 2B, posible carcinogénico en humanos, por lo que está prohibido en 17 países, Costa Rica, Colombia, Dinamarca, Finlandia, Gambia, Honduras, Hungría, Indonesia, Kuwait, Nueva Zelanda, Holanda, Santa Lucia, Eslovenia, Sud África, Corea del Sur, Suecia y Turquía.²¹ El lindano es de uso restringido en Canadá y Estados Unidos desde 1994, en México desde 2004 (Plan de Acción Regional de América del Norte, PARAN, 2004), sin embargo tanto en México como en países del tercer mundo se sigue utilizando para el tratamiento de semillas en la agricultura, como ectoparasiticida en ganadería, y en lociones o jabones para tratamiento de sarnas y piojos en humanos en América (Canadá Estados Unidos y América Latina).⁶

***(www.fao.org/DOCREP/006/y.5221E/y5221eog.htm)

Los signos de intoxicación aguda oral (DL₅₀) en diferentes especies se han calculado en un rango de 56 a 480 mg/kg de peso corporal, las preparaciones en medios oleosos fueron más tóxicas que las acuosas, las concentraciones en ratas y ratones fueron similares, de 88 a 270 mg/kg en ratas, 56 a 246 mg/kg en ratones. La DL₅₀ dérmica para ratas fue de 900 mg/kg; dosis de 60 mg/kg (al 1% en crema) causó convulsiones, anorexia, y muerte en conejos al destete. En el humano la dosis fatal es de de 10 a 30 g alcanzando niveles séricos de 1.3 mcg/ml (etoxnet, 1996). La especie más susceptible es el ganado con dosis tóxica mínima de 25 mg/kg, **** Dosis de 88-270 mg/kg de peso en bovinos son lo suficientemente evidentes como para retirar al animal de la ordeña, incluyen estimulación del SNC con temblores, hasta convulsiones, colapso cardiovascular, acidosis respiratoria, arritmias cardíacas, pero es importante señalar que no altera las funciones reproductivas¹¹.

La vía de exposición más común al lindano para el ser humano, al igual que para otros compuestos organoclorados, son los alimentos, se ha detectado la presencia de lindano en tejidos adiposos de humanos y animales y en leche materna.^{19,23,24} El nivel de lindano en sangre materna se ha asociado con bajo peso del producto al nacimiento, y alteraciones en los niveles de hemoglobina sanguínea y presión diastólica en la madre.²³ No se ha encontrado relación con niveles sanguíneos de organoclorados y duración de gestación, peso al nacer o largo de cabeza a talón en una población de agricultores.²⁵ Existe una importante relación entre el consumo de productos animales con alto contenido de grasa, como la leche, el queso, el yogurt, el pescado, los mariscos, y las concentraciones de lindano en la leche materna humana y grasa corporal. Se ha calculado un NOAEL (no observed adverse effect level, Nivel al cual no se observa efecto adverso) de 0.33 mg/kg/día en estudios con ratas por 18 semanas²²; el LOAEL (lowest observed adverse effect level, nivel más bajo al que se observa efecto adverso) es de 1.55 mg/kg/día, se ha establecido en base a hipertrofia hepática y lesiones degenerativas de túbulos renales.²² El FRD/ADI (acceptable daily intake)²⁷ (“dosis de referencia, expresada ingesta diaria oral de contaminante en mg por individuo por unidad de tiempo kg/día”) para el lindano es de 0.008mg/kg/día.⁴³ (FAO/WHO, GEMS/food regional diets) basado en un noael de 0.33 mg/kg/día por toxicidad renal y hepática en ratas expuestas por 12 semanas a un factor de 100.²⁶ En la última reunión la FAO en residuos de plaguicidas en alimentos se disminuyo a un ADI de 0.005mg/kg/día en base a un NOAEL de 10ppm equivalente a 0.47 mg/kg de peso/día, en base a toxicidad a largo plazo en ratas, que presentaron elevada incidencia de hipertrofia periacinar hepatocelular y Muerte.²⁶ No se ha establecido evidencia de carcinogenicidad en humanos, sin embargo aumenta la incidencia de adenomas y carcinomas en el hígado de ratones agouti y pseudoagouti a dosis de 23 mg/kg.**** En un estudio en Dinamarca, no se encontró relación fuerte entre niveles altos de organoclorados en sangre en mujeres posmenopáusicas, con cáncer de mama.²⁸, en el caso de carcinoma mamario se encontró influencia de los organoclorados en el micro ambiente del tumor afectando su comportamiento biológico, a los que sugieren que podrían tener efectos terapéuticos.²⁹ No se le ha reportado ser fototóxico; en estudios en bacterias *Salmonella typhimurium* y *Escherichia coli*, no ha demostrado evidencia de mutagenicidad.³⁰ Dentro de los estudios de toxicidad crónica,

**** (http://www.inchem.org/documents/pds/pds/pest12_e.htm)

varios estudios reportados indican una relación entre exposición al lindano y la ocurrencia de anemia aplásica. Existe cierta polémica sobre el potencial de carcinogenicidad humana del lindano. En 1987, la agencia internacional para la investigación del cáncer calificó al lindano como posible carcinógeno humano. La EPA de Estados Unidos también clasificó al lindano dentro de la clase 2B, como posible carcinógeno humano, sin embargo, como resultado de una revisión de todos los estudios de cáncer, la agencia clasifica al lindano en la categoría "Evidencia sugestiva de carcinogenicidad pero no suficiente para evaluar el potencial carcinógeno humano."³¹ Se ha observado que el lindano es dosis dependiente en su capacidad citotóxica, sugiriendo que puede actuar como promotor de carcinogénesis.³²

En zonas tropicales se utiliza principalmente para el tratamiento de garrapatas. Al ser un producto liposoluble persiste en el medio así como en productos agrícolas y se le encuentra como residuos en la leche, queso, crema, carne, huevo, peces, y otros productos de consumo humano, incluso encontrándolo en leche materna humana.¹⁹ El lindano y otros isómeros de HCH se han detectado en el aire, en las aguas superficiales y profundas, en sedimento, suelo, peces y otros organismos acuáticos, animales, comida y humanos. (Agency for Toxic Substances and Disease Registry) (Agencia para registro de enfermedades y sustancias tóxicas).³³ Su ingreso es a través del agua y comida contaminadas, afectando a animales y humano^{34, 19, 35, 36, 37,38} Se han reportado casos de residuos de lindano por encima de los límites aceptados en leche de bovinos en el Reino Unido llegando a la conclusión que la fuente de lindano para estos animales pudo ser la contaminación.³⁹

Planteamiento del problema

La leche es uno de los principales componentes de la dieta humana desde la infancia. Derivado de su contaminación por los plaguicidas organoclorados y al incluirse en la cadena alimenticia⁴⁰ la hace tóxica y riesgosa. EL riesgo de exposición por el consumo diario es mucho mayor que en otros tipos de alimentos. El momento en que se consumen productos de individuos cuyo posición en la cadena trófica es muy alta la exposición será más alta.⁴³ Existen evidencias de que el lindano se llega a eliminar por la leche encontrándola en leche de humanos,^{19, 41} de bovinos,⁴² y de caprinos.⁺

El lindano se utiliza aún en muchas partes del mundo, incluyendo en los Estados Unidos de Norteamérica (EUA) donde se le prescribe para su uso en niños y adultos para el tratamiento de sarna y piojos.³¹

También se le usa en veterinaria en animales de compañía y de producción. Tiene un uso reconocido en la agricultura (maíz, trigo, cebada, centeno, sorgo, algodón, tabaco, algunas frutas y vegetales, árboles) y como preservador de la madera. Se calcula que se prescribe más de un millón de recetas por año para tratamiento de escabiosis y pediculosis humano en EUA.^{43, 44, 45} No obstante el lindano puede causar una importante variedad de efectos colaterales cuando se le usa directamente y sin las indicaciones pertinentes, se le ha implicado en efectos a mediano y largo plazo cuando ingresa a los consumidores a través de la piel, el aire, agua y/ o alimento. Actualmente se mantiene el registro de lindano para el uso para tratamiento de semillas, 6 cultivos, maíz, cebada, avena, sorgo centeno y trigo en Estados Unidos, en México en el tratamiento de plantas ornamentales, tratamiento de semilla, sorgo, trigo, cebada, maíz, avena, en campañas de salud pública, esta registrado su uso para control de pediculosis y escabiosis. Los medicamentos con lindano están considerados en el cuadro básico de medicamentos de la Secretaria de Salud, dado que la escabiosis se encuentra entre las 10 primeras causas de morbilidad en México⁸, en el control de ácaros y piojos en bovinos, ovinos, caprinos equinos, control de arañas y alacranes en instalaciones pecuarias, su uso industrial es exclusivo de plantas formuladoras de plaguicidas. Vale la pena señalar que todo el lindano en México es importado.^{47,48} Ha sido difícil obtener las cantidades reales de lindano que han entrado al país en los últimos años, en 2002 se registró la entrada a México de 88,000 kg de lindano al 99% de pureza. Empresas privadas reportaron en suma importar un promedio de 18 toneladas al año. Tan solo las exportaciones de Estados Unidos a México de lindano reportadas por la United States International Trade Comision (USITIC) reportó 750 toneladas del 2000 al 2004.⁸

Es un hecho que aunque el uso de lindano ha sido restringido, se encuentra en el país y es utilizado por lo menos en todos los usos autorizados por a ley y a pesar de los esfuerzos de las instituciones gubernamentales como la SAGARPA, SENASICA, SS, y empresas privadas, los esfuerzos conjuntos no son capaces de verificar que los productos al consumidor final lleguen libres de residuos peligrosos o con estos residuos por debajo de los límites que la ley estipula.

⁺(www.Fao.org/DOCREP/006/Y5221E/y5221eog.htm)

Como bien se ha manejado, es una misión interdisciplinaria, donde todos debemos de participar, una buena forma de hacerlo, es realizando buenas prácticas pecuarias, donde es básico el respetar el tiempo de retiro de todo producto utilizado que sea capaz de llegar al humano.

En estudios comparativos para evaluar los tiempos de retiro de los organoclorados, se demuestra que el lindano se degrada en el ambiente con relativa rapidez, dependiendo de la humedad, características del suelo y condiciones climáticas, posee una vida media en suelo de 3 días a 3 años;⁺⁺ de 121 a 365 días post tratamiento a 15-30 cm. de profundidad, obteniendo aún cosechas con residuos.⁺⁺⁺ Lo que lo convierte en el organoclorado menos persistente en el ambiente, de tal suerte que se ha estimado que el ingreso de lindano al ser humano a partir del ambiente es así:

Del aire = 0.002 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de peso/día

De los nutrimentos = 0.07 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de peso/día

La ingesta diaria admisible se ha calculado según la FAO/WHO en 12.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (ppb) de peso corporal /día,¹ lo que arroja un importante margen de seguridad, sobretodo si se considera que, en modelos experimentales se ha demostrado que los mamíferos poseen una capacidad de degradación constante de lindano, de tal manera que se ha visto en ratas que posterior a una administración constante el lindano acumulado en grasa a razón de 150 ppm decae en 1–2 semanas a cero.²⁶

No obstante, otras evidencias indican la posibilidad de un efecto acumulativo generado de varias fuentes en el entorno (agua, aire, alimento) y una lenta eliminación del lindano en animales domésticos que puede dar lugar a acumulación tanto en ellos como en el humano.

Con base en lo anterior, se consideró necesario realizar un estudio sobre el índice de eliminación del lindano aplicado en un amplio rango de dosis al bovino productor de leche, desde el nivel terapéutico para efectos plaguicidas y en sobredosis.

Con base en lo anterior el propósito de este trabajo es el de establecer la cinética de eliminación del lindano en leche y establecer su tiempo de retiro para evitar residuos por arriba de los límites máximos permitidos por la World Health Organization, (WHO/Food and Agricultural Organization, FAO) que es de 0.01mg/kg en la leche entera o 0.12 mg/kg base grasa en vacas en producción.

⁺⁺WWW.inchem.org/documents/jmpr/jmpmono/v078pr19.htm

⁺⁺⁺ (www.fao.org/DOCREP/006/y5221E/y5221eog.htm).

Hipótesis

El uso de lindano a concentraciones mayores a las recomendadas por el proveedor (10ml al 15% en 10 litros) y sin respetar el tiempo de retiro, causa eliminación del producto en la grasa de leche en cantidades por arriba de las permitidas por la WHO/FAO, y por la norma NOM-004-ZOO-1994. (0.01 mg/kg en leche entera, 0.12 mg/kg (en base grasa) lo cual representa un riesgo de salud pública.

Objetivos Generales

- Validación del método por cromatografía de gases para la determinación de lindano en grasa de leche de vaca, a diferentes dosis vía aspersión; para demostrar estadísticamente la linealidad, rango de trabajo, precisión, límites de detección y cuantificación.
- Definir la cinética de eliminación de lindano en grasa de leche,

Objetivos Específicos

- Implementar los parámetros fisicoquímicos del método por cromatografía de gases para la cuantificación de lindano
- Definir las variables cinéticas: vida media de eliminación, tiempo de retiro. cantidad mínima detectable y cantidad mínima cuantificable, índice de correlación del método, punto de intersección y pendiente.

Material y Métodos

Animales

Se eligieron 16 animales en forma completamente aleatoria, de un solo establo para este estudio, a fin de evitar la interferencia derivada por otros factores externos, así como de otros animales. En todos los casos, se tomaron muestras de leche anterior al desafío con lindano, para evaluar la cantidad que existe de este plaguicida. Como valores basales, sólo se incluyeron en este ensayo animales que no presentaron eliminación de lindano en la leche o cuya eliminación no fue superior a lo considerado como nivel máximo de residuos por el *Codex Alimentarius*. Se integraron dos grupos de 8 animales²⁷ de la siguiente manera:

Grupo A: 8 vacas en producción a las que se les aplicó tópicamente por aspersión 250 ml (75µg/Kg.) por vaca de 450-500 kg. de peso, representativo de una dosis terapéutica del ectoparasitocida (1 l/1000 l de agua).

Grupo B: 8 vacas en producción a las que se les aplicó lindano tópicamente por aspersión 300 µg/Kg de peso, 1 l (300 µg/kg), por vaca de 450- 500 kg de peso, representativo de una dosis del ectoparasitocida (10 l/1000 l de agua).

Posterior a la aplicación del lindano se ordeñaron los animales por 14 días, eliminando el despunte y recuperando 75 ml de cada cuarto en frascos estériles de vidrio. El lindano es muy estable al aire, luz, calor, dióxido de carbón, ácidos fuertes, en presencia de álcali con calor prolongado se dechloriniza formando triclorobenceno y ácido clorhídrico.

Se eliminaron las muestras de leche de los primeros 5 días guardando la leche a partir de este día (6^{to} día, obteniendo 9 muestras en total por vaca). Las muestras de 250 ml obtenidas de los cuatro cuartos, se mantuvieron en congelación (-20 °C) hasta su análisis.

Ensayos para la implementación del método analítico para lindano.

Se implementó y validó el método analítico por cromatografía de gases descrito por Armendáriz *et al*, 2004. cuyos límites de detección son 0.001 a 0.005 µg/L es un método de tres pasos, el primero consiste de centrifugación, seguido de purificación, y por último identificación por cromatografía de gases.

El Lugar de muestreo fue el Centro de Enseñanza, Práctica e Investigación en Producción y Salud Animal "CEPIPSA" que se encuentra en la Avenida Cruz Blanca No. 486, en San Miguel Topilejo, Delegación Tlalpan, C.P. 14500 México, D.F.

Las muestras se procesaron en el laboratorio de toxicología de la FMVZ, UNAM.

Materiales

Estándares y reactivos.

Lindano técnico al 99%, Laboratorios Agromundo.

Acido sulfúrico 96% puro (Sigma).

Sulfato anhídrido de sodio (sulfato anhidro de sodio) (Sigma)

Hexano (para análisis de residuos) (Sigma)

Antes del uso de los materiales se sometieron a lavado con agua caliente y se enjuagaron con agua bidestilada y secaron a 100°C en estufa, posteriormente se enjuagan con hexano (para análisis de residuos y vuelto a secar en estufa).

Aparatos.

Centrífuga: (international centrifuge size 2 model K# 31993Pvolts 115 cyc.60 amps 7. $\frac{3}{4}$ HP. Internacional Equip.Co. Needham Hts. Mass. Cromatógrafo de gases Perkin Elmer autosistem XL con inyector manual y detector de captura de electrones y columnas de cromatografía de gases. Col- elite – 5 – 30M-.50UM-.53MM Perkin Elmer

Secadora o estufa turbo dryer vap II Zymark model ZW 8006 A Varian 3400.

Cromatógrafo de gases Perkin Elmer autosistem xl con inyector manual y detector de captura de electrones, Perkin Elmer.

Para determinar la cinética de eliminación del lindano se utilizó el método sugerido por Armendáriz que consiste en tres etapas. Extracción de grasa, centrifugar 10 ml. de leche a 3000 rpm por una hora para separar la grasa de los demás componentes del a leche, congelando a -20° C por 24 hrs. Para facilitar la separación de la grasa se mezcla con 30g de anhídrido Na_2SO_4 en un mezclador de vidrio.

Procesamiento de las muestras.

Extracción de grasa: centrifugar 10 ml de leche a 3000rpm 1 hr. Congelar a -20 C 24 hrs. separar y mezclar con 30 g de Na_2SO_4 en matraz de vidrio.

Purificación del extracto de grasa:

El polvo obtenido se transfiere a una columna de vidrio y eluir en 50ml de hexano 2 veces, concentrar a 1ml evaporando a una temperatura de 50°C. Restituir volumen a 10ml con los líquidos de los lavados y alícuotas de hexano, y agitar a homogenizar restituyendo a 10 ml.

Tomar 2ml para determinación de porcentaje de grasa.

Purificación de extracto:

A 8ml de extracto agregar 3ml ácido sulfúrico concentrado, agitar severamente por 1 minuto, dejar en reposo 24 hrs para permitir la separación de las capas orgánica y acuosa.

A 5ml de la capa orgánica se le transfieren a un matraz con 1g de cama Na_2SO_4 . Después de lavar el residuo con dos alícuotas de 5ml de hexano, dejar evaporar $\leq 50^\circ$ enseguida coleccionar el residuo con 1 ml de hexano e inyectar al cromatógrafo de gases.

Condiciones del cromatógrafo de gases con detector de captura de electrones para la identificación de lindano.

Temperatura del Inyector 280°C , volumen de la muestra $1\ \mu\text{l}$, gas acarreador nitrógeno 20 psi rango de flujo 1 ml por minuto, temperatura del horno inicial $50\ ^\circ\text{C}$ por tres minutos, gradiente de $30\ ^\circ\text{C}$ por minuto hasta los $180\ ^\circ\text{C}$ y estabilizar por 1 min, aumentar $6\ ^\circ\text{C}$ por minuto hasta los $220\ ^\circ\text{C}$ 11 minutos continuar $5\ ^\circ\text{C}$ por minuto hasta los $250\ ^\circ\text{C}$ 10 minutos, temperatura del detector captura de electrones a $300\ ^\circ\text{C}$.⁴⁹

Los valores obtenidos se analizaron por medio del modelo estadístico análisis de medidas repetidas por MANOVA.

Linealidad y rango de trabajo

Se determino con base a los resultados obtenidos en muestras adicionadas de lindano, preparadas como se indica a continuación:

Fortificar cinco muestras a 5, 10, 20, 40, 80, 160 320, 640 y 1280 ppb a partir de la solución stock, realizar el análisis como se indica en el método.

Criterios aplicables

La curva de calibración se implementó al aplicar 9 concentraciones que fueron de 5 a 1280 ppb en progresión geométrica. Una vez obtenidos el tamaño de la señal de cada concentración se identifico el coeficiente de regresión $r^2 = 0.999$; el punto de intersección $a = -20.4762$ y la pendiente $b = 0.02023$.

La concentración de lindano en cada una de las muestras se estimo al sumar el valor del punto de intersección más la pendiente y multiplicarlos por el área de respuesta obtenida en el cromatograma, por supuesto con un tiempo de retención idéntico al del estándar de lindano.

Criterios de aceptación

- El coeficiente de correlación de cada curva fue mayor al 0.999.
- El coeficiente de variación fue menor al 20%

LIMITE DE DETECCION Y DE CUANTIFICACIÓN

Limite de detección y cuantificación.

El límite de detección se identificó al conocer la superficie de la señal, o la altura de la señal de la cantidad mínima de lindano que duplique las señales de ruido en este caso fue de (0.001) ppb.

El limite de cuantificación se identifico al referir el tamaño de la muestra, el volumen de aforo (2ml), el volumen de inyección referido (1µl), y la cantidad mínima detectable (0.001 ppb), en este caso fue 0.008 ng /microg (8 ppb) o también 8ng/ug, que equivale a 8 picogramos de lindano por microgramo de muestra.

Resultados

Método analítico.

El método analítico utilizado es el propuesto por Armendáriz *et al.* 2004.

Para validar el método descrito, se utilizaron muestras de leche con cantidades conocidas de lindano las que se procesaron siguiendo el mismo protocolo. Los porcentajes de recuperación fueron de 89.6 a 101.27 con un promedio de 99.37 ± 8.52 .

Cuadro 2.

En la figura 2 se muestra el cromatograma del lindano estándar por medio de cromatógrafo de gases con detector de captura de electrones.

En la figura 3 se muestra el cromatograma en el que se identifica el lindano.

En el cuadro 1. Se muestra el tamaño de respuesta de la señal en el cromatograma de las cinco muestras adicionadas (con lindano) en progresión geométrica desde 5 hasta 1280 nanogramos/ml. En la penúltima columna se anota el promedio de la señal obtenido de las 5 repeticiones de cada una de las concentraciones. Y en la última columna se observa la desviación estándar del tamaño de la señal de estas mismas. El valor de las desviaciones estándar en todos los casos es inferior en 20 % así como en las primeras concentraciones. Pero el valor de la desviación estándar es inferior al 10% desde 80 ng/ml en adelante. Lo que nos indica que cuando menor sea la concentración que se inyecta mayor será la posibilidad de error, sin embargo con concentraciones mayores a 80 ng/ml la posibilidad de error es menor.

Se obtuvieron en las curvas de calibración del método coeficientes de correlación (r) de ≥ 0.999 Figura 4.

Se demostró la presencia del plaguicida organoclorado lindano, por medio de cromatografía de gases y detector de captura de electrones en las muestras obtenidas de vacas en producción que recibieron un solo tratamiento con dicho plaguicida.

Al tomar en cuenta que el lindano se comporta como fármaco (tóxico) de cinética de primer orden, una fracción continua del tóxico presente se elimina por unidad de tiempo. Esto quiere decir que cuando la dosis de tóxico es alta (exposición aguda) inicialmente se elimina una gran cantidad por unidad de tiempo, conforme la concentración baja se elimina una cantidad menor por unidad de tiempo. Para evaluar lo anterior se utilizó la fórmula:⁵⁰

$$Cr=Cie^{-kt} \quad *37$$

*Esta fórmula tiene como base el uso de logaritmo neperiano para quitar la fracción exponencial se convierte el logaritmo neperiano a logaritmo natural 10

Donde Cr = concentración residual.

Ci = Concentración inicial.

e = base de logaritmo natural.*

k = es una constante para un particular toxico, tejido y especie.

t= tiempo en horas o días.

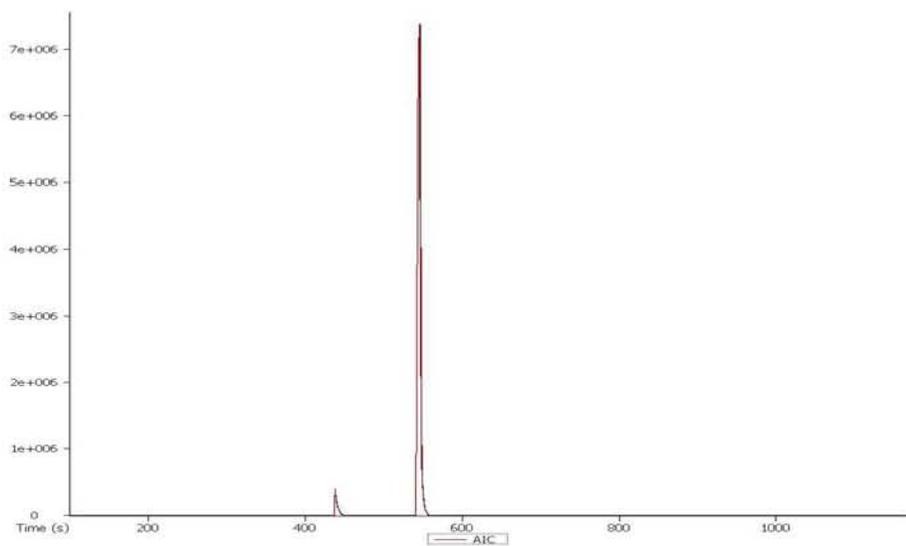
Se obtuvieron los siguientes datos:

Para el grupo "A" se obtuvo una tasa de eliminación entre el día 6 y 7 de 0.06183 con una vida media de eliminación de 11.22 días, y para los días 10 y 11 un coeficiente de eliminación 0.7037, vida media de 1.39 días. Una constante de eliminación $k= 0.3825$ entre el día 6 y el 10 post tratamiento, vida media de $t= 1.81$ días. Para obtener el día 6 post tratamiento, residuos por debajo de los límites máximos (MRL) señalados por la FAO/WHO de 0.01 mg/kg, en leche entera 0.12mg/kg o 120ng/g base grasa. Figura 5. Esto significa que este compuesto es seguro en cuanto a la relación dosis terapéutica y residuos de eliminación por debajo de los señalados por las autoridades sanitarias.

El grupo "B" se obtuvo una tasa de eliminación entre el día 6 y 7 de 0.18065 con una vida media de eliminación de 3.83 días, y entre el día 10 y 11 un coeficiente de eliminación de 0.2885 con una vida media de 2.40 días. Obteniendo valores por debajo del MRL (0.01 mg/kg, 0.12mg/kg o 120ng/g base grasa), a los 0.84 días (día 8). Detectando la presencia del plaguicida hasta el día 8 post tratamiento con niveles de $116.77 \text{ ng/g} \pm \text{DE } 5.31$. Figura 4 Y una constante de eliminación entre el día 6 y el 10 de $k= 0.24369$, vida media = 2.84 días, días de cuarentena para llegar al MRL $0.1\text{mg}7\text{kg} = 28.9$ días.

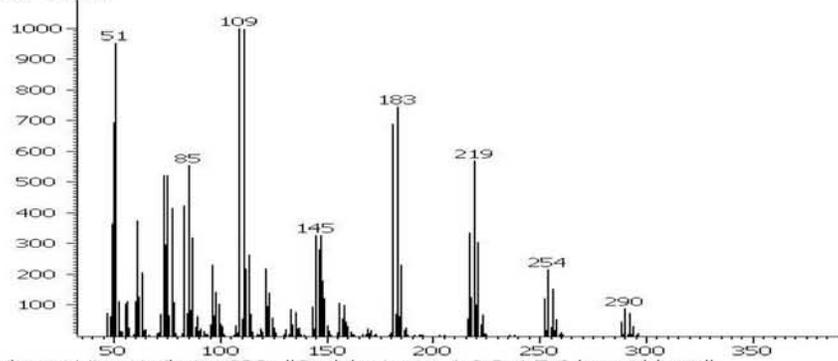
Estas variaciones en la linealidad del coeficiente de eliminación y de la vida confirma la cinética de un compuesto que modifica el metabolismo de los órganos a diferencia de un fármaco que el efecto es nulo.

Figura 2. Cromatogramas de lindano (γ HCH)

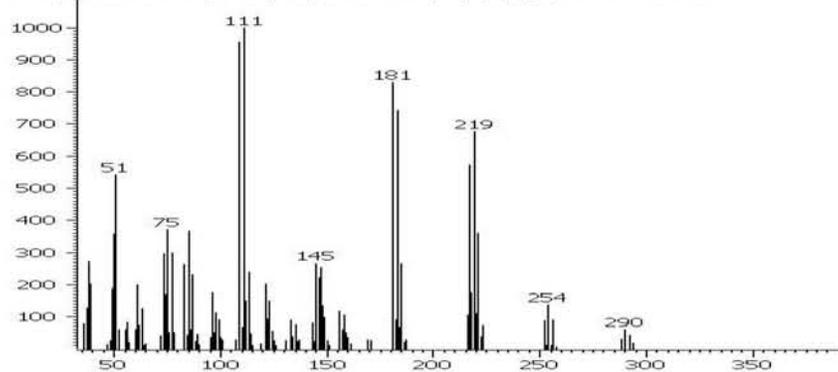


**Figura 3.
Identificación de lindano por cromatografía de gases**

Peak True - sample "OT492_LINDANO-STANDAR:1", peak 2, at 546.041 s (Spec # 4459)



Library Hit - similarity 932, "Cyclohexane, 1,2,3,4,5,6-hexachloro-"



Cuadro 1.
Tamaño de respuesta de las repeticiones de lindano (lind) en
cromatografía de gases y detector de captura de electrones.

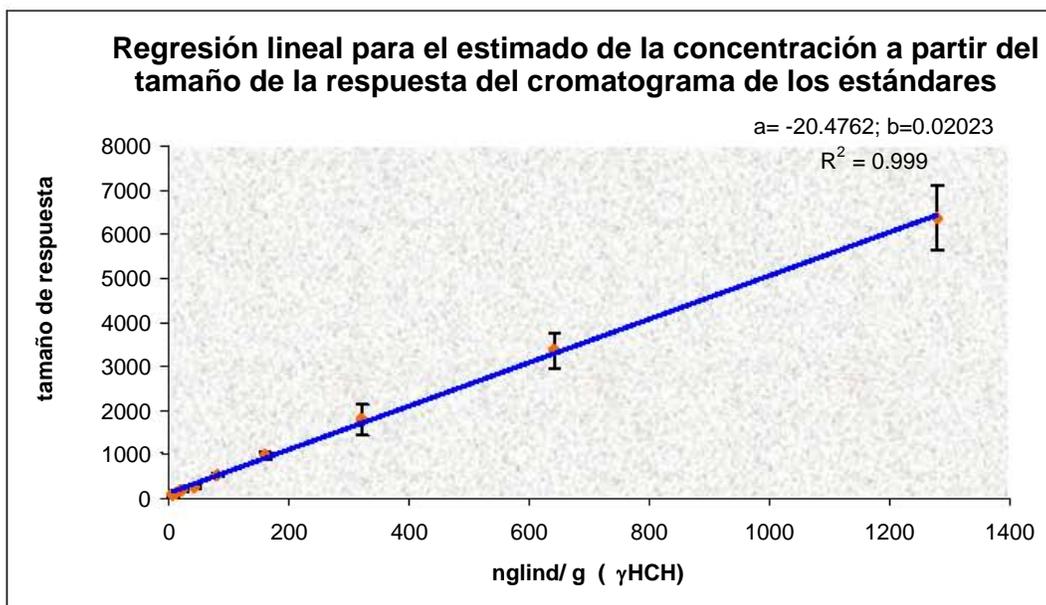
| Ng lind/ml | Repeticiones TAMAÑO DE LA SEÑAL | | | | | Promedio | ± DE |
|---------------|---------------------------------|---------|---------|---------|---------|----------|--------|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | | |
| 5 | 69.40 | 50.30 | 72.40 | 81.00 | 49.30 | 64.48 | 14.07 |
| 10 | 115.40 | 80.00 | 102.60 | 80.10 | 118.30 | 99.28 | 18.52 |
| 20 | 183.20 | 137.20 | 204.00 | 155.20 | 181.20 | 172.16 | 26.11 |
| 40 | 209.50 | 288.40 | 207.50 | 280.10 | 250.50 | 247.20 | 38.04 |
| 80 | 581.10 | 453.30 | 545.30 | 503.30 | 535.20 | 523.64 | 48.13 |
| 160 | 1055.20 | 845.90 | 1002.40 | 942.20 | 970.10 | 963.16 | 77.86 |
| 320 | 2315.30 | 1354.20 | 1754.20 | 1624.30 | 1845.30 | 1778.66 | 352.50 |
| 640 | 3767.50 | 3019.50 | 3799.10 | 2998.30 | 3100.50 | 3336.98 | 409.37 |
| 1280 | 7085.20 | 5569.90 | 7084.60 | 5714.60 | 6319.40 | 6354.74 | 723.41 |

Cuadro 2.
Promedios para obtener la regresión adicionando con lindano muestras
de leche y sus porcentajes de recuperación.

| Concentración añadida ng de lind/ml | X de la señal | ± DE | Promedio de la concentración obtenida calculada en ng/g | % de recuperación * |
|---|---------------|--------|--|---------------------------|
| 5 | 64.48 | 14.07 | 4.48 | 89.6 |
| 10 | 99.28 | 18.52 | 9.62 | 96.2 |
| 20 | 172.16 | 26.11 | 22.54 | 112.7 |
| 40 | 247.20 | 38.04 | 45.36 | 113.4 |
| 80 | 523.64 | 48.13 | 73.56 | 91.95 |
| 160 | 963.16 | 77.86 | 152.36 | 95.225 |
| 320 | 1778.66 | 352.50 | 331.54 | 103.60625 |
| 640 | 3336.98 | 409.37 | 578.36 | 90.36875 |
| 1280 | 6354.74 | 723.41 | 1296.3 | 101.27344 |

* Promedio de recuperación 99.37 ± 8.52

Figura 4. Regresión lineal de lindano para las muestras de leche adicionadas.



Cuadro 3.

Estimado de la concentración con el uso de la regresión lineal a partir de intersección, pendiente y tamaño de la señal (ts).

$$Y = A + B * X$$

a= intersección; b= pendiente; x= ts.

Y= estimado de la concentración

R^2 = coeficiente de regresión

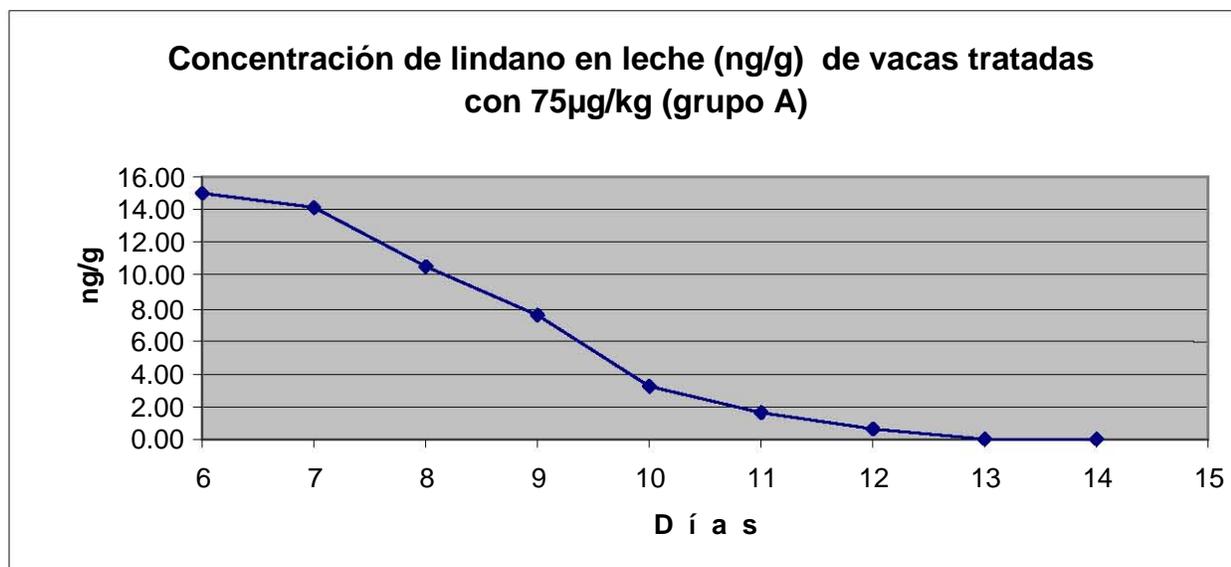
$R^2 = 0.999$

P= <0.0001

Cuadro 4.
Concentración de lindano ng/ml, en grasa de leche de vacas tratadas con 75 µg/kg. (Grupo A)

| Vaca no. día | 1 con | 2 cen | 3 tra | 4 cion | 5 | 6 ng/g | 7 | 8 | Promedio | DE |
|--------------|-------|-------|-------|--------|------|--------|------|-------|----------|-------|
| 6 | 17.34 | 21.98 | 18.30 | 12.99 | 12.7 | 10.90 | 8.23 | 17.65 | 15.011 | 4.537 |
| 7 | 15.12 | 19.80 | 18.90 | 11.02 | 12.0 | 10.30 | 8.01 | 17.80 | 14.119 | 4.403 |
| 8 | 12.01 | 14.67 | 14.43 | 8.24 | 8.34 | 6.72 | 5.99 | 13.90 | 10.538 | 3.607 |
| 9 | 8.64 | 12.76 | 10.43 | 5.80 | 5.10 | 4.98 | 5.12 | 7.28 | 7.514 | 2.885 |
| 10 | 3.99 | 5.01 | 4.23 | 2.91 | 2.01 | 1.99 | 2.11 | 3.65 | 3.237 | 1.153 |
| 11 | 2.30 | 2.10 | 1.90 | 1.70 | 1.23 | 0.67 | 0.98 | 1.90 | 1.598 | 0.575 |
| 12 | 1.02 | 0.98 | 0.76 | 0.90 | 0.30 | 0 | 0.56 | 0.50 | 0.628 | 0.357 |
| 13 | 0.10 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.01 | 0.035 |
| 14 | 0.02 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.02 | 0.007 |

Figura 5.
Cinética de eliminación de lindano en grasa leche, 75µg/kg (Grupo A)



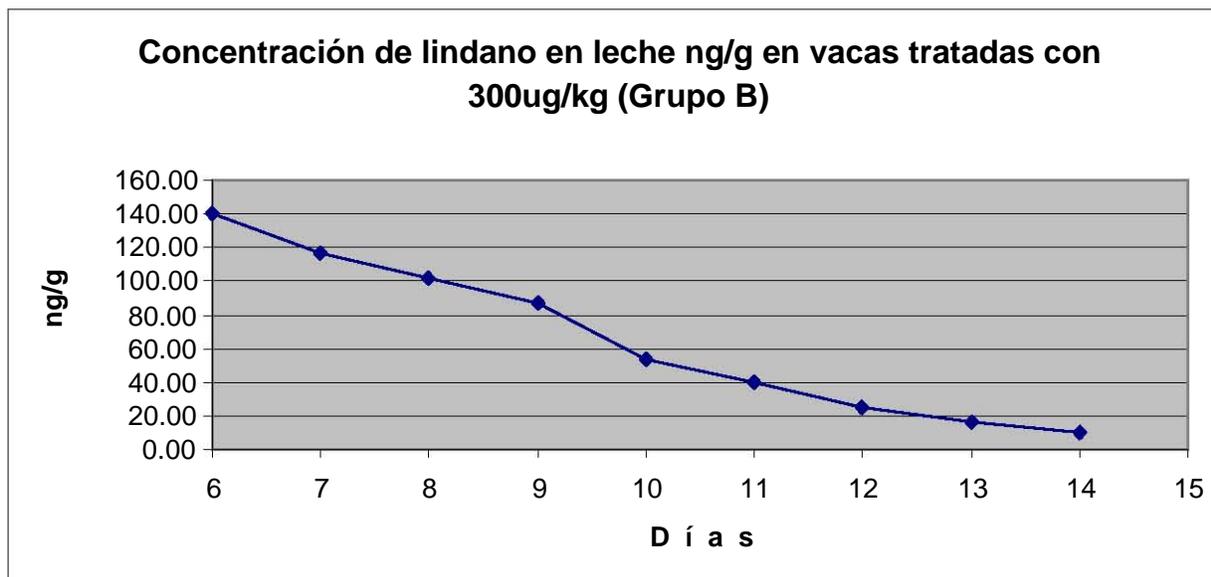
Los valores de la cinética de eliminación de lindano en el grupo A se observa en el cuadro 4. Aquí se identificó un promedio de concentración en el día 6, de 15ng/g con una cantidad mínima detectable hasta 0.02 en un solo animal, el promedio real donde se encontró la cantidad mínima detectable en este grupo fue de 0.62 ng/g en el día 12.

En la figura 5 se describe los valores de los índices de la cinética de primer orden obtenidos por la fórmula $C_r = C_i e^{-kt}$. Los valores obtenidos para la vida media fueron de 1.81 días, con un coeficiente eliminación de 0.3825 y el tiempo requerido para llegar a la cantidad de residuos inferiores a los máximos permitidos (MRL) por la WHO/FAO de 0.01mg/l, 0.12mg/g se cumplieron desde el primer día de muestreo (día 6).

Cuadro 5.
Tamaño de la señal cromatográfica de lindano en grasa de leche de vacas
300 µg/kg (grupo B)

| Vaca No. | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | | |
|-----------|------------|------------|------------|-----------|-----------|-------------|--------|--------|----------|--------|
| Días | con | cen | tra | ci | on | ng/g | | | promedio | ±DE |
| 6 | 114.2 | 141.9 | 139.76 | 166.72 | 123.99 | 159.3 | 132.87 | 126,91 | 139.82 | 52.329 |
| 7 | 88.81 | 121.9 | 89.65 | 145.01 | 113.75 | 134.9 | 112.54 | 127.6 | 116.77 | 20.050 |
| 8 | 64.23 | 102.07 | 87.9 | 120.13 | 103.1 | 120.03 | 110.32 | 101.56 | 101.17 | 18.300 |
| 9 | 59.8 | 89.79 | 71 | 102.23 | 98.23 | 101.3 | 97.89 | 70.01 | 86.28 | 16.773 |
| 10 | 43.12 | 53.21 | 49.21 | 53.79 | 58.21 | 57.78 | 58.48 | 48.23 | 52.75 | 5.541 |
| 11 | 39.87 | 42.23 | 27.45 | 47.23 | 41.27 | 41.32 | 38.89 | 38 | 39.53 | 5.627 |
| 12 | 26.32 | 31.67 | 17.34 | 31.21 | 29.87 | 23.15 | 19.3 | 18.23 | 24.64 | 5.951 |
| 13 | 18.23 | 22.2 | 10.2 | 23.1 | 20.01 | 15.2 | 11.23 | 11.2 | 16.42 | 5.190 |
| 14 | 10.99 | 13.21 | 5.95 | 15.23 | 12.34 | 7.89 | 9.89 | 8.62 | 10.52 | 3.042 |

Figura 6.
Cinética de eliminación de lindano en grasa leche, 300µg/kg (Grupo B)



Los valores de la cinética de eliminación de lindano en el grupo B se observa en el cuadro 5. Aquí se identificó un promedio de concentración en el día 6, de 139.82 ng/g con una cantidad mínima detectable promedio de 10.52 ng/g, para el día 14. Los valores obtenidos son inferiores de los máximos residuales permitidos, para en el día 9 posterior al tratamiento.

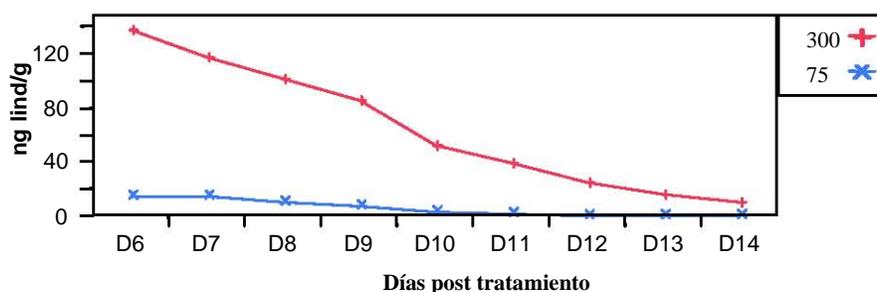
En la figura 6 se describen los valores de los índices de la cinética de primer orden obtenidos por la fórmula $C_r = C_{ie}^{-kt}$. Los valores obtenidos para la vida media fueron de 2.84 días, con un coeficiente de eliminación de 0.24369 y el tiempo requerido para llegar a la cantidad de residuos inferiores a los máximos permitidos (MRL) por la Who/Fao de 0.01mg/kg, 0.12mg/kg de grasa fueron de 9 días.

Modelo Estadístico

Los valores obtenidos se analizaron por medio del modelo estadístico de análisis de medidas repetidas por MANOVA. (Programa estadístico JMP versión 5.1)

Figura 7.

Cinética de eliminación de lindano en grasa de leche de ambos grupos.



Con lo que obtuvo en el análisis global:

1.- $F_{1, 14} = 343.67$; $P = < 0.0001$. Esto nos indica que existe diferencia en la concentración de lindano en manera significativa en algún día en algún tratamiento.

Para los tratamientos:

2.- $F_{1, 14} = 343.67$; $P = < 0.0001$. Existe diferencia entre los promedios generales de los tratamientos.

Se realizó la prueba de esfericidad por medio de la prueba de Mauchly ya que tenemos un modelo de medidas repetidas. Obteniendo una $P > \alpha$ por lo que se rechaza la homogeneidad de covarianzas. Y se recomienda aplicar la prueba de G-G (Geiser- Greenhouse) ajustada por χ^2 con grados de libertad corregidos por Σ .

Mauchly = $P < 0.0001$

$\chi^2_{35} = 212, 64$

G-G = $F = 2.0959, 29.343 = 134.37$; $P < 0.0001$.

Interacción tratamiento día.

$F_{1, 14} = 343.67$; $P = < 0.0001$. Existe diferencia entre la interacción tratamiento día.

Cuadro 6.
Estadística descriptiva de las concentraciones de lindano en leche de vacas tratadas vía dérmica.

| µg lind/kg | estimador | Día | | | | | | | | | Promedio General |
|------------|-----------|--------|--------|--------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|------------------|
| | | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | |
| 75 | N | 8 | 8 | 8 | 8 | 8 | 8 | 8 | 8 | 8 | 8 |
| | promedio | 15.011 | 14.119 | 10.538 | 7.514 | 3.237 | 1.598 | 0.628 | 0.013 | 0.003 | 5.851 |
| | de | 4.537 | 4.403 | 3.607 | 2.885 | 1.153 | 0.575 | 0.357 | 0.035 | 0.007 | 34.09 |
| 300 | N | 8 | 8 | 8 | 8 | 8 | 8 | 8 | 8 | 8 | 8 |
| | promedio | 139.82 | 116.77 | 101.17 | 86.28 | 52.75 | 39.53 | 24.64 | 16.42 | 10.52 | 65.32 |
| | de | 52.33 | 20.05 | 18.30 | 16.77 | 5.54 | 5.63 | 5.95 | 5.19 | 3.04 | 6.30 |

N= número de observaciones, de= desviación estándar.

Análisis de modelo de medidas repetidas de las concentraciones de lindano en leche de vacas tratadas vía dérmica.

| Día | F _{1,14} | P |
|-----|-------------------|------------|
| 6 | 71,391 | P < 0.0001 |
| 7 | 49,556 | |
| 8 | 38,637 | |
| 9 | 291,84 | |
| 10 | 115,33 | |
| 11 | 67,69 | |
| 12 | 27,11 | |
| 13 | 12,66 | |
| 14 | 5,20 | |

F_{1,14}= F de Fisher. P= Probabilidad.

| Tratamiento | F _{8,126} | P |
|-------------|--------------------|------------|
| 75 | 3,50 | P=0.001 |
| 300 | 206,46 | P < 0.0001 |

Discusión

La metodología utilizada brindó tasas de recuperación en promedio superiores al 99%, con una desviación estándar de 4 para el grupo A y de 8 para el grupo B, con una significancia de 0.001. De acuerdo con los valores obtenidos de las muestras fortificadas utilizadas como estándares internos, se calculó un error intra-ensayo del 5%. Como la metodología lo indica, la mayor parte del lindano se presenta en la grasa de la leche.

En el grupo tratado con 75 µg/kg, a los 13 días ya no se encontraron residuos. Sin embargo en el estudio de Ely y Moore, 1952 se menciona que cada periodo de 10 días post retiro de lindano se encontró un 50% de la dosis administrada en la leche. El estudio que ellos realizaron fue administrando el lindano vía oral a dosis desde 0.07 mg/kg a 6.22 mg/kg por día de 70 a 110 días. Por lo que la dosis administrada y el tiempo de administración fue mucho más largo, tomando en cuenta que el lindano se comporta como un fármaco de cinética de primer orden, al aumentar las cantidades y frecuencia de aplicación, se aumentan las concentraciones séricas, por lo tanto en leche.

En el grupo B tratado con 300 µg/kg, al día 8 aún se encontraron residuos por encima de los niveles máximos admisibles por la WHO/FAO llegando a niveles por debajo de los máximos permisibles en base grasa el día 9 post aspersion.

Así mismo Bluetghen A *et al.*, 1977 utilizaron lindano en polvo, a dosis de 40 a 50 mg por vaca, vía oral, arrojando resultados de lindano en leche por arriba del MRL, en aquel año (0.2 ppm) por varias semanas, e isómeros α y β HCH por mucho más tiempo que el de lindano. Las dosis utilizadas por estos autores fueron mayores a los del grupo A, por lo que los días de detección en leche por arriba del MRL actual serian por poco más de 2 semanas, y en el caso del grupo B fueron de casi tres semanas por lo que coinciden en los tiempos de eliminación por varias semanas, sin embargo aquí no se determino la presencia de isómeros α y β HCH.

En este caso si la leche de vacas tratadas se llegara a consumir por el humano se convertirá en una fuente de contaminación por lindano, por lo que respetar el tiempo de eliminación del producto aquí establecida se podría evitar el contacto y la bioacumulación del producto por ingreso de leche de vaca y o alimentos al humano.

De acuerdo con los resultados obtenidos en este trabajo y si no existe ningún otro ingreso al animal o animales de lindano a través de productos agrícolas o de otra índole, en 10 días post tratamiento los residuos de lindano en grasa de leche son inferiores a los MRL señalados por la FAO/WHO para el grupo B.

Los residuos máximos permitidos para lindano por la WHO/FAO, son de 0.01mg/kg de leche entera 0.12 mg/kg en base grasa. Considerando que en promedio se presenta un 3% de grasa en la leche, se tendrá un equivalente a 30µg/L de leche entera como residuo máximo permitido para lindano. Se considera que la FAO/WHO especifica una ingesta diaria admisible (ADI) total para lindano de 0.005mg/kg de peso por día.

Considerando que en promedio un humano adulto pesa aproximadamente 60 kg el ADI total para ese individuo sería de:

$0.005 \text{ mg/kg} \times 60 \text{ kg de peso} = 0.03 \text{ mg/individuo (ADI total de lindano)}$

$0.12 \text{ mg de lindano / kg de grasa de leche} = 0.12 \text{ } \mu\text{g de lindano/g de grasa de leche}$. $3.6 \text{ } \mu\text{g de lindano/ 30 g de grasa de leche / litro de leche}$. Por lo que el individuo de 60 kg podrá ingerir 8.33 litros de leche con el MRL base grasa de 0.12mg/kg.

Se permiten residuos en la leche de 3.6 μg de lindano/litro de leche. Si se considera que la ingesta diaria de alimento según el *Codex Alimentarius* (WHO/FAO) de una persona es como sigue:

- 1.5 litros de leche
- 100 g de huevos
- 500 g de cárnico

Por lo que los 30 μg /individuo, se dividen en 2.1kg de alimento de origen animal, lo que da por resultado que un individuo pueda tener un ADI en leche entera de 14.28 μg /1.5 litros de leche, o bien 9.52 μg /litro de leche entera, que equivalen a 9.52 ng/ml de leche entera.

Conclusiones

Después de la aplicación dérmica de lindano, fue posible detectarlo en la grasa de leche.

El tiempo y las cantidades encontradas de lindano en la grasa de leche son dependientes de la dosis dérmica aplicada. Esto se confirmó por la identificación de los valores de vida media, coeficiente de eliminación y tiempo de cuarentena. En la validación del método se identificó: linealidad ($r^2 = 0.99978$), especificidad (tiempo de retención idéntico en todas las inyecciones), repetibilidad (misma intensidad de respuesta en concentraciones idénticas), sensibilidad (cantidad mínima detectable 0.001ng/g y cantidad mínima cuantificable 0.008ng/g).

En este estudio el lindano se comportó como un fármaco (tóxico) que sigue una cinética de primer orden, sin embargo se podría aumentar las dosis y valorar si se rompe la barrera de orden cero.

Al comparar los resultados de este estudio con los establecidos en la norma NOM-004-ZOO 1994 se encontró que en el caso del grupo A no se rebasan los niveles establecidos como máximos tolerables o permitidos (MRL). En el caso del grupo B al día 9, aún se encontraron rebasados los niveles de residuos en la grasa de leche, por encima de los MRL establecidos, así como el tiempo necesario a respetar de cuarentena se convierte a casi 10 días.

Bibliografía citada

1. Programa Mexicano de Monitoreo y Control de Residuos Tóxicos y Contaminantes en Alimentos de Origen Animal 2007. y Resultados del 2006. Sagarpa. Marzo 2007. Disponible en línea <http://www.sagarpa.gob.mx>
2. Inocuidad en Alimentos Importados. Disponible en línea <http://www.Fda.org>
3. Nuñez E.: Inocuidad Alimentaria y HACCP, Rev Avicultures y su entorno. 5, 32. 2003,28-35.
4. Prog-Rep2003-2005. Sagarpa2004. Disponible en línea <http://www.sagarpa.gob.mx>
5. Situación actual y perspectiva de la producción de leche de bovino en México 2005. Coordinación General de Ganadería. Sagarpa 2005. Disponible en línea <http://www.sagarpa.gob.mx>
6. Plan de Acción Nacional/lindane. PARAN. Sobre lindano y otros hexaclorociclohexanos. Nov 30, 2006. Comisión para la Cooperación Ambiental. Disponible en línea http://www.cec.org/files/pdf/POLLUTANTS/LindaneNARAP-Nov06_es.pdf
7. Blaquiere C, Demozay D, Marechal G, Lindane, monograph of an insecticide. Verlag K Schillinger.Freiburg Im Breisgau 1972.
8. El Lindano En México. Instituto Nacional de Ecología. INE, 2004. Disponible en línea. http://www.ine.gob.mx/dgicurg/download/Proyectos-2003/EL_LINDANO_EN_MEXICO.pdf
9. Vandana S, Rafat S, Sanvidhan G, Sayed T, Abhijit B, Basu D; Lindane induced immunological alterations in human poisoning cases. Clinical Biochemistry 38 .2005. 678-680.
10. Milhaud G, Bechade A, Pinault L. Relationship between the contamination of milk and animal feed with organochlorine insecticides. Bull Acad. Vet. France. 47 (7): 361-366; 1974.
11. Abou Arab; Effects of processing and storage of dairy products on lindane residues and metabolites. Food Chemistry 64, 1999.467-473.
12. Noakes P, Taylor P, Wilkinson S, Prescott S. The relationship between persistent organic pollutants in maternal and neonatal tissues and immune responses to allergens: A novel exploratory study. Chemosphere May; 63 (8): 1304-11. 2006.
13. Alavanja M. Semanic C. Dpsemeci M. Luvín J. Tarone M. Lynch C. Knott C. Thomas K. Hoppin J. Barker J. Coble J. Sndler D. Blair A. Use of pesticides and prostate cancer risk in the agricultural health study cohort. American Journal of Epidemiology. Vol 157;9, 800-814.2003
14. Comisión for Enviromental Cooperation Montreal, Québec, Canadá, nov, 2005)
15. Silverstroni et al partition of the organochlorine insecticide lindane into the human space surface induces membrane depolarization and Ca²⁺ influx. Biochim J 1997
16. Willet K. Ulrich E. Hites R. Differential Toxicity and Enviromental Fates of Hexachlorocyclohexane isomers. Environ. Sci.Technol. 32(15) 2197-2207. 1998.

17. Matsuura I. Saitoh T. Tani E. Wako Y, Iwata H. Toyota N. Ishizuka Y. Masato N. Hoshino N. Tsuchitani M. Ikeda I. Evaluation of a two generation reproduction toxicity study adding endpoints to detect endocrine disrupting activity using lindane. *The Journal of toxicological sciences*, vol. 30 Special issue, 135-161, 2005.
18. Langer p. Kokan A. Tajtakova M. Petrik J. Chovanova J. Dorvna B. Jursa S. Pavuk M. Trnovec T. Sevökova E. Klimes I. Human thyroid in the population exposed to high environmental pollution by organochlorinated pollutants by several decades. *Endocrine regulations* , Vol. 39, 12-20. 2005
19. Burke e, Holden A, Shaw I. A method to determine residue levels of persistent organochlorine pesticides in human milk from Indonesian women. *Chemosphere* 50(2005) 529-535.
20. International Agency For Research in Cancer. Risks to Humans Volume 5 Some Organochlorine Pesticides Summary of Data Reported and Evaluation Aldrin AramiteR BHC (Technical Grades) and Lindane Chlorobenzilate Dieldrin Endrin Methoxychlor Mirex Quintozene Terpene polychlorinates (Strobaner) Last updated: 17 March 1998 ALDRIN VOL.: 5 (1974) (p. 25 . disponible en linea. <http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol5/volume5.pdf>
21. Centro de Investigaciones Económicas y Políticas de Acción Comunitaria, CIEPAC, 2004
22. Extension Toxicology Network (ETOXNET), 1996, Pesticide information profiles: Accessed January 19, 2000
23. Siddiqui MKJ, Nigam U, Srivastava S, Tejeshvar D, Chandrawati. Association of meternal blood pressure and haemoglobin level with organochlorines in human milk. *Human and experimental toxicology*, 2002, 21.
24. Blake A, The next enertion of POPS: PBDEs and lindane. IPN, April 2005.
25. Fenster L. Ezkenazi B. Anderson m. Bradman A. Harley K. Hernández H. Hubbard A. Barr D. Association of in utero organochloride pesticide exposure and fetal growth and length of gestation in an agricultural population. *Enviromenal Health Perspectives*, vol. 114 n 4, 2006.
26. Mendez E. Pesticides Residue in Food 2002= Joint FAO!WHO Meeting on Pesticide Residues. Lindane. Office Of Pesticide Programs United States Enviromental Protecction Agency Washington Dc USA. Disponible en linea. <http://www.Inchem.org>.
27. Anadon A. Martínez Larrañaga M. Residues of antimicrobial drugs and feed additives in animal products; regulatory aspects. *Livestock production science*. 59.1999.183-196.
28. Raaschou-Nielsen O. Pavuk M. Lefranc A. Dumas P. Philippe- Webber J. Olsen A. Tjonneland A. Overvad K. Olsen J. Adipose organochlorine concentrations an risk of breast cancer among postmenopausal Danish woman. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev* 2005;14(1) January 2005.
29. Muñoz-de-Toro M. Durando M. Beldoménico P. Beldomenico H. Kass M. Garcia S. Luque E. Estrogenic microenviroment generated by organochlorine residues in adiposse mammary tissue modulates biomarker expression ER α -positive breast carcinoma. *Breats Cancer Research* vol 8 no 4. Jul 2006.
30. Hexachlorociclohexane, CAS 608=73=1 ATSDR Agency for Toxic Substances and Disease registry. Division of Toxicology TOX FAQs Aug. 1993

31. Hexachlorociclohexane, CAS 608=73=1 ATSDR Agency for Toxic Substances and Disease registry. Division of Toxicology TOX FAQs Aug. 2005
32. Perocco, P. Collacci, A; Pninna E. Ron, M. Cytotoxic and cell transforming effects of the insecticida lindane (gamma hexachlorociclohexano) on BALB/c3T3 cells. Res. Commun. Mol.Pathol.Pharmacol. 89,329-339.
33. Hexachlorociclohexane, CAS 608=73=1 ATSDR Agency for Toxic Substances and Disease registry. Division of Toxicology TOX FAQs Aug. 1994
34. Kasarali H, Hourdakias A, Anagnostopoulos H, Doulia H. Pesticida Residue in termal mineral water in Greece. Journal of environmental a Science and Health. Vol. B37 5 465=472. 2002
35. albíter P, Eslava E, Rosíles R, Niveles de pesticidas organoclorados en grasa de canales bovinas procedentes del centro y sureste mexicanos.vet.mex. 25 (2) ,1994.
36. Ataniyazova O, Baumann R, Liem A, Mukhopadhyay U, Vogelaar E, y Boersma E Levels of Certain Metals, Organpchlorine Pesticidas, and Dioxins in cord blood, maternal blood, human milk, and some comonly used nutrients in the surroundings of the Aral Sea . Karakalpakstan, Republic of Uzbekistán. Acta pediatrica 92:467,472.2003
37. Prado G, Méndez I, Díaz G, Noa M, González M, Ramírez A, Vega y León., Pérez N, Pinto M. Factores de participación en el contenido de plaguicidas organoclorados persistentes enleche humana en una población suburbana de la ciudad de México. Agro sur v.29 n 2 Valdivia, jul 2001.
38. Osibanjo O. Adeyeye A. Organochlorine Pesticide Residues in Foodstuffs of animal origin in Nigeria. Bull. Enviromen. Contam. Toxicol. 1997 58:206,11
39. Pesticidas News, No.32 june, 14. 1996. Disponible en línea <http://www.beyondpesticides.org>
40. Mertens, B. Boon N. Verstraete W. Slow- Realese Inoculation allows sustained biodegradation of γ -hexachlorociclohexane. Applied and environmental microbiology, jan 2006. p 622-627.
41. Mattison, D. Wohleb J. To T. Lamb Y. Faitak S. Brewster M. Walls R. Selevan S. Pesticide concentration in Arkansas breast milk. J Ark. Med. Soc. 1992 Apr; 88 (11):553-7.
42. Padio V. Walisewski K. Landin L. Bautista R. Organochloride pesticides residues in cow's milk from a tropical region of Mexico. Food Addit Contam.2003 Mar; 20(3): 259-69.
43. Enviromental Protection Agency EPA 1999 Disponible en linea <http://www.epa.org>
44. Kremzner M. Chhabra R. What are the new FDA warnings for lindane?. US Pharmacist. 28:09. posted 09/15/2003
45. Lindane education and research network. National pediculosis association. Disponible en linea <http://www.headlice.org>
46. Morbidity and Mortality weekly report. June 3,2005.54.21.2005 disponible en línea www.cdc.gov
47. Catalogo oficial de Plaguicidas. Comisión intersecretarial para el control del proceso y uso de plaguicidas, fertilizantes y substancias tóxicas. Cicloplafest. Secretaria de agricultura y recursos hidráulicos. Secretaria de desarrollo social. Secretaria de salud. Secretaria de fomento y comercio industrial. 1994.

48. Catalogo oficial de Plaguicidas. Comisión intersecretarial para el control del proceso y uso de plaguicidas, fertilizantes y sustancias tóxicas. Cicloplafest 2004. disponible en línea www.ine.gob.mx/dgicurg/plaguicidas
49. Armendáriz C; Pérez de Ciriza JA; Farráo R. Gas chromatographic determination of organochlorine pesticides in cow milk. *Int J Food Sci Nutr* 2004 May; 55 (3), pp. 215-21.
50. Buck W. Osweiler G, Van gelder G, Toxicología veterinaria clinica y diagnóstica. Ed. Acribia segunda ed 1981.
51. Ely R. Moore L The effect of various dosage levels of crystalline lindane on the concentration of lindene in cow's milk. Bureau of dairy industry. *Journal of dairy science* vol XXXV. 9. sept. 1952
52. Bluethgen A. Heesschen W, Tolle A, Hammann J. Experimental studies on the carryover of BHC isomers in milk after a topical application to lactating cows *Milchwissenschaft* 32(3): 127-131 1977