



Universidad Austral de Chile

Facultad de Ciencias
Escuela de Química y Farmacia

PROFESOR PATROCINANTE: Hernán Palma F.
INSTITUTO: Ciencias Químicas.
FACULTAD: Ciencias.

PROFESOR CO-PATROCINANTE: Jorge Gómez V.
INSTITUTO: Salud Pública.
FACULTAD: Medicina.

“DETERMINACIÓN DE PESTICIDAS ORGANOCLORADOS EN SUERO
SANGUINEO DE MUJERES GESTANTES DEL HOSPITAL DE LANCO POR
CROMATOGRAFÍA DE GASES ACOPLADA A ESPECTROMETRÍA DE MASAS CON
IONIZACIÓN QUÍMICA NEGATIVA”

Tesis de Grado presentada como parte
de los requisitos para optar al grado de
Título de Químico Farmacéutico.

RENATO ANDRÉS REYES OSSES

VALDIVIA – CHILE
2011

“Dedicado a mis padres

Quienes con sacrificio y perseverancia

Han hecho de sus hijos hombres de bien.

Es hora de que Uds. vean el fruto

De vuestra siembra”.

AGRADECIMIENTOS

Deseo agradecer en primer lugar al profesor Hernán Palma por la oportunidad que me dio para trabajar a su lado, por haber depositado la confianza en mí para desarrollar este trabajo y por supuesto, por su gran ayuda y apoyo durante este periodo difícil de la tesis. Agradezco también al proyecto que financió e hizo posible la realización de este trabajo, el proyecto DID S-2008-49.

También deseo agradecer a mi profesor informante Dr. Claudio Bravo, porque durante mi estadía en el laboratorio colaboró activamente en el desarrollo de mi trabajo, desde la colocación de materiales hasta el aporte de nuevas ideas para desarrollarlo. Mucho más importante que eso aún, fue su presencia en los momentos difíciles de esta tesis donde siempre tuvo alguna palabra de aliento para mí.

También quiero agradecer a mi profesor co-patrocinante, Jorge Gómez, cuya intervención en la parte final de este trabajo fue fundamental. Quiero darle las gracias por su muy buena disposición y por las excelentes ideas aportadas para el desarrollo de esta tesis.

También quiero agradecer la amistad, la enseñanza y el apoyo brindado por personas como el profesor César López, Juan Carlos Paredes y tantos otros del Instituto de Química que sin duda han dejado una huella en mi vida.

Quiero agradecer especialmente a dos personas que estuvieron no tan sólo durante el periodo de desarrollo de la tesis, sino durante todo estos años de universidad. Mis queridos amigos Carolina y Sebastián, personas que siempre estuvieron conmigo en las buenas y en las malas y que juntos hemos aprendido muchas cosas acerca de la vida.

Por último, debo agradecer a mis padres, ya que sin ellos seguramente yo no sería nada de lo que soy. Debo agradecer a mi madre quien sin duda con sus palabras directas y objetivas guió y alumbró el camino que debía seguir. Ella sin duda me ha enseñado importantes valores, como la transparencia y entereza en las cosas que se hacen, el sacrificio y la perseverancia para lograr los objetivos planteados y la firmeza para sobrellevar los momentos difíciles. A mi padre debo agradecer su infinita comprensión hacia mí todas las veces que fracasé en el ámbito académico, y por supuesto, debo agradecer su apoyo que seguramente seguiré teniendo de su parte por el resto de vida que nos queda por vivir juntos. Aunque ya se lo he dicho antes, esta vez quedará escrito para siempre que es la persona que más admiro en este mundo y que mis mayores deseos son seguir sus pasos.

ÍNDICE

1. RESUMEN	1
2. SUMMARY	2
3. INTRODUCCIÓN.....	3
3.1. Antecedentes generales sobre pesticidas.	3
3.2. Definiciones	5
3.3. Clasificación de pesticidas.....	6
3.4. Contaminantes orgánicos persistentes y disrupción endocrina.....	8
3.5. Pesticidas organoclorados.....	12
3.6. Exposición a pesticidas	15
3.7. Toxicocinética de pesticidas organoclorados en el humano	16
3.8. Toxicidad crónica de los pesticidas organoclorados.....	27
3.9. Antecedentes de pesticidas organoclorados en el sur de Chile.....	30
3.10. Situación legal actual en Chile con respecto a plaguicidas.	32
3.11. Planteamiento del problema.....	33
3.12. Hipótesis	34
3.13. Objetivos.....	34
4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	36
4.1. Materiales.....	36
4.2. Métodos.	37
5. RESULTADOS.....	49
6. DISCUSIÓN.....	56
7. BIBLIOGRAFÍA CITADA.....	65
8. ANEXOS.....	80

1. RESUMEN

En esta tesis se realizó la determinación cualitativa y cuantitativa de 20 pesticidas organoclorados de interés en salud pública en muestras de suero obtenidas bajo consentimiento informado de 39 madres gestantes del Hospital de Lanco. Para la extracción de los pesticidas en su forma pura y concentrada se utilizó la técnica de Microextracción en Fase Sólida (SPME) en su modalidad de espacio en cabeza (Head Space Solid-Phase Microextraction, HS-SPME). Las condiciones de extracción usando una fibra de polidimetilsiloxano (PDMS) 100 μ m fueron de 45min de extracción bajo agitación constante, a temperatura constante de 90°C en medio ácido sulfúrico con un volumen de espacio en cabeza de 2,4mL.

La fibra de PDMS fue llevada al cromatógrafo de gases acoplado a un espectrómetro de masas (GC-MS) en modo SIM (Single Ion Monitoring) para determinar la presencia de pesticidas en cada muestra y posteriormente cuantificarlos usando el método del estándar interno el cual usa las áreas bajo la curva de los picos cromatográficos.

Del total de 39 muestras, 36 resultaron positivas a la presencia de pesticidas organoclorados, lo cual equivale a aproximadamente un 92%. Dentro de los pesticidas encontrados se destacan p,p'-DDT, p,p'-DDE, α -HCH, β -HCH, γ -HCH, endosulfán sulfato y heptacloro.

Se concluye, por lo tanto, que la población de Lanco constituye una población expuesta a muy bajos niveles de pesticidas orgánicos considerados contaminantes orgánicos persistentes y disruptores endocrinos por la Organización Mundial de la Salud (OMS).

2. SUMMARY

In this thesis, a qualitative and quantitative determination of 20 organochlorine pesticides of interest in public health was carried out on 39 serum samples obtained under informed consent from expectant mothers of the Hospital de Lanco. For the extraction of pesticides in its pure and concentrated form, Solid Phase Microextraction (SPME) technique in Headspace mode was used. The extraction's conditions using a polydimethylsiloxane (PDMS) fiber 100 μ m was 45min of extraction time, constant agitation, 90°C of temperature in sulphuric acid medium with a headspace volume of 2,4mL.

The PDMS fiber was taken to the GC-MS instrument in SIM mode to determine the presence of organochlorine pesticides in each sample and subsequently to quantify using the internal standard method by means of the response factors obtained from a calibrate curve.

Thirty six out of thirty nine samples were positive to organochlorine pesticides, that is, a 92% approximately. In this analysis, just 7 pesticides were found, including p,p'-DDT, p,p'-DDE, α -HCH, β -HCH, γ -HCH, Endosulphan sulphate and heptachlor.

It is concluded that Lanco's population constitutes an exposed population to very low levels of organochlorine pesticides considered persistent organic pollutants and endocrine disruptors by the World Health Organization (WHO).

3. INTRODUCCIÓN.

3.1. Antecedentes generales sobre pesticidas.

Antes de la Segunda Guerra Mundial se contaba con un número relativamente limitado de sustancias químicas con las cuales se combatían las plagas. Dentro de estos compuestos se destacaban aquellos de origen inorgánico como los compuestos arsenicales, boratos y fluoruros como insecticidas, mientras que piretro, rotenona y nicotina eran compuestos orgánicos naturales que hasta ese entonces se ocupaban para el mismo fin (Fernicola, 1985). Las sales de cobre se conocían desde principios del 1800 d.C. por su poder fungicida; para este mismo objetivo se empleaban sales de cadmio y manganeso. Los compuestos de arsénico jugaron un gran rol durante ese tiempo en el control de plagas, primero como insecticidas, luego como herbicidas. Los sulfuros también han sido ampliamente usados como fumigantes desde principios de 1800, y aún en estos días siguen siendo los fumigantes de mayor uso (Costa, 2008).

La utilización de compuestos orgánicos sintéticos se comienza a perfilar como una de las mayores y más efectivas armas de la humanidad en la lucha contra las plagas cuando hacia 1920 se elucidan las estructuras moleculares de algunos pesticidas naturales (piretrinas) que hasta entonces se habían mostrado efectivos y se habían usado durante siglos pero sólo en la forma de extractos vegetales (Casida & Quistad, 1998).

A partir de la segunda mitad de 1940 aparecen como nueva tecnología los pesticidas organoclorados, los cuales a diferencia de los más antiguos, eran más efectivos y tenían un efecto más duradero en los cultivos debido a sus largas vidas medias (Casida & Quistad, 1998).

Los pesticidas organoclorados son una numerosa familia de compuestos orgánicos artificiales creados tanto para proteger los cultivos de las llamadas plagas que ponen en peligro el alimento de la humanidad, como para controlar vectores que transmiten enfermedades al ser humano. Por estas razones, desde sus inicios los pesticidas han sido innegablemente necesarios tanto en las áreas silvoagropecuarias como en el ámbito de la medicina, pero su uso excesivo está acarreando consecuencias tanto para los animales como para el ser humano.

Los problemas sanitarios que son atribuidos a estos compuestos se fundamentan principalmente en su ubicuidad en el medio ambiente debido a sus propiedades químicas y físicas de gran liposolubilidad y poca biodegradación, lo que les da una increíble persistencia en el medio ambiente.

Algunos de los pesticidas organoclorados caen dentro de una categoría de compuestos llamados disruptores endocrinos, cuya principal característica es que, si bien carecen de efectos tóxicos agudos graves o frecuentes, poseen efectos a largo plazo que afectan principalmente al sistema endocrino, ya que son capaces de interferir con el metabolismo hormonal conduciendo hacia complicados problemas reproductivos, inmunológicos, neurológicos, entre muchos otros.

A fin de estimar el daño ocasionado por estos compuestos es necesario, en primer lugar, detectarlos en distintas matrices biológicas y medioambientales con diversas técnicas analíticas que permitan llegar a determinar concentraciones a nivel de trazas. Este objetivo es hoy en día posible gracias a los avances en dichas técnicas analíticas. En segundo lugar, los científicos se valen de estudios experimentales y de investigaciones epidemiológicas observacionales para poder establecer algún vínculo entre la presencia de estos compuestos en el ser humano y la enfermedad observada a lo largo del tiempo.

3.2. Definiciones

Plaga: según Calva (1998), “una plaga es cualquier especie animal que el hombre considera perjudicial a su persona, a su propiedad o a su medio. Cualquier organismo molesto y dañino para el ser humano y sus intereses”.

De manera simple, una plaga puede ser insectos, roedores, maleza, un huésped u otro organismo no deseado (Costa, 2008).

Plaguicida: en términos muy simples, y habiendo definido anteriormente el concepto de plaga, se puede definir plaguicida o pesticida como cualquier sustancia o mezcla de ellas destinada a prevenir, destruir, repeler o mitigar una plaga (Costa, 2008).

Residuo de plaguicida: según la FAO (2002), esta palabra hace referencia a “cualquier sustancia específica presente en o sobre los alimentos, productos agrícolas o alimentos para animales como consecuencia del uso de un plaguicida”. El término incluye cualquier derivado de un plaguicida, como productos de conversión, metabolitos, productos de reacción, e impurezas consideradas de importancia toxicológica. El término “residuo de plaguicida” incluye tanto los residuos de procedencia desconocida o inevitables (por ejemplo, ambientales), como los derivados de usos conocidos de la sustancia química.

Dosis letal 50 (DL₅₀): concepto que aparece en la curva dosis-respuesta cuando lo que se determina es la letalidad en una población de animales debido a la exposición aguda a un determinado xenobiótico. Se entiende como la dosis letal de un xenobiótico capaz de matar al 50% de una muestra experimental de individuos de una especie (James *et al.*, 2000).

Persistencia: “es el tiempo de residencia de un agente químico específico en un compartimento definido del ambiente” (Fernícola, 1985). También puede definirse como la capacidad de una sustancia o un compuesto, de permanecer en un sustrato del ambiente en particular, después de que se ha cumplido el objetivo por el cual se aplicó (Ramírez & Lacasaña, 2001).

Toxicidad aguda: cualquier efecto adverso o indeseable que se manifiesta en un intervalo de tiempo relativamente corto, que va desde ser inmediata hasta algunos días después de la exposición (James *et al.*, 2000).

Toxicidad crónica: Efecto adverso permanente y duradero que se manifiesta después de la exposición a un tóxico (James *et al.*, 2000).

3.3. Clasificación de pesticidas.

Los pesticidas se pueden clasificar según su química, su toxicidad, su biodegradabilidad, su persistencia y su uso. Según la estructura química, estas sustancias se han clasificado como pesticidas organoclorados, organofosforados, carbamatos, piretroides, piretrinas, por nombrar algunos. En el CUADRO 1 del ANEXO 1 se presenta la clasificación según estructura química y se dan ejemplos de algunos compuestos representativos de cada grupo.

Se ha inventado un sistema binario de letras mayúsculas para clasificar a los pesticidas según su estructura química (CUADRO 2, ANEXO 1), pero la OMS no considera que este sea un sistema recomendado para clasificar pesticidas, puesto que la nomenclatura química de estos compuestos es algo confusa y poco excluyente. Por ejemplo, el mismo término “pesticida organoclorado” o “hidrocarburo clorado” no está bien definido, puesto que también hay otros átomos diferentes de C, H y Cl. Así, por ejemplo, el aldrín y otros ciclodienos contienen oxígeno en la molécula y endosulfán contiene azufre (Fernícola, 1985).

De cualquier modo, una clasificación química siempre es útil toda vez que los pesticidas agrupados en cada familia presentan propiedades químicas, físicas y toxicológicas bastante parecidas (Ramírez & Lacasaña, 2001).

La clasificación según su persistencia se muestra en el CUADRO 3 del ANEXO 1. Allí se observa que dentro de los compuestos más persistentes se encuentran los del grupo de los organoclorados y los metales pesados.

Según su biodegradabilidad, los pesticidas se han clasificado en dos grandes grupos:

1. Pesticidas degradables. Son aquellos que por diversos procesos biológicos y/o químicos naturales, son rápidamente desintegrados en la atmósfera, el suelo o el tubo digestivo del humano y animales en productos menos tóxicos. La gran ventaja que los diferencian de los no degradables, es la no acumulación en el organismo de los consumidores, no constituyendo por ende un riesgo de intoxicación por acumulación. Gourdsaud *et al.* citado por Barrientos (2005).
2. Pesticidas no degradables. Son aquellos que por sus características químicas son capaces de acumularse en los organismos que lo consumen, y no se transforman en productos menos tóxicos. Gourdsaud *et al.* citado por Barrientos (2005).

En la última categoría caen la mayoría de los pesticidas organoclorados, que por ser liposolubles son capaces de acumularse en el tejido graso de animales y en los vegetales (Barrientos, 2005; Wistuba, 1991).

La clasificación de pesticidas según su peligrosidad recomendada por la OMS fue aprobada en 1975 durante la XXVIII Asamblea Mundial de la Salud, y desde entonces ha sido periódicamente revisada. En el 2002, el Comité de Expertos en el Transporte de Productos Peligrosos y en el

Sistema de Clasificación y Etiquetado de Químicos Globalmente Armonizado de las Naciones Unidas (United Nations Committee of Experts on the Transport of Dangerous Goods and on the Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (UNCETDG/GHS) aprobó un documento llamado “The Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals” con el fin de establecer un Sistema Globalmente Armonizado (GHS) (OMS, 2009).

En las tablas actuales de clasificación de pesticidas elaboradas según recomendaciones de la OMS se ha agregado una columna del GHS que tiene que ver con la peligrosidad del pesticida. La clasificación según toxicidad aguda recomendada por la OMS se muestra en el CUADRO 4, mientras que la clasificación según el GHS se muestra en el CUADRO 5, del ANEXO 1. Ambas clasificaciones se basan en el LD₅₀ por vía oral y dermal del principio activo o formulación.

El uso de un pesticida no es un referente de clasificación, sino una simple identificación del uso más común que se le da de acuerdo a sus propiedades químicas. Así, se distingue una innumerable cantidad de usos para los cuales la OMS ha asignado una nomenclatura de una a tres letras mayúsculas que dan cuenta del mayor uso del pesticida (ver ANEXO 1).

3.4. Contaminantes orgánicos persistentes y disrupción endocrina.

Los contaminantes orgánicos persistentes (COPs) son una familia de compuestos químicos sintéticos usados en la industria química, o en agricultura como plaguicidas. No existe una definición precisa para ellos, sin embargo, se caracterizan por una serie de propiedades que son comunes a todos ellos, como es su largo tiempo de permanencia en el medio ambiente sin

biodegradarse, la posibilidad de bioacumulación en la biota, y la posibilidad de ser transportados a lugares más lejanos gracias a vectores bióticos y abióticos (ONU, 2004;PNUMA, 2000).

Desde hace mucho tiempo se sabe de la presencia de estos compuestos en lugares muy alejados, donde nunca han sido aplicados, ya que se han encontrado cantidades significativas de ellos en grasa de pingüinos del ecosistema antártico y en suelo y musgos de dicho continente (Donnewald *et al.*, 1976;Borghini *et al.*, 2005).

Actualmente, los COPs están distribuidos por todo el mundo, y es posible determinar cantidades traza de ellos en el suero humano, carnes animales, suelo, agua y aire. Concentraciones significativas del más emblemático pesticida organoclorado, el DDT, son aún detectables en leche humana y suero e investigaciones más recientes dan cuenta de la presencia de organoclorados en el ambiente en varios países, como México, España, Ghana, Argentina y otros (Charlier & Plomteux, 2002a;Charlier *et al.*, 2003b;Fernández *et al.*, 2008;Jakszyn *et al.*, 2009;Jiménez *et al.*, 2004;Ntow, 2001;Ntow *et al.*, 2008;Prado *et al.*, 2004;Ruiz *et al.*, 2008). Debido a estos antecedentes, los gobiernos de diversos países se reunieron en Suecia, para acordar un tratado llamado Convenio de Estocolmo, a partir del cual existe compromiso internacional para eliminar a los compuestos orgánicos persistentes (Argemi *et al.*, 2005). En este convenio, llevado a cabo el año 2001, se eligió un número de doce clases de compuestos persistentes cuya eliminación se considera que es de urgencia, y que son presentados en el CUADRO 7 del ANEXO 2. En el Convenio de Estocolmo, los países adscritos acordaron evaluar estas doce sustancias con el fin de eliminarlas. Estos doce COPs son conocidos como “la docena sucia” (PNUMA, 2000).

La preocupación de los países miembros de la ONU acerca de estos COPs surge a partir de la gran cantidad de trabajos de investigación que dan cuenta del efecto deletéreo de estas sustancias sobre el medio ambiente y, por ende, sobre la salud del ser humano. Debido al efecto crónico de disrupción endocrina, se cree que muy probablemente las generaciones actuales no sufran las consecuencias producto de la exposición, sino que serán las generaciones futuras, las cuales se sabe, desde muy temprana edad están expuestas por medio de la leche materna y el paso de estos compuestos a través de la placenta (Albert, 1981; Alexander *et al.*, 2001; Granada, 2006; Waliszewski *et al.*, 2000).

Con respecto a los efectos disruptores endocrinos, se ha visto que el hexaclorociclohexano y los PCBs son potenciales agentes disruptores tiroideos en recién nacidos expuestos en forma prenatal a estos compuestos. Las hormonas tiroideas son importantes en el desarrollo del sistema nervioso (Álvarez *et al.*, 2008). Por otro lado, los pesticidas organoclorados pueden actuar como xenoestrógenos, es decir, compiten con el estradiol por el receptor de estrógenos, por lo cual se ha postulado que los organoclorados pueden estar involucrados en el desarrollo de alteraciones de la fertilidad, pubertad precoz y cáncer (Charlier & Plomteux, 2002b). Con respecto a esto último, cabe destacar que se han determinado altos niveles de pesticidas organoclorados en mujeres con cáncer de mama con respecto a las que no lo tienen, lo que sugiere una relación causal entre la exposición a organoclorados y la aparición del cáncer de mama (Charlier *et al.*, 2003a; Falck *et al.*, 1992; Kortenkamp, 2006).

El sistema reproductor masculino también puede verse afectado por estos compuestos ya que en experimentos *in vitro* se ha visto que a bajas concentraciones el dieldrín pueden causar daños en las células de Leydig, las cuales disminuyen su secreción de testosterona (Fowler *et al.*, 2007).

Criptocidias, hipospadias, insuficiente producción de andrógenos, reducción del recuento espermático, baja calidad del semen, cáncer de próstata y testículo, etc. son otras de las tantas patologías en las cuales se considera que la exposición a pesticidas juega un importante rol como posible factor de riesgo (Argemi *et al.*, 2005; Fernández *et al.*, 2007). Se habla también de una disminución en el nacimiento de hombres y alteraciones del sistema inmune (Rogan & Ragan, 2007).

Para englobar esta serie de alteraciones producidas probablemente por exposición de estos agentes químicos, se ha acuñado el nombre de “disrupción endocrina”, y los compuestos químicos que están involucrados en estas patologías se denominan “disruptores endocrinos” (DEs) (Argemi *et al.*, 2005; Cravedi *et al.*, 2007; Granada, 2006). Los disruptores endocrinos se pueden definir como un conjunto de xenobióticos de muy diverso origen, estructura y uso, que interfieren en la síntesis y metabolismo hormonal, son agonistas o antagonistas de receptores hormonales, o modulan la población de receptores hormonales del organismo (Granada, 2006; Rivas *et al.*, 2004). La disrupción endocrina es un fenómeno que suele ir acompañado de malformaciones, alteraciones del sistema reproductor, neoplasias, algunas formas de neurotoxicidad o disminución de la respuesta inmunológica (Argemi *et al.*, 2005; Oléa *et al.*, 2002).

Actualmente, se ha comprobado con bastante claridad el hecho de que el ser humano está expuesto a DEs; sin embargo, es mucho menos clara la relación exposición-enfermedad, y este es un tópico que merece un estudio mucho más profundo. La baja potencia hormonal de estos compuestos; el desconocimiento absoluto del efecto combinado que pueden tener los DEs; el desconocimiento de sus mecanismos de acción en los órganos diana; y el intento de asociar

exposición a DEs con enfermedades de causas multifactoriales, de presentación transgeneracional, manifestadas en muchos casos, en forma de fallo funcional de alguna actividad orgánica y de presentación tardía, son algunos de los factores que explican la dificultad para establecer una relación de causalidad entre exposición a un DE y la enfermedad que produce (Oléa *et al.*, 2002). Se suma a este problema la gran cantidad de compuestos químicos que necesitan ser testeados toxicológicamente para determinar si son disruptores endocrinos o no, tanto aquellos que ya existen en el comercio o en el medio ambiente, como aquellos que se sintetizan cada año. Por otro lado, los test toxicológicos deben ser estandarizados y validados, y aún así pudieran no pesquisar algunos de los tantos efectos que tiene un DE sólo o en combinación con otras sustancias (Oléa *et al.*, 2002).

3.5. Pesticidas organoclorados

Los pesticidas organoclorados corresponden a compuestos químicos sintéticos caracterizados por la presencia de átomos de cloro en una estructura cíclica hidrocarbonada. Según Luquet *et al.* citado por Wistuba (1991), se les puede definir formalmente como compuestos orgánicos cíclicos o condensados en donde el elemento cloro se encuentra conformando un 60% del peso molecular. El primer pesticida organoclorado que se comenzó a usar en el mundo fue el DDT (1,1,1-tricloro-2,2-bis(clorofenil)etano), sintetizado en 1874 por el químico alemán Othmar Zeidler y descubierto como insecticida en 1939 por el suizo Paul Müller (Casida & Quistad, 1998). En 1942 el DDT entra al mercado no tan sólo como insecticida, sino también como un agente químico altamente efectivo en el control de enfermedades como el tifus epidémico y la malaria (Costa, 2008; Fernícola, 1985). Al mismo tiempo, a principios de 1940, científicos ingleses y

franceses ya habían descubierto las potentes propiedades insecticidas del isómero gamma del hexaclorociclohexano, más conocido como lindano, el cual había sido sintetizado en 1825 por Faraday (Casida & Quistad, 1998). Al DDT le siguieron numerosos otros compuestos organoclorados y organofosforados que se usaron con relativo éxito en el control de plagas de cultivo (Costa, 2008). La cloración del canfeno dio origen al toxafeno; Hyman y sus ayudantes sintetizaron clordano, aldrín y dieldrín utilizando la reacción de adición de Diels-Alder y el hexaclorociclopentadieno como uno de los reactivos. Finalmente, en el año 1957 otros científicos sintetizaron el endosulfán, dando así término a la era de descubrimiento de pesticidas organoclorados (Casida & Quistad, 1998).

Se ha dicho que en las dos décadas posteriores a la Segunda Guerra Mundial hubo un uso desmedido de pesticidas organoclorados, especialmente de DDT en E.E.U.U. y de ciclodienos y hexaclorociclohexano en Gran Bretaña y Japón, y a pesar de que el DDT goza de muy mala fama, la OMS acepta que hasta 1971 más de 1 billón de personas han sido salvadas del riesgo de contraer malaria gracias al uso del DDT (Calva & Torres, 1998). Por ejemplo, hacia el 1944 en Latina (Italia) se habían contabilizado al menos 175 nuevos casos de malaria. Después del rociamiento con DDT no se registraron nuevos casos hasta 1949. En Sudáfrica, el DDT se retiró en 1996, año en el cual había menos de 10.000 casos de malaria registrados en dicho país. Hacia el 2000, los casos de malaria ya se habían incrementado a 62.000, por lo que se optó por reincorporar el uso del DDT, lográndose bajar la cifra de casos de malaria a 12.500 (Costa, 2008).

El uso indiscriminado y generalizado de pesticidas organoclorados ha sido atribuido a dos razones principales, siendo la primera de ellas su persistencia, ya que al ser estos principios

activos tan estables en la naturaleza, su efecto protector sobre los cultivos permanece por largos períodos de tiempo; la segunda razón es simplemente el hecho de que estos compuestos son muy económicos (Calva & Torres, 1998).

Después de la Segunda Guerra Mundial, los científicos se empezaron a dar cuenta de que existían sustancias que eran capaces de persistir en el ambiente por mucho tiempo y de trasladarse de un lugar a otro a través de la atmósfera, aguas y suelos, además de acumularse a niveles que podrían ser dañinos para la salud de animales y seres humanos (El-Shahawi *et al.*, 2010). Dentro de estas sustancias llamadas contaminantes orgánicos persistentes (COPs) se consideran también casi todos los pesticidas organoclorados.

Las principales ventajas de los compuestos organoclorados eran su larga vida media y poca reactividad en el medio ambiente. Sin embargo, a través de los años, fueron estas mismas características las que hicieron de los pesticidas organoclorados una amenaza para los animales y seres humanos (Montes *et al.*, 1986). Con estos compuestos se logró controlar muchas enfermedades parasitarias y se redujo las pérdidas de alimentos; sin embargo, pronto se comenzaron a ver las consecuencias del uso indiscriminado del DDT, principalmente en aves y peces, y en 1973 se prohibió su uso y transporte en E.E.U.U. (Bergel, 2004; Casida & Quistad, 1998). A partir del 1970, por lo tanto, la mayoría de los pesticidas organoclorados comienzan a ser severamente restringidos o prohibidos en diversas partes del mundo, a excepción del lindano y el endosulfán, que aún tienen importancia en la protección actual de cultivos, y hasta el mismo DDT aún es usado en países en donde la malaria aún no logra ser erradicada (Casida & Quistad, 1998).

En el ANEXO 3 se presenta una clasificación química de compuestos organoclorados además de sus estructuras moleculares. También se describen sus propiedades físicas, químicas y toxicológicas más importantes en dicho apartado.

3.6. Exposición a pesticidas

Existen diversas formas por las cuales el humano puede entrar en contacto con las fuentes de pesticidas organoclorados, pero podemos agruparlas en general en dos tipos: la exposición laboral y la exposición pública general (Ballantyne & Marrs, 2004). Otros autores también clasifican los tipos de exposición en intencionales y no intencionales, y en agudas o crónicas (Calva & Torres, 1998).

La exposición laboral u ocupacional se refiere a la que ocurre cuando las personas que trabajan con pesticidas tienen contacto directo con estos compuestos. Las personas que pueden sufrir una exposición ocupacional son aquellas que están relacionadas directamente con la manufacturación, formulación y/o mezcla de productos agroquímicos, transporte, distribución y venta además de los operarios que están a cargo de la aplicación de pesticidas a las siembras, o bien del cultivo y cosecha. Finalmente, el personal de limpieza y socorristas en industrias de plaguicidas también pueden sufrir este tipo de exposición (Calva & Torres, 1998). Para este tipo de exposición, la vía de entrada del xenobiótico al organismo es principalmente por las vías dérmica e inhalatoria (Cope, 2010).

La exposición pública general también puede ser llamada exposición no ocupacional, y es la que pueden sufrir personas que entren en contacto con una fuente de pesticidas, como vegetales comestibles contaminados, carnes de animales, leche o aguas contaminadas. Las personas que

viven en sectores aledaños a las grandes plantaciones también pueden sufrir este tipo de exposición. La exposición no laboral generalmente es accidental cuando el producto agroquímico de uso doméstico no está bien almacenado en el hogar o no está con la rotulación adecuada. También es frecuente la aplicación descuidada del producto, cerca de los alimentos, sin la protección adecuada o el contacto de las manos con la boca durante la aplicación de éstos (Ballantyne & Marrs, 2004; Calva & Torres, 1998).

El tipo de toxicidad causada por cada tipo de exposición será de tipo aguda o crónica dependiendo principalmente de la dosis de exposición y el tiempo durante el cual el individuo está expuesto (James *et al.*, 2000).

3.7. Toxicocinética de pesticidas organoclorados en el humano

Existen principalmente tres vías por las cuales los pesticidas pueden entrar al organismo, para luego pasar al torrente sanguíneo y desde ahí a los diversos órganos target, que son la vía oral, la vía dérmica y la vía inhalatoria (Chhabra, 1979; Haley, 1956).

La llegada de pesticidas organoclorados a través de la vía oral es una de las principales y más importantes debido a la presencia de compuestos organoclorados en los alimentos en cantidades traza (Chhabra, 1979). Las preocupaciones por la contaminación por pesticidas organoclorados se fundamentan al observarse la acumulación y la persistencia de estos compuestos en la cadena trófica, especialmente en tejidos ricos en grasa. Los residuos de pesticidas organoclorados representan para el hombre un gran riesgo, debido a su toxicidad crónica por la ingestión de

pequeñísimas cantidades presentes en los alimentos, principalmente de origen animal, como lácteos y cárnicos (Costabeber & Emanuelli, 2002).

Se ha hallado que el ganado está expuesto a pesticidas organoclorados, y que éstos secretan dichos compuestos junto a la leche, con lo que se deduce que los lácteos también contienen bajas cantidades de organoclorados (Waliszewski *et al.*, 2002). Las aves de corral también pueden estar expuestas a los pesticidas, ya sea por el consumo de alimento contaminado o por su aplicación cerca de gallineros. Estos pesticidas pueden llegar finalmente al huevo (Albert & Rendón-von Osten, 1988).

En un trabajo realizado hace unos 20 años atrás en una ciudad de México se encontraron residuos de pesticidas organoclorados en el 100% de las muestras analizadas de queso y huevo, por lo que se concluye que la población está expuesta al ingerir la carne o los alimentos derivados como el huevo, el queso, la leche y otros lácteos. La presencia de DDD en estos alimentos hizo pensar a los autores que los animales estuvieron expuestos por consumo de alimento vegetal contaminado (Albert & Rendón-von Osten, 1988). Las plantas transforman el DDT principalmente a DDD y no a DDE como lo hacen las aves y los mamíferos, por lo que Waliszewski *et al.* (2002) atribuyen la presencia de concentraciones elevadas de p,p'-DDE en el tejido adiposo humano a la contaminación presente en los alimentos ingeridos de origen animal, donde el DDT es fuertemente metabolizado a DDE. Según Ludwiki & Góralczyk (1994), la mayor presencia de p,p'-DDE en el tejido adiposo tiene su origen principalmente en la dieta, y en menor proporción, del metabolismo del p,p'-DDT en el humano. Según Fernícola (1985), la principal vía de ingreso del DDT es a través de la ingesta de alimentos contaminados, sobre todo aquellos ricos en grasa,

y esto es algo con lo cual también coincide la OMS, que además sostiene que la absorción ocurre en el intestino delgado por tener la mayor irrigación y la mayor superficie de absorción.

La vía dérmica constituye una buena vía de entrada para muchos pesticidas altamente liposolubles. Existen los llamados pesticidas de contacto, altamente hidrofóbicos, cuya forma de entrar al organismo del insecto es atravesando la quitina. Esta propiedad les permite atravesar también la piel humana (Fernícola, 1985).

Para los operarios y personal relacionado con la aplicación, almacenamiento, transporte, etc. de pesticidas, la principal ruta de exposición es la piel y el tracto respiratorio (inhalación de vapores de sustancias volátiles) (Cope, 2010), siendo las manos, una de las zonas del cuerpo que inevitablemente están más altamente expuestas cada vez que hay accidentes o el trabajador no toma precauciones de autoprotección (Matthews, 2011).

En general, cuando un compuesto químico entra en contacto con la piel, puede ser absorbido a través de ésta si el compuesto tiene la suficiente lipofilicidad, y pasar al torrente sanguíneo provocando efectos sistémicos, o bien, producir una dermatosis local. La magnitud de la absorción está en directa relación con la concentración del xenobiótico en la zona de absorción y de la irrigación sanguínea en el lugar (Patnaik, 2007b). Independiente de si hay absorción o no, la exposición a un pesticida a través de la piel por lo general conduce a una dermatosis local producida por el efecto irritante o alergénico del compuesto químico. Estas dermatosis se caracterizan por eczema, acné, cambios de pigmentación, úlceras y manifestación de neoplasias a largo plazo y sobre todo cuando la exposición es crónica (Cope, 2010).

La OMS considera que la piel es una de las vías de exposición más frecuente, puesto que suele pasar inadvertida. El pesticida puede atravesar la epidermis y dermis y llegar así a la sangre,

proceso que se ve facilitado cuando la temperatura es alta o cuando la piel está húmeda y con heridas (Wistuba, 1991).

Puede decirse que la efectividad de la absorción de cualquier compuesto químico a través de las vías respiratorias depende de la solubilidad en la sangre, del tamaño de partícula y de la volatilidad del compuesto (Patnaik, 2007b). Mientras más pequeño sea el tamaño de partícula del compuesto, más probable es que llegue a los alvéolos pulmonares, donde la irrigación y la superficie son lo suficientemente extensas como para permitir la absorción. Por otro lado, mientras más soluble en la sangre y más volátil sea el compuesto, mejor será la absorción a través de la vía inhalatoria (Patnaik, 2007b).

Según Fernícola (1985), la vía respiratoria ha sido una importante vía de exposición para niños cuando se aplicaban formulaciones que contenían DDT en el hogar, o para personas en general, que ingresaban en el radio de zonas donde se había aplicado dicho compuesto y respiraban partículas en suspensión. Hasta 1982, la OMS consideraba que la vía respiratoria carecía de importancia como fuente de intoxicación con DDT, ya que las partículas de este compuesto poseen un gran volumen ($>250\mu\text{m}$), lo que hace que se depositen en la parte superior del aparato respiratorio; sin embargo, se sabe que la inhalación del polvo del DDT produce irritación pulmonar y también se reconoce que en zonas tropicales donde la temperatura suele ser alta y la volatilidad del DDT se ve aumentada, la principal vía de exposición a dicho pesticida consiste en la inhalación del aire contaminado (Fernícola, 1985; Waliszewski *et al.*, 2000).

Los pesticidas que entran al organismo por la vía oral están destinados a ser absorbidos en el epitelio del intestino delgado, y esta absorción puede verse optimizada por grasas o solventes apolares (Cheremisinoff & King, 1994). En este ámbito se realizó una investigación para estudiar

cómo pueden influir los hábitos alimentarios de las personas en los niveles detectables de residuos organoclorados en tejido adiposo. El estudio, llevado a cabo con muestras de donantes de Córdoba, España, no pudo llegar a establecer una relación significativa entre los hábitos alimentarios de las personas y sus niveles de residuos de pesticidas en el tejido graso (Costabeber & Emanuelli, 2002).

El DDT se absorbe en el tracto gastrointestinal de manera bastante lenta, pero dicha absorción puede ser de 1.5 a 10 veces más eficiente cuando el compuesto está disuelto en grasa animal o vegetal (Smith, 2010). Parte del DDT que llega al lumen del intestino delgado puede ser absorbido por vía linfática y llegar al torrente sanguíneo formando parte del centro lipídico de los quilomicrones (Smith, 2010). Generalmente, la absorción por vía linfática carece de importancia en el ámbito de la terapéutica, sin embargo, cuando se trata de absorción de tóxicos ambientales, esta vía es importante porque implica la llegada del tóxico a la sangre sin haber pasado por el hígado, es decir, sin haber sido biotransformado (Chhabra, 1979).

La absorción a través de la piel intacta es un proceso mucho más variable. Se ha visto que los isómeros del HCH, los ciclodienos y el endosulfán, se absorben exitosamente a través de la piel, mientras que la absorción del DDT y el metoxicloro por esta vía es notablemente menor (Cheremisinoff & King, 1994). El lindano tiene una absorción a través de la piel increíblemente variable, entre el 10% y el 90% dependiendo del vehículo empleado y el lugar donde se aplique, mientras que el dieldrín, aún en estado sólido finamente dividido, puede absorberse a través de la piel con una toxicidad que es al menos la mitad de la medida por vía oral (Smith, 2004).

La absorción de vapores de pesticidas organoclorados volátiles está gobernada por el coeficiente de partición sangre-gas del compuesto. Mientras mayor es este coeficiente, mayor es la absorción

a nivel alveolar. El epitelio de los alvéolos (neumocitos tipo I) es tan delgado que cualquier gas debe recorrer una distancia bastante corta desde el espacio alveolar hasta la sangre (Lehman-McKeeman, 2008). En el caso de aerosoles, la absorción depende del tamaño de la partícula y de la solubilidad en agua del compuesto químico. Las partículas de $5\mu\text{m}$ o más quedan depositadas en la nasofaringe y desde aquí son llevadas al exterior por reflejos como es estornudo o la tos. Sólo las partículas solubles en el mucus son capaces de llegar hasta la faringe y ser absorbidas allí, para llegar a la sangre. Las partículas cuyo diámetro es de $2,5\mu\text{m}$ hasta $1\mu\text{m}$ pueden llegar hasta las zonas traqueobronquiales de los pulmones. En esta región, las partículas son llevadas al exterior gracias al movimiento ciliar del epitelio; sin embargo, existe la posibilidad de que parte de estas partículas sean tragadas y sean absorbidas a nivel gastrointestinal. Las partículas de diámetro menor a $1\mu\text{m}$ llegan hasta los sacos alveolares y son absorbidas. Partículas aún más finas tienen la posibilidad de ser fagocitadas por macrófagos alveolares que posteriormente van al sistema linfático (Lehman-McKeeman, 2008).

En general, la mayoría de los pesticidas se distribuyen y se almacenan en el tejido adiposo en su forma no metabolizada (Cheremisinoff & King, 1994; Kawasaki & Tadano, 2001) debido a su gran lipofilia y su lento metabolismo en el organismo, alcanzando concentraciones un poco más bajas en otros tejidos como las glándulas adrenales y otros con alto contenido graso (Smith, 2004). Algunos pesticidas organoclorados pueden acumularse en el cerebro, el riñón y el hígado, causando toxicidad en estos tejidos (Smith, 2004).

Su metabolismo ocurre en el hígado, al igual que con todos los demás xenobióticos, y a este nivel pueden sufrir diversas reacciones químicas como deshidrohalogenación, oxidación (hidroxilación, O- o N- dealquilación y epoxidación), deshidrogenación (reducción), hidrólisis y

conjugación con ácido glucurónico, glutatión, sulfatos o aminoácidos (Kawasaki & Tadano, 2001;Smith, 2004). Muchas de las reacciones de oxidación, como la hidroxilación y deshidrohalogenación del lindano, la epoxidación de endrín para dar dieldrín y la O-dealquilación del metoxicloro son reacciones mediadas por el complejo enzimático microsomal CYP-450 (Smith, 2004). Los compuestos resultantes, llamados metabolitos, son más polares y pueden ser eliminados por la bilis, sin embargo, muchos de los pesticidas logran ser reabsorbidos a nivel de intestino delgado (circulación enterohepática), retardándose su eliminación por vía fecal (Cheremisinoff & King, 1994;Chhabra, 1979).

Tanto los pesticidas sin metabolizar como sus metabolitos, son excretados no tan sólo en la orina, sino también a través de la bilis y fecas, además de la leche materna (Kawasaki & Tadano, 2001;Smith, 2004). Los metabolitos son eliminados en la orina si poseen una polaridad relativamente alta. En este proceso puede existir reabsorción en el tracto gastrointestinal (circulación enterohepática) y transporte hacia el hígado y riñón, para dar paso a más transformaciones metabólicas. Un ejemplo de esto son los conjugados de glutatión, los cuales se reabsorben en el intestino delgado y luego son convertidos en mercapturatos para una eliminación urinaria final (Smith, 2004).

Aspectos toxicocinéticos del DDT y Metoxicloro. La vía inhalatoria es la de menor importancia en el caso de la exposición a DDT, puesto que las partículas de DDT son lo bastante grandes como para quedar retenidas en la parte más alta de las vías respiratorias; sin embargo, muchas de estas partículas pueden ser tragadas y ser entonces absorbidas en el tubo digestivo. El DDT que se absorbe a nivel intestinal puede ser incorporado a los quilomicrones cuando se absorbe por vía linfática, y en este caso su toxicidad se ve mejorada, puesto que el pesticida se distribuye hacia

todos los tejidos en su forma activa y no metabolizada. Las más altas concentraciones pueden detectarse en el tejido adiposo, aunque en realidad alcanza todos los órganos, incluyendo al cerebro.

Un par de trabajos han logrado relacionar los niveles de DDT en el tejido adiposo humano con la edad. En la literatura se indica que para la mayoría de los fármacos liposolubles el tejido adiposo constituye un reservorio para ellos, de manera que la vida media de muchos de los medicamentos de uso actual se prolonga en individuos obesos; sin embargo, en el caso de los pesticidas organoclorados, no puede afirmarse que los individuos obesos presentan niveles mayores de estos compuestos, sino que son los individuos de más avanzada edad los que presentan los mayores niveles (Hue *et al.*, 2007; Minh *et al.*, 2001; Voorspoels *et al.*, 2002). Hue *et al.* (2007), por ejemplo, encontraron que los individuos obesos y obesos mórbidos presentaban niveles plasmáticos de compuestos organoclorados similares a los que se encontraban en individuos con un menor porcentaje de grasa corporal y que dichos niveles se relacionaban con la edad más que con el IMC (Índice de Masa Corporal). Esto demuestra la gran capacidad de bioacumulación a través del tiempo que poseen estos compuestos. Minh *et al.* (2001) llegaron a los mismos resultados analizando directamente muestras de tejido adiposo de individuos japoneses. Por otro lado, estudios relativamente recientes han demostrado que los niveles sanguíneos de PCBs, DDT y otros compuestos organoclorados pueden incrementarse cuando los individuos obesos bajan rápidamente de peso (Charlier *et al.*, 2002; Chevrier *et al.*, 2002). Esto lleva a concluir que los individuos obesos tienen un mayor riesgo de problemas a la salud no tan sólo por su gordura en sí, que los predispone a sufrir enfermedades como hipertensión, diabetes o hipercolesterolemia, entre otras, sino también porque al adelgazar se pueden acentuar los efectos de sustancias potencialmente tóxicas acumuladas en el tejido adiposo (Chevrier *et al.*, 2002).

Aunque el DDT es extensamente metabolizado en el organismo, este proceso es en extremo lento. Los principales metabolitos del DDT son el DDE, DDD y DDA (isómeros p,p'- y o,p'- en cada caso), que son eliminados a través de la bilis, la orina y la leche materna (Costa, 2008). Por supuesto que el metabolismo del DDT difiere de un animal a otro y de una especie a otra. En el caso del humano, es raro que la presencia en suero o tejidos de DDE se deba al metabolismo del DDT. La presencia de DDE en tejidos humanos se asocia con la ingesta de alimentos contaminados o bien por una exposición de larga duración al DDT (Ludwiki & Goralczyk, 1994; Waliszewski *et al.*, 2002).

Se sabe también que el DDT y sus metabolitos son inductores enzimáticos. Así, por ejemplo, se ha visto que el DDT y el o,p'-DDD aumentan el metabolismo del cortisol y que metabolitos como el DDE y el DDA pueden ser responsables de la resistencia que presentan algunas ratas de campo a la warfarina, dado que el insecticida acelera la biotransformación del dicumarol y la warfarina. Por último, merece ser destacado que en una fábrica de DDT se observó en los trabajadores que la vida media de la fenilbutazona disminuyó en comparación con un grupo control (Fernícola, 1985).

El metoxicloro es un análogo del DDT, pero a diferencia de este último, su vida media es mucho más corta, se metaboliza rápidamente y no se acumula en los tejidos, hecho por el cual fue muy usado después del retiro del mercado del DDT (Costa, 2008; Haley, 1956). Sin embargo, el metoxicloro es metabolizado por CYP2C19 y CYP1A2, siendo un inductor enzimático moderado, y los metabolitos que se originan por esta vía tienen actividad estrogénica a diferencia del compuesto parental que en experimentos *in vitro* no ha mostrado tener dicha actividad (Smith, 2004).

Aspectos toxicocinéticos de HCH. A diferencia del DDT, los isómeros del hexaclorociclohexano se absorben muy bien a través de la piel, y pueden ingresar al organismo también por vía oral e inhalatoria (Costa, 2008). Aunque los cuatro isómeros más importantes del HCH se acumulan en el tejido adiposo, se ha visto que la capacidad de almacenamiento del β -HCH en este tejido puede ser hasta de 30 veces mayor que la del γ -HCH, lo cual explica por qué el isómero β causa más toxicidad que el lindano, isómero más activo de todos. En cuanto al α -HCH, este tiene una gran tendencia a acumularse en el cerebro (Smith, 2004).

El lindano es parcialmente deshalogenado y oxidado luego de su absorción, dando lugar a una serie de ciclohexanoles, ciclohexenoles, clorofenoles y otros compuestos de oxidación que son conjugados con ácido glucurónico y eliminados por la orina o las heces (Cheremisinoff & King, 1994;Costa, 2008). El lindano, al igual que el metoxicloro, el endrín y el endosulfán tienen una rápida disposición metabólica, lo cual reduce la probabilidad de que sean detectados en grasa, sangre o leche materna (Cheremisinoff & King, 1994).

El metabolismo de los otros isómeros del HCH distintos del lindano no ha sido tan estudiado, pero si se sabe que es más lento que para el mismo lindano, lo cual explica por qué tienen una mayor tendencia a la acumulación en tejido graso (Costa, 2008;Smith, 2004).

La inducción enzimática también ocurre con estos isómeros, y una consecuencia de esto es que a dosis más altas la tendencia del HCH a almacenarse en los órganos puede ser menor que a bajas dosis, donde la inducción de enzimas que lo metabolizan es mucho menor (Smith, 2004).

Aspectos toxicocinéticos de los ciclodienos. Al igual que HCH, estos compuestos pueden absorberse eficientemente a través de la piel, y a diferencia del DDT, su absorción a nivel de intestino delgado parece ocurrir mayoritariamente a través de la vía portal (Smith, 2010).

El aldrín es biotransformado a dieldrín por simple epoxidación en el hígado. Por medio de la misma reacción, el heptacloro es biotransformado a heptacloro epóxido y el isodrín a endrín. En cada uno de estos casos, la reacción da lugar a un epóxido que es mucho más tóxico que el compuesto original. La única excepción puede constituirlo el endrín, el cual sufre una rápida biotransformación a 12-hidroxiendrín y luego a 12-cetoendrín; sin embargo, el 12-cetoendrín es más potente y se acumula mucho más en los tejidos (Smith, 2004).

Al igual que con el DDT, DDE y β -HCH, la disposición metabólica de dieldrín y heptacloroepóxido tiende a ser lenta. Estos epóxidos se almacenan en grasa y otros tejidos donde pueden ser detectados, y pueden excretarse en la leche materna (Cheremisinoff & King, 1994).

El dieldrín es uno de los compuestos organoclorados más persistentes conocidos. En la sangre puede encontrarse en gran porcentaje dentro de los glóbulos rojos, un 39,8% en comparación con el 12, 5% del DDT. Además, se ha visto que su concentración en el tejido adiposo humano es de unas 140 veces lo detectado en sangre (Jorgenson, 2001), mientras que la concentración de DDT en grasa es de unas 338 veces la detectada en sangre (Fernicola, 1985). A partir de esta gran tendencia de algunos compuestos organoclorados de almacenarse en la grasa es que Minh *et al.* (2001) trataron de predecir la eliminación potencial de compuestos persistentes. Ellos encontraron una correlación entre el coeficiente de partición aceite/agua, K_{ow} , y la velocidad de excreción biliar de algunos compuestos como DDT y hexaclorobenceno (HCB), llegando a dilucidar que mientras mayor es K_{ow} (mayor lipofiliidad) menor es la velocidad de excreción biliar.

3.8. Toxicidad crónica de los pesticidas organoclorados.

Mientras que los efectos tóxicos agudos de los pesticidas organoclorados han sido bien establecidos (efectos sobre el sistema nervioso que se verifican por cefaleas, mareos, parestesias, temblor, incoordinación y convulsiones), sus efectos por una exposición crónica aún no están lo suficientemente claros (Britt, 2000; Rogan & Ragan, 2007; Rogan & Ragan, 2003).

Los efectos debido a la exposición crónica a pequeñas cantidades de pesticidas y otros compuestos clorados ha sido observada claramente en animales, y entre las décadas de 1940 y 1950, el aumento de la mortalidad de peces y aves era considerado como el resultado del mal uso de estos pesticidas, o bien, como un efecto adverso inevitable (Albert, 1981; Casida & Quistad, 1998). Después de la II Guerra Mundial, el daño que se estaba generando en el medio ambiente vino a ser inaceptable, y se abrió el campo de investigación en torno a los efectos de estos compuestos sobre el ambiente y su potencial riesgo para la salud humana (Casida & Quistad, 1998; El-Shahawi *et al.*, 2010).

En las aves, el principal efecto de los pesticidas organoclorados producto de la exposición crónica se observa en la reproducción, donde se ha podido establecer que principalmente el p,p'-DDE es capaz de producir un adelgazamiento de los cascarones de huevos en varias especies como el halcón y el águila (Calva & Torres, 1998). Esto trae, como consecuencia, una disminución en el número de polluelos que nacen, mientras que los que sobreviven mueren al poco tiempo, manifestando síntomas de intoxicación aguda por organoclorados (Albert, 1981).

En los peces, se considera que los pesticidas originan una disminución en el crecimiento y deformaciones graves en la espina dorsal (Albert, 1981), mientras que en mamíferos acuáticos, su gran porcentaje de grasa corporal permite que estos compuestos organoclorados se acumulen en

su organismo. En periodos de lactancia y ayuno la transferencia de compuesto organoclorados es particularmente importante en estos animales, pero se desconocen las consecuencias para la descendencia (Calva & Torres, 1998).

Gran parte de los efectos que se presume podrían sufrir los humanos han sido demostrados por medio de investigaciones en animales de experimentación y estudios epidemiológicos observacionales. Hasta hoy, los efectos que se han atribuido a la exposición crónica a este tipo de pesticidas abarcan una gran gama de enfermedades que van desde distintos tipos de cáncer hasta enfermedades como el Parkinson y trastornos sobre el sistema endocrino.

En el caso del DDT, se sabe que uno de los principales órganos que sufren toxicidad a causa de la exposición crónica es el hígado (Costa, 2008). En animales de experimentación se ha visto que tanto el DDT como el DDE aumentan el peso del hígado, causando hipertrofia y necrosis. Además, se ha mostrado ser hepatocarcinogénico en ratas y ratones (Costa, 2008) pero, no se puede decir que el DDT es carcinogénico puesto que este efecto se restringe prácticamente sólo al hígado de algunos tipos de roedores (Smith, 2010).

Como compuestos disruptores endocrinos, los pesticidas organoclorados deben poder modificar el funcionamiento hormonal de los seres vivos. En este sentido, se tienen pruebas que demuestran que compuestos como el o,p'-DDT tienen efectos estrogénicos y que pueden activar a los receptores de estrógenos alfa y beta ($ER\alpha$ y $ER\beta$, respectivamente) (Costa, 2008). El metoxicloro, análogo del DDT actúa como agonista del $ER\alpha$, como antagonista del $ER\beta$, y como antiandrogénico, mientras que compuestos como dieldrín, endosulfán, lindano y β -HCH, tienen actividad estrogénica débil (Costa, 2008).

La gran importancia de la actividad estrogénica de estos compuestos radica en que el cáncer de mama en la mujer muchas veces es dependiente de estrógenos, y el hecho de que existan una gran cantidad de trabajos que demuestran concentraciones relativamente altas de dichos compuestos tanto en suero como en tejido adiposo mamario preocupa a los científicos. Aunque se ha dicho que la baja potencia hormonal de estos disruptores endocrinos imposibilita establecer una relación causa-efecto, se defiende por otro lado que, si bien la afinidad por los receptores de estrógenos es mucho más baja que la de estrógenos endógenos, la gran persistencia que estos compuestos tienen en la grasa animal posibilita que estos compuestos produzcan cambios fisiológicos a largo plazo (Oléa *et al.*, 2002;Starek, 2003).

La relación causa-efecto se ha tratado de establecer por medio de investigaciones observacionales epidemiológicos del tipo caso-control y cohortes. En uno de los primeros trabajos realizados, se encontró que la concentración promedio de DDE y algunos congéneres de bifenilos policlorados (PCBs) era significativamente más alta en los casos (mujeres con cáncer mamario maligno) que en los controles (mujeres con cáncer mamario benigno), pero los autores fueron recatados en sus conclusiones y advierten que durante la enfermedad pudieron haber muchos cambios fisiológicos como una redistribución de compuestos hacia el tejido adiposo mamario, o bien, que en la determinación del riesgo para estos pacientes pudieron haber factores que no fueron tomados en cuenta (Falck *et al.*, 1992). En un trabajo similar se relaciona la exposición al dieldrín con el cáncer mamario, y se concluye que la exposición a xenoestrógenos puede incrementar el riesgo de cáncer mamario (Hoyer *et al.*, 1998). Algunos de estos estudios de tipo caso-control han podido dilucidar diferencias étnicas en el riesgo relativo para cáncer mamario, y en este sentido, se ha visto que las mujeres blancas tienen un mayor riesgo relativo de cáncer mamario (Charlier *et al.*, 2003a;Snedeker, 2001).

También se ha tratado de vincular a los pesticidas organoclorados con el cáncer pancreático. Un estudio de casos y controles del año 2000, por ejemplo, logró determinar niveles de DDE y PCBs en suero de individuos con cáncer pancreático que eran significativamente más altos que las concentraciones determinadas en los controles (Hoppin *et al.*, 2000).

En otros trabajos se ha visto que niveles aumentados de DDE y PCBs en suero sanguíneo de madres gestantes se relacionan con altos niveles de la hormona estimulante de la tiroides, THS, y bajos niveles de T4, y que incrementan la prevalencia de diversos desórdenes tiroideos y metabólicos (Langer *et al.*, 2009; Lopez-Espinosa *et al.*, 2009).

3.9. Antecedentes de pesticidas organoclorados en el sur de Chile.

En Chile, existen pocos estudios que relacionen la exposición a pesticidas con la aparición de malformaciones congénitas. En este sentido, se puede destacar el trabajo que llevó a cabo Rojas *et al.* (2000) como uno de los pocos hechos en Chile que tratan de relacionar ambas variables. Este es un estudio epidemiológico que trata de establecer una posible relación causal entre la exposición a pesticidas de las madres y/o padres y la inducción de malformaciones congénitas en los hijos recién nacidos, con fichas ECLAMC (sistema de vigilancia del Estudio Colaborativo Latino Americano de Malformaciones Congénitas) recolectadas entre los años 1996 y 1998 en el Hospital Regional de Rancagua. En los resultados de este trabajo se encontraron relaciones significativas entre la cercanía de las viviendas a lugares fumigados, los padres trabajadores agrícolas y la presencia de malformaciones congénitas en los hijos recién nacidos. A pesar de que la asociación podría resultar clara, los mismos autores enfatizan que se necesitan más estudios para poder confirmar estas sospechas (Rojas *et al.*, 2000).

En otro estudio epidemiológico llevado a cabo por Nazer *et al.* (2001) en el periodo 1995-1999 se pudo observar la alta frecuencia que tuvieron las malformaciones del cierre del tubo neural en las regiones V, VI y VIII, y se sugiere que la alta actividad agrícola en estas regiones y el uso de pesticidas podría ser un factor que influye en las estadísticas obtenidas. Además, se informa a Valdivia como una de las 3 maternidades del ECLAMC donde la anencefalia y la espina bífida se presentan con mayor frecuencia. Por último, los autores afirman que las malformaciones congénitas han aumentado su importancia relativa como causas de mortalidad infantil, pasando del 4,1% en 1969 a 35% en 1998 (Nazer *et al.*, 2001).

En Chile, las malformaciones congénitas no son un problema menor, y el gobierno ha estado preocupado de ello. Cabe destacar que la harina se utiliza fortificada con ácido fólico, para evitar malformaciones del tubo neural.

La aplicación de pesticidas organoclorados en el sur de Chile fue grande. Tras la prohibición del uso del DDT el año 1984, se detectaron altos niveles de este compuesto en carnes de la décima región (Montes *et al.*, 1986).

A fines de la década de los '80 se hicieron algunas determinaciones de organoclorados en leche materna (Hermosilla, 1989) y en leche de rebaños en Valdivia, en actual XIV Región (Bravo, 1987).

En 1990 se determinaron niveles de organoclorados en leche materna proveniente de mujeres de la comuna de Cautín, Temuco (Campos, 1990); se hizo la misma investigación pero esta vez en la X Región, en las comunas de Osorno (Becerra, 1991), Lanco y San José de la Mariquina (Wistuba, 1991). Algunas de las investigaciones más nuevas datan de los años 1999 y 2000, respectivamente. En el primer estudio se determinaron los niveles de organoclorados en suelo

agrícola y productos agropecuarios de la comuna de Chonchi, y en la cual no se detectaron pesticidas organoclorados en ninguna de las muestras (Jerez, 1999); en la segunda investigación mencionada, se estudió la variación temporal de la concentración de organoclorados y metales pesados en el vertedero municipal de Valdivia (Palma *et al.*, 2000).

Más recientemente, se lograron determinar concentraciones de pesticidas organoclorados e hidrocarburos a niveles significativos en muestras de suelo de Chillán y Chillán Viejo (Henríquez *et al.*, 2006) y residuos de plaguicidas organoclorados en leche proveniente de la IX y X regiones (Barrientos, 2005; Moraleda, 2005). A excepción de estas últimas investigaciones, no existen estudios que muestren la situación actual de exposición a organoclorados por parte de la población del sur de Chile. Más precisamente, en las comunas de Lanco y San José, existe sólo una investigación, hecha en leche materna con una data de 20 años.

3.10. Situación legal actual en Chile con respecto a plaguicidas.

En Chile, los plaguicidas más utilizados se clasifican según su uso en herbicidas, insecticidas y fungicidas. Aquellos utilizados como insecticidas eran los que más intoxicaciones agudas causaban, y estaban en el segundo lugar de los plaguicidas que ingresaban a nuestro país entre los años 1995 y 1998 (MINSAL, 2000). Todos ellos pertenecían a la familia de los organofosforados, lo cual no es de extrañar después de las resoluciones del Ministerio de Agricultura (MINAGRI) en la década de los '80, que prohibían el uso de varios pesticidas organoclorados. Los primeros pesticidas organoclorados que quedaron con uso restringido fueron DDT, aldrín, endrín, dieldrín, clordano y heptacloro, mediante la Resolución N° 4 del Ministerio de Agricultura, en 1983.

Posteriormente, en el año 1984, se prohibió absolutamente la venta, fabricación, importación, distribución y uso del DDT, mediante la Resolución N° 639 del MINAGRI.

El uso, distribución, venta, fabricación e importación de los otros organoclorados se prohibió en el año 1987, con la resolución N° 2142, a excepción del aldrín, que se prohibió absolutamente en el año 1988, con la Resolución N° 2003.

Fue de conocimiento público la prohibición del lindano a fines del año 2007, por resolución del MINSAL. Lindano es considerado un COP por la ONU, y en Chile se usaba como tratamiento para la pediculosis y la escabiosis hasta el año 2007, aún cuando ya se había suspendido su uso en el sector agrícola.

A pesar de las resoluciones que prohibieron los pesticidas organoclorados en Chile hace ya varios años, investigaciones también relativamente recientes indican que la población chilena seguiría expuesta de manera crónica a estos compuestos, debido a la determinación de concentraciones en el ambiente que superan los límites máximos permitidos según la legislación chilena (Henríquez *et al.*, 2006; Jerez, 1999).

3.11. Planteamiento del problema

En la comuna de Lanco se han determinado anteriormente niveles de pesticidas organoclorados en leche materna que superan los límites máximos de residuos (LMR) según la norma chilena (mg de residuo/Kg base grasa láctea). En el trabajo de Wistuba (1991), se encontró DDT y metabolitos de éste, lindano, α y β -HCH, aldrín, dieldrín, entre otros. En los trabajos más nuevos, Moraleda (2005) informa de la presencia de heptacloro + heptacloro epóxido en el

100% de las muestras de leche UHT de las regiones IX y X, y también detectó la presencia de otros organoclorados como HCH, aldrín y dieldrín, mientras que Barrientos (2005) concluye que si bien las concentraciones promedio de pesticidas en muestras de leche cruda de las regiones IX y X cumplen con estar bajo el LMR según la norma chilena, a nivel de muestras individuales muchas de ellas están por sobre el nivel del LMR. Con estos antecedentes se pretende indagar acerca del actual nivel de exposición a residuos de pesticidas organoclorados esta vez en el suero de pacientes embarazadas.

3.12. Hipótesis

Teniendo en cuenta los antecedentes previos acerca de la presencia de pesticidas en el medio ambiente y alimentos en la comuna de Lanco, provincia de Valdivia, se plantea la siguiente hipótesis:

Las mujeres gestantes de la comuna de Lanco constituyen una población expuesta a los pesticidas organoclorados, presentando niveles detectables y cuantificables de estos compuestos en suero.

3.13. Objetivos

El presente trabajo tiene por objetivo general determinar el actual grado de exposición a pesticidas organoclorados de personas residentes en una comuna con actividad agrícola de la zona sur del país, específicamente de la XIV Región de Los Ríos mediante la identificación y cuantificación de estos compuestos en muestras de suero de mujeres en control de embarazo adscritas al hospital de la comuna de Lanco de la provincia de Valdivia durante el segundo semestre del 2008.

Y los siguientes objetivos específicos:

1. Extraer y concentrar los compuestos organoclorados a partir de 39 muestras de suero de la población en estudio por medio de la técnica de Microextracción en Fase Sólida (SPME).
2. Identificar compuestos organoclorados catalogados como disruptores endocrinos en muestras de suero de la población en estudio por Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas (GC-MS).
3. Cuantificar los niveles de estos xenobióticos en las muestras de suero de la población en estudio por Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas (GC-MS).

4. MATERIALES Y MÉTODOS.

El presente estudio se llevó a cabo en el Laboratorio de Química Orgánica Ambiental del Instituto de Ciencias Químicas, dependiente de la Facultad de Ciencias de la Universidad Austral de Chile.

4.1. Materiales.

4.1.1. Material de vidrio

- a) Viales de vidrio de 4mL con tapa rosca y septa de silicona/PTFE Supelco.
- b) Pipetas pasteur.
- c) Pipetas graduadas de 10mL grado B.
- d) Probetas de 100mL grado A.
- e) Vasos de precipitados de 25, 100 y 250mL.
- f) Jeringa de 10 μ L 70mm, SGE.

4.1.2. Equipos

- a) Cromatógrafo de gases Thermo Focus GC acoplado a espectrómetro de masas DSQ II
- b) Microfibra para SPME de polidimetilsiloxano (PDMS) 100 μ m Supelco.
- c) Agitador magnético con hot-plate.
- d) Computador Dell con software Xcalibur para control de métodos GC/MS
- e) Impresora Dell.
- f) Refrigerador marca LG modelo GM-343SC
- g) Software Epi info® versión 3.5.1.

h) Software SPSS® versión 11.5.

4.1.3. Reactivos y solventes

- a) Acetona nanogrado LiChroSolv® (Merck).
- b) Metanol nanogrado LiChrosolv® (Merck).
- c) n-hexano nanogrado LiChrosolv® (Merck).
- d) Ácido sulfúrico 96-99% LiChrosolv® (Merck).
- e) Pentacloronitrobenzeno (PCNB) 50µg/mL y 500µg/mL en metanol Supelco.
- f) Solución stock de pesticidas organoclorados de concentración promedio 20µg/mL en hexano, Supelco. Los pesticidas organoclorados que contiene son α -HCH, β -HCH, γ -HCH, δ -HCH, endrín, endrín aldehído, endrín cetona, aldrín, dieldrín, heptacloro, heptacloro epóxido, α -clordano, γ -clordano, endosulfán I, endosulfán II, endosulfán sulfato, p-p'-DDD, p-p'-DDE, p-p'-DDT y metoxicloro. Tetracloro meta-xileno y decaclorobifenilo se encuentran como estándares internos.
- g) Soluciones estándar preparadas a partir del stock de organoclorados con concentraciones promedio de 1, 5, 20, 80 150 y 200ng/mL.

4.2. Métodos.

El trabajo experimental está dividido en dos etapas: la etapa cualitativa, donde se identifican los picos cromatográficos y su orden de elución en las soluciones estándar y la etapa cuantitativa, donde se preparan las curvas de calibración y se cuantifican los analitos presentes en la muestra. En la primera etapa, se inyecta una solución stock de pesticidas organoclorados en el equipo GC-MS para obtener un cromatograma y espectros de masa para cada pico cromatográfico por el

método de ionización por electroimpacto (EI). Para obtener un espectro de masas que permita identificar un compuesto desconocido, se necesita programar un barrido llamado full scan, para que se registren todas las posibles masas entre un rango determinado de valores masa/carga (m/z). Este primer paso permite obtener el orden de elución de los diferentes pesticidas, pero se debe considerar que este orden de elución depende de las condiciones de la corrida cromatográfica, las cuales se señalan más adelante, y que deben mantenerse constantes durante todo el periodo que se realice el análisis.

La ionización química negativa (NCI) permite mejorar la sensibilidad del detector de masas, al disminuir el número de fragmentos generados, favoreciendo el valor de m/z correspondiente al peso molecular del compuesto (ión molecular). Es necesario entonces, obtener los espectros de masa para cada pico cromatográfico, que son distintos de los obtenidos por EI-full scan. En estos espectros se seleccionan valores de m/z que servirán para cuantificar y confirmar el analito en la muestra. Una vez seleccionados estas masas, se programa al espectrómetro de masas para que haga un barrido sólo de estas masas, despreciando cualquier otra que se genere en la fuente de ionización. Este modo de barrido, llamado single ion monitoring (SIM) permite aumentar aún más la sensibilidad del equipo.

En la segunda etapa, se preparan los estándares de calibración para hacer las curvas de calibración que permitirán la cuantificación de los analitos en la muestra.

4.2.1. Identificación de los picos cromatográficos de los compuestos organoclorados a analizar.

La identificación de los picos cromatográficos se llevó a cabo inyectando un microlitro ($1\mu\text{L}$) del stock de pesticidas organoclorados. La identificación de cada pico es por medio del pico base (BP

o base peak), del ión molecular, otros fragmentos característicos de cada compuesto en el espectro de masas y finalmente por comparación de espectros que se lleva a cabo con el programa Xcalibur usando la base espectral NIST. El modo de ionización en el espectrómetro de masas es el de electromomento, y se hace un barrido de todas las masas entre 50u y 650u (full scan), obteniéndose así un espectro de masas promedio en cada pico cromatográfico que puede ser comparado con la base de datos contenida en la librería NIST.

El cromatograma obtenido y el orden de elución de los analitos se muestran en ANEXOS 5 y 6.

4.2.2. Selección de las masas para el modo NCI-SIM.

Para seleccionar los valores de m/z característicos de cada pesticida organoclorado se recurrió a bibliografía y se examinó exhaustivamente los espectros obtenidos para cada pico cromatográfico en el modo NCI-full scan. Se requiere un valor de m/z para cuantificar (Quan m/z) el compuesto y otro para confirmar la identidad del compuesto (Qual m/z), ya que al aplicar el modo SIM con NCI, se obtiene un espectro de masas que no puede ser comparado con una base de datos. En este punto, la identificación se hace según Quan m/z y Qual m/z y el tiempo de retención, previamente determinado en los cromatogramas obtenidos por EI-full scan y NCI-full scan.

Los tiempos de retención del estándar interno (PCNB) y los demás pesticidas a analizar, y las masas seleccionadas para cuantificación (Quan m/z) y confirmación (Qual m/z) se muestran en el ANEXO 7.

4.2.3. Extracción de pesticidas organoclorados a partir del suero sanguíneo.

Para llevar a cabo esta extracción se aplicó la técnica de microextracción en fase sólida, SPME (del inglés solid-phase microextraction) desarrollada en 1990 por Janusz Pawliszyn y colaboradores (Arthur & Pawliszyn, 1990; Xiaofang *et al.*, 2005). La técnica fusiona las etapas de extracción y concentración de los analitos de la muestra en una sola etapa sin la utilización de solventes, permitiendo una reducción en la manipulación de la muestra y, a veces, evitar la etapa de clean-up de la muestra (Hernández *et al.*, 2002).

En la técnica SPME, los analitos se extraen a partir de una muestra líquida o gaseosa por medio la exposición de un polímero fijado a una fibra, en el cual se llevan a cabo procesos de absorción y/o adsorción, para posteriormente llevar dicha fibra al inyector de un cromatógrafo de gases donde los analitos pasan a la columna por desorción a alta temperatura (Pragst, 2007). Los analitos se distribuyen entre la fibra de SPME y la muestra hasta alcanzar un estado de equilibrio o hasta la saturación de la fibra, después de lo cual viene la desorción térmica en el inyector de un cromatógrafo de gases (Colón & Dimandja, 2004).

La microextracción en fase sólida fue aplicada en un primer momento a muestras acuosas ambientales con contenido de analitos orgánicos hidrofóbicos, volátiles y semivolátiles, pero en el último tiempo ha sido extendida a muestras biológicas como sangre, orina, jugo gástrico entre otros fluidos biológicos, por lo que actualmente esta técnica extractiva tiene amplias aplicaciones no tan sólo en el campo de la química orgánica ambiental, sino también en el campo de la toxicología ambiental y forense, donde se ha podido determinar fármacos como anfetaminas y benzodiazepinas y, pesticidas como los organoclorados y organofosforados (Page & Lacroix, 1997; Zeng & Noblet, 2002; Walles *et al.*, 2004; Pragst, 2007)

En comparación con las técnicas de extracción clásicas como la Líquido-Líquido o las más modernas como la SPE (solid-phase extraction), la SPME ofrece varias ventajas, como la de fusionar en un solo paso las fases de extracción y concentración de analitos (lo cual a su vez supone una reducción en la manipulación de la muestra y en el tiempo de procesamiento de la misma), la simplicidad de uso, la posibilidad de reusar la fibra de extracción y el ahorro de solventes, ya que SPME es una técnica que no necesita solventes para lograr la extracción (Pragst, 2007; Zeng & Noblet, 2002).

Existen varios aparatos de microextracción en fase sólida, como la fibra SPME, la jeringa de microextracción dinámica y el capilar para la in-tube SPME. El aparato usado en este trabajo fue la fibra SPME, que consiste en una fibra de sílica fundida recubierta por una fase estacionaria. Existen varios tipos de fase estacionaria, como polidimetilsiloxano (PDMS), poliacrilato (PA) y carbowax (CW) dentro de las que están en estado quasi-líquido, y polidivinilbenceno o carboxen dentro de las fases de partículas sólidas porosas embebidas en una fase líquida como PDMS o PA. La eficiencia de la extracción depende de la buena elección de la fibra con su respectivo recubrimiento, el cual debe tener un grosor adecuado y una determinada polaridad según los analitos que se deseen extraer (Pragst, 2007).

La fibra viene protegida por una vaina que permite atravesar tanto el septum del vial que contiene a la muestra como el septum del cromatógrafo, evitando así el rompimiento de la misma. La mecánica de extracción consiste en atravesar el septum del vial, desenvainar la fibra y exponerla a la muestra por un tiempo que debe ser optimizado. Después de eso, la fibra debe volver a ser envainada y ser colocada en el inyector del cromatógrafo donde es nuevamente desenvainada

para que los analitos extraídos sean desorbidos por evaporación y puedan así entrar a la columna cromatográfica (Pragst, 2007).

Existen al menos dos modalidades de SPME que se diferencian en la forma en que la fibra es expuesta a la muestra. La primera es llamada Direct immersion SPME (DI-SPME), o microextracción por inmersión directa, en la cual la fibra está inmersa directamente en una muestra líquida. Este método es desventajoso cuando la matriz es compleja, ya que las impurezas pueden saturar fácilmente la fibra, acortando la vida media de la misma y disminuyendo la eficiencia de la extracción. Para subsanar esta desventaja, existe la modalidad Headspace SPME (HS-SPME) o microextracción con espacio en cabeza, en la cual la fibra no es directamente expuesta a la muestra, sino que permanece en la fase vaporosa ubicada justo por sobre la muestra líquida. De esta manera, los analitos son extraídos a partir de la fase gaseosa, pero en este caso se requiere que dichos analitos sean volátiles o semivolátiles (Pragst, 2007). En el caso de la extracción de pesticidas organoclorados, la modalidad HS-SPME es adecuada dada la relativa volatilidad de estos compuestos, siendo las variables influyentes el volumen del espacio en cabeza, la temperatura y tiempo de extracción, la agitación, la fuerza iónica y la complejidad de la matriz, siendo crítica la presencia de proteínas en matrices biológicas, ya que estas son capaces de unir analitos presentes.

4.2.4. Origen de las muestras de suero sanguíneo.

Las 39 muestras de suero sanguíneo de las cuales se presume de la presencia de residuos de pesticidas organoclorados provienen de la comuna de Lanco, perteneciente a la Provincia de

Valdivia en la XIV Región de Los Ríos. Estas muestras corresponden a sueros de mujeres embarazadas de dicha comuna.

Antes del análisis, las muestras permanecieron almacenadas en un freezer a -20°C .

Para la optimización del método extractivo se utilizó un pool de 50 muestras de suero provenientes del Hospital Clínico Regional de Valdivia.

4.2.5. Selección de las condiciones de la microextracción en fase sólida.

El modo de microextracción en fase sólida seleccionado fue el de espacio en cabeza (headspace solid phase microextraction, o HS-SPME), que es pertinente para compuestos volátiles y semivolátiles como los pesticidas organoclorados que se analizan en este trabajo.

Para la muestra de suero, los pesticidas organoclorados estudiados y el tipo de microfibrilla para SPME utilizado (PDMS $100\mu\text{m}$), la técnica HS-SPME ha sido optimizada en varios trabajos de diversos autores, por lo cual, de los factores experimentales que influyen en una HS-SPME se estudiaron sólo el volumen del espacio en cabeza, la fuerza iónica y el tiempo de extracción. Los resultados de este análisis se muestran con sus respectivas gráficas en los ANEXOS 8 y 9, y tal como allí se puede observar, se obtienen buenas áreas de respuesta cuando se trabaja con un tiempo de extracción de 45min, un volumen de headspace de 3/5 y sin la necesidad de agregar NaCl. La cantidad y tipo de agente desproteinizante, el volumen y dilución de la muestra, el tiempo de pre-extracción y la temperatura a utilizar se tomaron del trabajo de Hernández y colaboradores, Beltrán y colaboradores y López y colaboradores (Beltran *et al.*, 2001;Hernández *et al.*, 2002;López *et al.*, 2007). En el trabajo de Waliszewski (2004), se listan los beneficios de la aplicación de ácido sulfúrico a diversas muestras (entre ellas sangre y suero) para el análisis de pesticidas organoclorados, entre ellos la eliminación de los ftalatos presentes en los contenedores

de plástico y puntas de las micropipetas, eliminación de lípidos y degradación de proteínas, todos los cuales interfieren durante la microextracción en fase sólida. Sin embargo, se advierte de la degradación de dieldrín, endrín, clordano y metoxicloro (Waliszewski *et al.*, 2004).

4.2.6. Tratamiento de la muestra.

Como era de esperar, muchas de las condiciones de trabajo son iguales a las utilizadas en otras investigaciones donde se han extraído compuestos organoclorados a partir de suero sanguíneo humano con microfibrilla de PDMS 100 μ m. Estas condiciones son las que se listan a continuación:

- Vial de 4mL con septa de silicona Thermogreen.
- Volumen de muestra de 500 μ L diluida con 1mL de agua destilada.
- Agente desproteinizante: 50 μ L de ácido sulfúrico 9M.
- Temperatura y tiempo de pre-extracción: 90°C y 30min.
- Tiempo de extracción: 45min
- Agitación: de tipo magnética y constante.
- Volumen del espacio de cabeza: 2,4mL (3/5 del vial)

El procedimiento para cada extracción fue el siguiente:

- Antes de iniciar una jornada de extracción de muestras, la microfibrilla de PDMS 100 μ m para SPME fue acondicionada en un inyector de un cromatógrafo Perkin Elmer a 250°C por 1 hora. Esto permite acondicionar y limpiar la microfibrilla de las impurezas que puedan estar adsorbidas.

- En un vial de 4mL se agregan 500 μ L de muestra de suero sanguíneo humano con micropipeta (100-1000 μ L). Luego, se agregan 50 μ L de estándar interno (PCNB 1 μ g/mL diluido en hexano y acetona) y los 50 μ L de H₂SO₄ 9M con micropipeta (10-100 μ L). El vial se tapa y se lleva a agitación en vórtex por 1min. A continuación, se añade 1mL de agua destilada medidos con micropipeta (100-1000 μ L) y se deja el vial en agitación magnética por 30min a 90°C. Se admite que después de este tiempo se ha establecido el equilibrio entre las fases líquida y gaseosa y se procede a introducir el aparato de SPME a través de la septa de goma del vial para llevar a cabo la extracción por 45min a 90°C. Pasado este tiempo, se lleva la microfibrilla al inyector del cromatógrafo, donde se lleva a cabo la desorción de los analitos por 5min a 250°C.
- La manipulación de muestras de suero se llevó a cabo bajo estrictas normas de bioseguridad, lo cual incluye el lavado quirúrgico de manos antes y después de la manipulación, el uso de guantes quirúrgicos, delantal y mascarilla. Los guantes y las mascarillas fueron cambiados tras cada experimento y botados a un basurero especialmente destinado para este tipo de desechos. El mesón de trabajo también fue lavado antes y después de la jornada laboral con alcohol y pañuelos desechables impregnados en cloruro de benzalconio. Las puntas de las pipetas fueron desechadas en frascos con NaOH concentrado y las muestras de suero tratadas fueron desechadas a otro frasco especialmente destinado y debidamente rotulado.

4.2.7. Análisis cromatográfico.

A) Condiciones del cromatógrafo.

El análisis de muestras y soluciones estándares se llevó a cabo en un cromatógrafo de gases Thermo Focus GC acoplado a un espectrómetro de masas DSQII. La temperatura del inyector fue de 250°C y se utilizó helio como gas de arrastre, con flujo constante de 1,2 mL/min. La separación de los analitos se llevó a cabo con una columna Rtx®-5MS (5% difenil 95% dimetilpolisiloxano) de 30m, 0.25mm I.D. y 0.25µm df. El programa de temperatura utilizado fue de 70°C por 4min y luego una rampa de 60°C/min hasta 300°C.

B) Condiciones del detector de masa.

El detector utilizado corresponde a un espectrómetro de masas DSQII, con un filtro de masas de cuadrupolo. La temperatura de la línea de transferencia (que conecta el GC con el MS) se fijó en 250°C. En la fuente de ionización, cuya temperatura se fijó en 300°C, la ionización del eluato que llega desde el GC se llevó a cabo por ionización química negativa (NCI) con un flujo de gas metano de 1,5mL/min y el barrido de las masas se realizó en el modo SIM (single ion monitoring) una vez que se determinó el orden de elución de cada uno de los analitos en el estándar.

C) Identificación de analitos en la muestra.

La identificación de los analitos presentes en la muestra se lleva a cabo de acuerdo a los tiempos de retención y masas seleccionadas en el modo SIM para cada analito. Los tiempos de retención, y las masas seleccionadas para identificar cada compuesto se aprecia en el ANEXO 1.

D) Cuantificación.

La cuantificación de los analitos en la muestra se realiza con el método de estándar interno. Las curvas de calibración de los pesticidas se pueden visualizar en los anexos. En general, se obtuvieron buenos coeficientes de determinación aún cuando se trató de una calibración multinivel, en las cuales la presencia de múltiples analitos suele generar interacciones que inciden sobre los coeficientes de determinación.

4.2.8. Tratamiento de los datos

Las concentraciones de cada muestra fueron coleccionadas y posteriormente, por medio del programa Excel, fueron promediadas para cada uno de los pesticidas encontrados. Por medio del mismo programa también se procedió a contabilizar el número de muestras positivas a algún tipo de pesticida, con lo cual se calculó el porcentaje de muestras positivas a cada pesticida y el porcentaje de muestras positivas a al menos un tipo de pesticida organoclorado. Por último, se calcularon las desviaciones estándar y los intervalos de confianza al 95% para cada uno de los pesticidas encontrados en este estudio.

También se estudiaron algunos aspectos concernientes a la muestra de las 39 madres gestantes del Hospital de Lanco utilizando el programa SPSS® V.11.5. En este ámbito, se tabularon las frecuencias de antecedentes de enfermedades en dicha muestra, que incluyen ovario poliquístico, hipotiroidismo, diabetes, obesidad y enfermedad reproductiva. También se calcularon algunos estadísticos de la edad de las pacientes englobadas en este estudio, como edad promedio, desviación estándar, edad máxima y mínima, etcétera. Los datos de nivel educacional, zona de residencia y número de embarazos previos al momento de ser encuestadas también fueron

recolectados y tabulados en tablas de frecuencias o gráficos. Por último, la dispersión de las concentraciones y las diferencias entre ellas también fue estudiada por medio del Test de Kruskal-Wallis utilizando el programa Epi-Info® V.3.51.

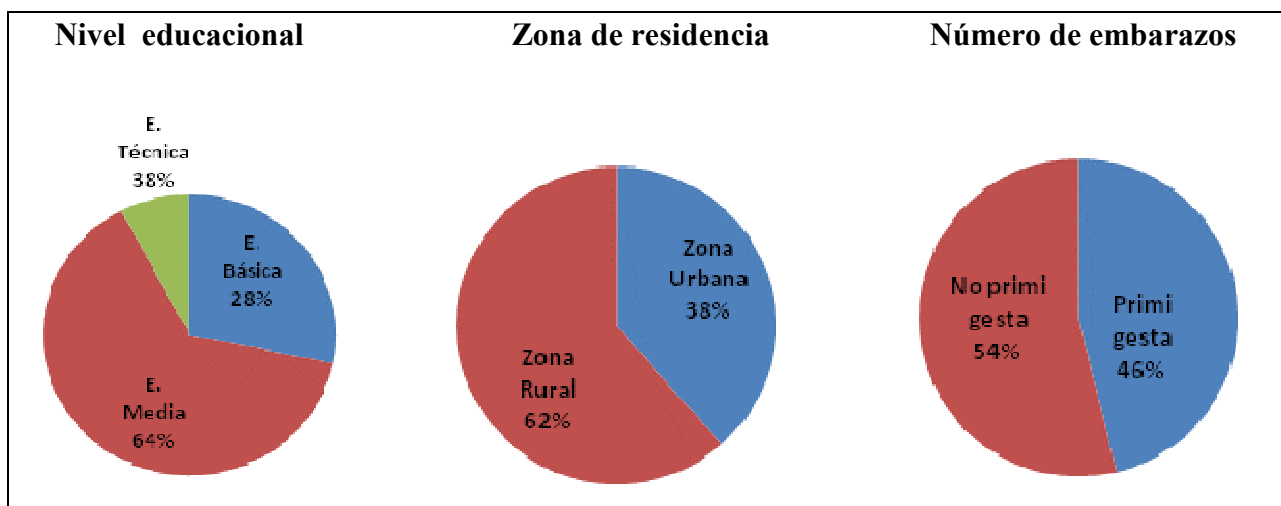
5. RESULTADOS.

La muestra en estudio estuvo formada por 39 mujeres gestantes adscritas al Hospital de Lanco durante el año 2008. La distribución de edades de las pacientes se muestra en el CUADRO 1, mientras que la FIGURA 1 muestra los porcentajes de personas que vivían en zona rural versus las que vivían en zona urbana en Lanco, el porcentaje de madres primigestas versus las que no lo eran, y la distribución porcentual según nivel educacional de esta muestra hacia el año 2008.

CUADRO 1. Media, mediana, desviación estándar y mínima y máxima edad de la muestra de madres gestantes adscritas al Hospital de Lanco (n=39) durante el año 2008 cuyo suero fue analizado para la detección de pesticidas organoclorados.

			Estadístico	Error típ.
EDAD	Media		25,26	1,018
	Intervalo de confianza para la media al 95%	Límite inferior	23,20	
		Límite superior	27,32	
	Mediana		24,00	
	Desv. típ.		6,357	
	Mínimo		16	
	Máximo		39	

FIGURA 1. Distribución porcentual de la muestra de mujeres gestantes adscritas al Hospital de Lanco (n=39) en el año 2008 según su nivel educacional, zona de residencia y número de embarazos.



Como se observa a continuación en el siguiente cuadro, en la muestra en estudio no hubo antecedentes importantes en cuanto a las enfermedades mostradas, esto es, ovario poliquístico, diabetes, obesidad, enfermedad reproductiva e hipotiroidismo.

CUADRO 2. Frecuencia de antecedentes de patologías encontradas en la muestra de mujeres gestantes del Hospital de Lanco (n=39) al momento de ser encuestadas en el período octubre-diciembre 2008.

Antecedentes de:		Recuento
Ovario poliquístico	N	36
	S	3
Diabetes	N	37
	S	2
Obesidad	N	31
	S	8
Enfermedad reproductiva	N	31
	S	8
Hipotiroidismo	N	39
	S	0

En los 39 especímenes de suero provenientes de la muestra de 39 madres gestantes del hospital de la comuna de Lanco extraídas en el año 2008, se logró detectar la presencia de los isómeros del hexaclorociclohexano α -HCH, β -HCH y γ -HCH (lindano), pero no se observó la presencia del isómero δ -HCH. De la familia de los ciclodienos pudo constatarse la presencia de endosulfán sulfato y heptacloro, pero extrañamente no de su metabolito hepatocloro epóxido. Por último, se observó la presencia de p,p'-DDT y su metabolito p,p'-DDE. Dado que el volumen de suero fue limitado, sólo una réplica de cada muestra fue analizada.

El siguiente cuadro muestra el porcentaje y número de muestras con presencia de residuos de pesticidas organoclorados y las respectivas concentraciones promedio.

CUADRO 3. Concentraciones promedio, desviaciones estándar y número de muestras positivas a los pesticidas detectados en muestras de suero proveniente de madres gestantes del Hospital de Lanco, año 2008 (n = 39).

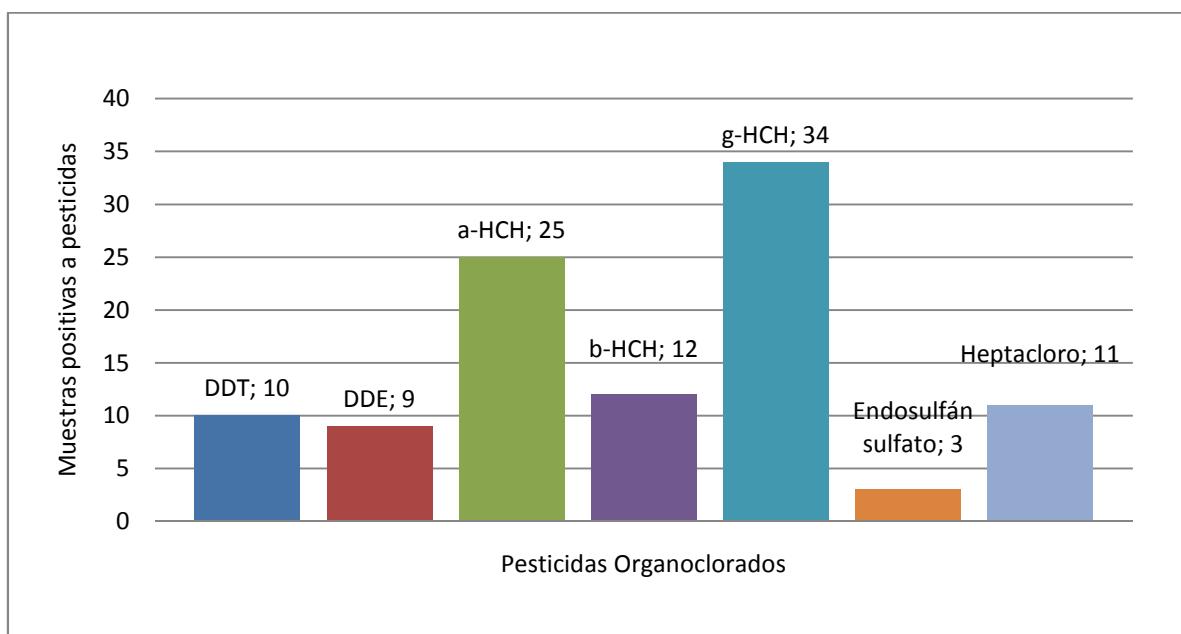
Derivados del difeniletano				
Compuesto	Cantidad de muestras positivas	Porcentaje de muestras positivas	Concentración media (ng/mL suero)	Desviación estándar (ng/mL suero)
p,p'-DDT	10	25,64%	3,031	0,523
p,p'-DDE	9	23,08%	4,080	2,048
Derivados del hexaclorociclohexano				
Compuesto	Cantidad de muestras positivas	Porcentaje de muestras positivas	Concentración media	Desviación estándar
α -HCH	25	64,10%	2,468	1,385
β -HCH	12	30,77%	1,289	0,701
γ -HCH	34	87,18%	2,042	0,314
Ciclodienos				
Compuesto	Cantidad de muestras positivas	Porcentaje de muestras positivas	Concentración media	Desviación estándar
Endosulfán sulfato	3	7,69%	1,666	0,546
Heptacloro	11	28,21%	3,176	3,717

De la totalidad de las muestras, sólo una de ellas contenía todos los pesticidas encontrados, esto es, α -HCH, β -HCH, γ -HCH, heptacloro, endosulfán sulfato, DDT y DDE, mientras que sólo tres muestras no contenían ninguno de los pesticidas organoclorados englobados en este estudio a una concentración detectable por el método. Por lo tanto, se debe decir que del total de las muestras (n = 39), un 92,31% de ellas contenía algún tipo de pesticida, ya sea todos o alguno de las siete clases detectadas y cuantificadas.

La gráfica siguiente muestra la frecuencia con la cual cada pesticida fue encontrado en las muestras. Como puede observarse, el pesticida más frecuentemente detectado fue el isómero gamma del hexaclorociclohexano, más conocido como lindano. El isómero alfa del HCH fue el

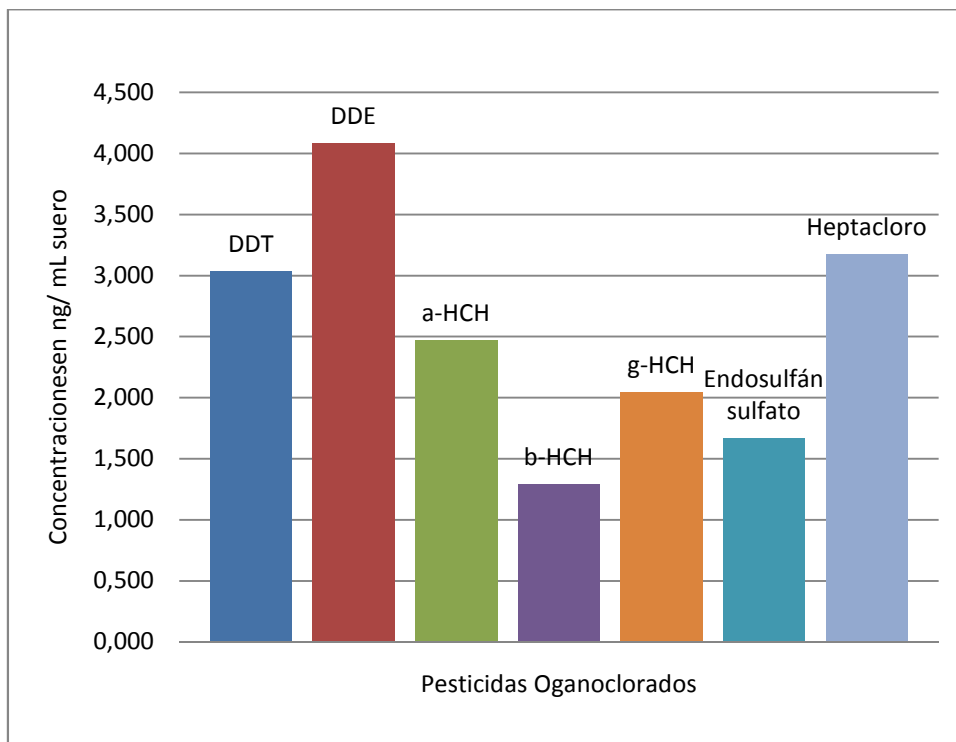
segundo más frecuente entre las 39 muestras analizadas, mientras que los demás pesticidas tuvieron una frecuencia similar, siendo más notablemente bajo el endosulfán sulfato.

FIGURA 2. Gráfico de frecuencia de muestras de suero provenientes de una muestras de madres gestantes adscritas al Hospital de Lanco (n=39) del año 2008 positivas a algún tipo de pesticida organoclorado.



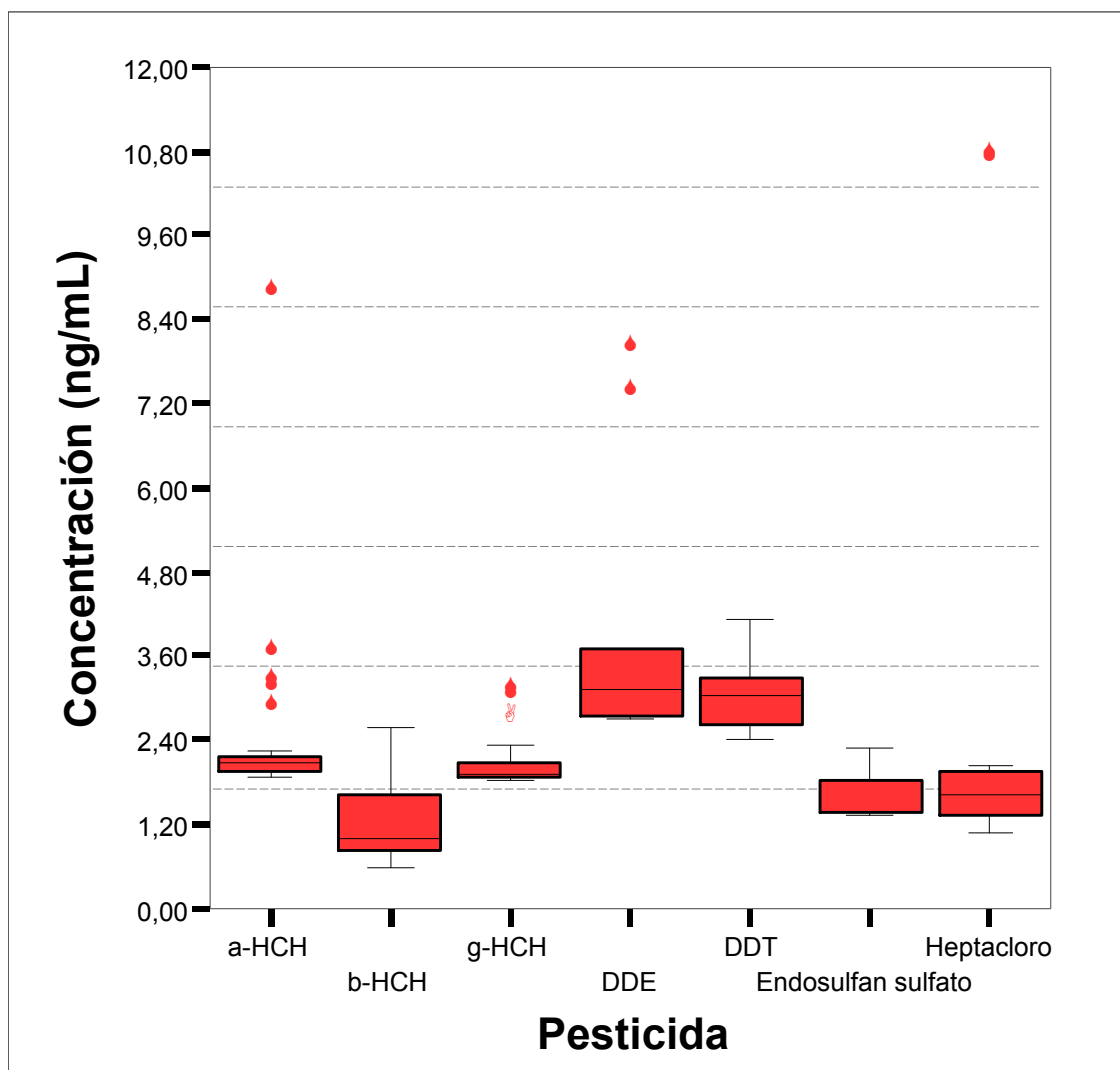
Las concentraciones promedio de algunos de los siete pesticidas encontrados en las muestras son diferentes entre sí (Test de Kruskal Wallis, $p < 0,05$, ANEXO 12).

FIGURA 3. Gráfica de concentraciones promedio de pesticidas organoclorados en las muestras de suero provenientes de la muestra de mujeres gestantes del Hospital de Lanco (n=39), año 2008.



En la siguiente gráfica (FIGURA 4) se visualiza la dispersión de los valores de concentración de pesticidas en ng/mL de suero.

FIGURA 4. Dispersión de las concentraciones en las muestras de suero provenientes de mujeres gestantes del Hospital de Lanco (n=39), año 2008.



Como se observa en esta gráfica, las concentraciones mayormente dispersas se hallaron para los pesticidas β -HCH y p,p'-DDT. A simple vista se observa que en el caso del β -HCH el 50% de las muestras positivas y con concentraciones mayores o iguales a la mediana tuvieron una dispersión mucho mayor que el otro 50% que presentó concentraciones iguales o un poco menores que mediana. En el caso de α -HCH y γ -HCH, las concentraciones tienen una dispersión mucho menor

y permanecieron cercanas a la mediana (medianas de 2,064 y 1,912 ng/mL, respectivamente). Se infiere, a partir de la gráfica, análisis similares para el resto de los pesticidas analizados.

El cuadro siguiente muestra los intervalos de confianza al 95% de las concentraciones de pesticidas encontrados. Estos intervalos de confianza indican el rango de concentraciones que se encontraban en la población gestante de Lanco hacia el año 2008 con una probabilidad del 95%.

CUADRO 4. Intervalos de confianza del 95% para las concentraciones de pesticidas organoclorados encontrados en muestras de suero provenientes de madres gestantes adscritas al Hospital de Lanco (n=39) del año.

	a-HCH	b-HCH	g-HCH	DDT	DDE	Endosulfán sulfato	Heptacloro
Intervalo de confianza 95%	±0,571	±0,445	±0,109	±0,374	±1,577	±1,355	±2,500
Límite superior	3,040	1,735	2,152	3,405	5,654	3,022	5,673
Límite inferior	1,896	0,843	1,933	2,657	2,506	0,310	0,678

6. DISCUSIÓN

La metodología utilizada en este estudio (SPME y sus condiciones de extracción) ha sido aplicada por otros autores con obtención de resultados similares a los obtenidos en este trabajo. Así, por ejemplo, en la determinación de pesticidas organoclorados de 15 muestras de suero sanguíneo de agricultores de la provincia de Castellón, España, se determinaron pesticidas como p,p'-DDE a concentraciones entre 1,6 y 29 ng/mL mientras que p,p'-DDT se detectó a concentraciones cercanas al límite de detección de 5 ng/mL (Beltran *et al.*, 2001). En otros trabajos se han obtenido concentraciones tan bajas como las determinadas en esta tesis, pero las técnicas analíticas utilizadas implican pasos adicionales de clean-up y uso de solventes que aumentan la manipulación de la muestra y la cantidad requerida de ésta para su tratamiento (Pitarch *et al.*, 2003;Voorspoels *et al.*, 2002).

La determinación de clordano no se pudo llevar a cabo debido al método extractivo utilizado. Se sabe que en un medio fuertemente ácido los compuestos endrín, dieldrín, clordano y metoxicloro se degradan, mientras que los otros pesticidas analizados en este trabajo son resistentes al ácido sulfúrico (Waliszewski *et al.*, 2004). En el ANEXO 9, por ejemplo, se observa claramente que el clordano disminuye su área de pico cromatográfico a mayores tiempo de extracción porque se degrada. En cuanto al endrín, este no apareció con un pico cromatográfico distinguible en los cromatogramas obtenidos durante los experimentos, lo que indicaría que es completamente degradado debido al tratamiento de la muestra. El metoxicloro, por otro lado, generalmente es difícil de detectar en las matrices biológicas porque es un compuesto poco persistente que se degrada en poco tiempo en el organismo de los seres vivos. Por último, el dieldrín fue un caso complicado de estudiar puesto que su pico cromatográfico se superponía con el del DDE, lo cual

se llama coelución. Sin embargo, ambos se diferencian por su ión de cuantificación, ya que el m/z 237 del dieldrín está ausente en el espectro de masa del DDE. Así se logró separar ambos picos, pero finalmente se constató que dicho pico cromatográfico estuvo ausente en cualquiera de los cromatogramas correspondientes a las muestras.

La frecuencia y tipo de pesticidas hallados en las muestras de suero difieren de aquellos encontrados por otros autores en muestras de leche materna o leche de consumo humano dentro de la antigua X región. En el presente estudio, la FIGURA 2 y el CUADRO 3 muestran que la mayor frecuencia de aparición la tuvieron los isómeros del HCH. En la determinación de residuos organoclorados llevada a cabo con muestras de leche UHT provenientes de la IX y X regiones, la mayor incidencia en las muestras la tiene el heptacloro y su epóxido, que aparece en el 100% de los casos, mientras que lindano, α -HCH y β -HCH tiene un grado de incidencia menor (Moraleda, 2005). Esta situación se atribuye a que la legislación para lindano y sus isómeros es diferente en el sector agrícola con respecto al sector salud, donde cabe destacar que el lindano para uso medicinal aún está vigente en Chile.

Las concentraciones calculadas en ng/mL de suero en este trabajo no son relacionables a las encontradas en trabajos anteriores realizados dentro de la provincia de Valdivia, donde las concentraciones han sido dadas en mg/Kg grasa láctea. Sin embargo, se puede afirmar que los pesticidas hallados en años anteriores son básicamente los mismos que los encontrados actualmente en esta tesis.

Las concentraciones promedio encontradas en este estudio son más altas para los mismos pesticidas analizados en otro estudio hecho en muestras de leche materna provenientes de las comunas de Lanco y San José. Wistuba (1991) encontró que la mayor concentración promedio en las muestras de leche materna provenientes de mujeres en periodo de lactancia de la comuna de

Lanco correspondían a las de p,p'- DDT y metabolitos, seguido de heptacloro. La concentración promedio de DDT encontrada en esas muestras fue de 3,577 mg/Kg grasa láctea, seguido de heptacloro + heptacloro epóxido, que fue de 0,819 mg/Kg grasa láctea. Estos resultados son concordantes con el actual trabajo presentado, ya que como muestra la FIGURA 3 y el CUADRO 3, la mayor concentración promedio correspondió al p,p'-DDT y a su metabolito p,p'-DDE, con 3,024 y 4,117ng/mL de suero, respectivamente, seguido de heptacloro con una concentración promedio de 3,176 ng/mL de suero.

Existen antecedentes de la amplia difusión que tuvo el DDT en años pasados en la zona sur y específicamente en la X Región. En un trabajo llevado a cabo por Montes *et al.* (1986), el 97% de las muestras de carne recolectadas en la X Región aparecieron contaminadas con metoxicloro, mientras que el DDT se encontró en un 89,4% de las muestras. También existe otro trabajo que aporta antecedentes de la alta difusión de los pesticidas heptacloro y lindano, encontrándose que en muestras de leche de vaca provenientes de la provincia de Valdivia, estos pesticidas mostraban un alto porcentaje de muestras que estuvieron sobre el límite máximo de residuo (LMR). En dicho trabajo también se pudo constatar que endrín y aldrín + dieldrín estaban presentes en las muestras de leche en concentraciones objetables según la norma chilena, con valores \bar{X}/LMR mayores a 1, y que DDT y lindano estuvieron presentes en aproximadamente un 90 u 80% de las muestras (Pinto *et al.*, 1990).

En lo que respecta a la situación puntual de la comuna de Lanco, Wistuba (1991) señala al DDT y metabolitos, Aldrín + Dieldrín, Heptacloro + Heptacloro epóxido y los isómeros α -HCH y β -HCH, como los contaminantes de mayor importancia en la población. Este perfil coincide hasta cierto punto con los resultados obtenidos en este trabajo, donde los resultados muestran que los contaminantes actuales a los cuales la población de Lanco está expuesta son el DDT y el DDE,

los isómeros del HCH y el heptacloro. El CUADRO 3 muestra también que la desviación estándar del heptacloro fue la más alta, y para este pesticida se encontraron concentraciones séricas tan bajas como 1,081 ng/mL y tan altas como 10,682 ng/mL.

Aunque altas en comparación con los otros pesticidas, las concentraciones extremadamente bajas de los pesticidas p,p'-DDT y p,p'-DDE eran esperables después de que el DDT fuera prohibido por el Ministerio de Agricultura hacia 1984. Sin embargo, el hecho de que casi todas las muestras tuvieran p,p'-DDT y p,p'-DDE simultáneamente es una muestra clara de la persistencia que poseen estos compuestos. En general, según lo expuesto en diversos trabajos de investigación, la presencia de DDE en matrices y fluidos biológicos es indicativa del consumo de alimentos de origen animal contaminados y/o a una exposición de DDT que data desde hace mucho tiempo (Ludwiki & Goralczyk, 1994; Waliszewski *et al.*, 2002). En la Región de los Ríos, existen datos al respecto, que informan la presencia de residuos de pesticidas organoclorados en carnes y leche, y además, más precisamente en Lanco, se ha determinado que la leche materna tenía la concentración promedio más alta correspondiente a DDT y metabolitos. Los resultados obtenidos en este trabajo muestran concentraciones extremadamente bajas de estos pesticidas, pero dado que en cada escalón de la cadena alimentaria estos compuestos persistentes además son bioconcentrados, es normal que se determinen niveles trazas aunque hayan sido prohibidos hace mucho tiempo después de un largo periodo de uso y abuso de ellos. Además, parte de estas concentraciones trazas pueden estar siendo introducidas actualmente debido al uso de otro pesticida organoclorado análogo del DDT, llamado Dicofol. Este último pesticida ha sido restringido en otros países debido a que es un producto que contiene trazas de DDT (el compuesto se sintetiza por hidroxilación del DDT, lográndose un compuesto menos tóxico) (RAP Chile, 2011).

Los resultados de este trabajo también muestran que aldrín no son importante en cuanto a su frecuencia de aparición y a su concentración, y no fue detectado. Esto podría indicar que este pesticida ha quedado en desuso y que la legislación chilena ha surtido efecto después del retiro y prohibición de estos pesticidas hacia 1985. Sin embargo, este compuesto es altamente liposoluble ($\text{LogKow} = 6.5$) y probablemente sería detectado en tejido adiposo considerando el alto grado de exposición que existía hace algunos años atrás.

Las muestras con presencia de hexaclorociclohexano también mostraron concentraciones muy bajas, pero se observa que el porcentaje de muestras positivas es mucho mayor que aquellas positivas a DDT, DDE o ciclodienos. Con respecto al trabajo realizado por Wistuba (1991) con muestras de leche materna de Lanco, se observa que los isómeros del HCH tienen ahora una mayor frecuencia de aparición. Esto se explica aceptando que la población chilena en general ha estado expuesta a lindano y sus isómeros desde siempre. La prohibición del lindano técnico fue ordenada por medio de la resolución N° 2.180 de 1998 del SAG; esta resolución prohibió la importación, venta y distribución del lindano para uso agrícola. En el año 2009, la resolución exenta N° 3.635 del ISP establece la cancelación de los registros sanitarios que contienen en su formulación el principio activo lindano. Con esto, se retiraron del mercado muchos productos que se vendían en farmacias para el tratamiento de la pediculosis y escabiosis. Sin embargo, en el mismo año, la resolución N° 4.398 deja sin efecto a la anterior, por lo que la población ha seguido teniendo acceso a esta clase de productos.

Las concentraciones de HCH encontradas en este trabajo son de importancia toxicológica, puesto que existe un trabajo que logró establecer cierta relación entre el riesgo de padecer la enfermedad de Parkinson y niveles de β -HCH determinados en suero sobre un límite de detección de entre 100 y 150 pg/mL (Richardson *et al.*, 2009). Las concentraciones halladas en este trabajo superan

por mucho dicho límite. El dieldrín también ha sido relacionado con la enfermedad de Parkinson (Patnaik, 2007a), pero en este trabajo dicho pesticida no fue detectado.

Las concentraciones de α -HCH y β -HCH se explican debido a que si el lindano técnico ha seguido siendo usado en la agricultura, contiene porcentajes considerables de estos isómeros aparte del lindano mismo (γ -HCH). Además, los productos farmacéuticos vendidos en la actualidad a base de lindano son un 99% puros, lo cual implica también la presencia de trazas de otros isómeros del γ -HCH en dichos preparados. La hematotoxicidad del lindano ha sido estudiada en unidades formadoras de colonias de macrófagos y granulocitos (CFU-MG) y los resultados indican que las células humanas son unas 100 veces más sensibles a los efectos de lindano que células similares de ratas. Concentraciones mayores a $0,2\mu\text{g/mL}$ son capaces de matar a células progenitoras humanas lo que explicaría las anormalidades hematológicas como leucopenia, granulocitopenia y otras que se han reportado en casos de exposición ocupacional a lindano (Parent-Massin & Thouvenot, 1993).

La retirada del lindano para uso agrícola se justifica tomando en cuenta la persistencia de este compuesto en los animales y en la leche materna, además de que se ha probado que es carcinogénico para los animales (Patnaik, 2007a). Sin embargo, no está claramente probado que sea genotóxico y se requiere más investigación para determinar sus potenciales efectos disruptores endocrinos.

Hasta ahora, en Chile no se habían hecho estudios de determinación cuantitativa de niveles de pesticidas organoclorados en sangre o suero, y tampoco existen límites máximos de residuos en sangre humana. La importancia de tales determinaciones radica en el efecto disruptor endocrino que muchas de estas sustancias pueden tener a concentraciones extremadamente bajas. En poblaciones de otros lugares del mundo se han determinado los niveles séricos de pesticidas

organoclorados y se han tratado de relacionar con enfermedades de disrupción endocrina. En una de estas tantas investigaciones se ha encontrado que concentraciones tan bajas como 2.0 a 19.1 ng/mL de suero de DDE se correlacionan con un mayor riesgo de cáncer de mama (Charlier *et al.*, 2003a). En este trabajo, se encontró una concentración promedio de DDE 4.1 ng/mL y una concentración promedio de 3.5 ng/mL en DDT + DDE. Estas concentraciones podrían ser correlacionables con el riesgo de cáncer en la población de mujeres gestantes de Lanco y las implicancias que esto podría tener en el desarrollo de sus hijos.

La presencia de endosulfán sulfato en concentraciones muy bajas y en un bajo porcentaje de muestras invita a pensar que este compuesto ha quedado en desuso o su uso ha sido de una magnitud mucho menor (Endosulfán no ha sido prohibido hasta ahora por alguna resolución del MINAGRI). Por lo tanto, los niveles detectados de este compuesto en las muestras puede deberse simplemente a la gran persistencia que tienen estos en el ser humano y en el ambiente. Con los datos actuales que se tienen en este trabajo no se pueden sacar mayores conclusiones al respecto.

La importancia de los ciclodienos endosulfán sulfato y heptacloro en disrupción endocrina es menor que la que tiene el dieldrín, uno de los ciclodienos más persistentes vistos jamás. En el caso del heptacloro, existe alguna evidencia de que puede estar involucrado como factor de riesgo en la etiología de la enfermedad de Parkinson, al comprobarse experimentalmente que la exposición a heptacloro de ratones hembras en periodo de gestación y lactación resulta en ratones hijos con un aumentado nivel del transportador de dopamina (DAT), transportador vesicular de monoamina 2 (VMAT2) y sus respectivos mRNAs. Además, se observó que la administración de un inductor de la enfermedad llamado N-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina condujo a una mayor pérdida de la dopamina estriatal en ratones expuestos durante el período de desarrollo que aquellos que no sufrieron dicha exposición durante su periodo de desarrollo intrauterino y de

lactación. Además, se observó que el daño en las vías dopaminérgicas fue mayor en los machos que en las hembras, todo lo cual sugiere que el heptacloro es un factor predisponente al Parkinson más importante en el género masculino que en el femenino (Richardson *et al.*, 2008).

Es particularmente extraño que en el presente trabajo no se haya detectado la presencia de heptacloro epóxido, el metabolito más persistente del heptacloro sobretodo cuando la exposición data desde hace mucho tiempo. Es probable que dicho metabolito pueda ser detectado en tejido adiposo, puesto que la gran lipofiliidad del compuesto hace que se almacene principalmente en la grasa ($\text{LogKow} = 5.4$). El heptacloro epóxido es un disruptor endocrino que ha sido fuertemente relacionado con el síndrome metabólico y la resistencia a la insulina en población no diabética y a las criptorquidias en los hijos de madres anteriormente expuestas a dicho compuesto (Park *et al.*, 2010; Pierik *et al.*, 2007).

Como conclusiones finales de este trabajo, se puede decir que se determinaron concentraciones a nivel de trazas de los pesticidas p,p'-DDT, p,p'-DDE, isómeros α , β y γ del hexaclorociclohexano y dos tipos de ciclodienos, endosulfán sulfato y heptacloro, lo cual está en concordancia con la hipótesis planteada. Dado que la muestra constituida por madres gestantes de la comuna de Lanco ha sido tomada al azar, es representativa de dicha localidad y se puede afirmar que la población gestante de la comuna de Lanco constituía una población expuesta hacia el año 2008 a estos siete pesticidas organoclorados detectados y cuantificados.

La ausencia de clordano, endrín, dieldrín y metoxicloro en las muestras son atribuibles al método utilizado para la extracción, donde el medio ácido los degrada por completo. La determinación de estos pesticidas merece un tratamiento de la muestra completamente nuevo.

Como proyecciones finales de este trabajo, cabe destacar el hecho de que el método usado para la determinación de pesticidas organoclorados es adecuado al menos para los pesticidas resistentes

al ácido sulfúrico, por lo que a futuro es aplicable a otras muestras de suero sanguíneo cuyos niveles o concentraciones podrán detectarse a nivel de trazas.

7. BIBLIOGRAFÍA CITADA

1. Albert, L. (1981). Residuos de plaguicidas organoclorados en leche materna y riesgo para la salud. *Bol Of Sanit Panam*, **91**, 15-29.
2. Albert, L & Rendón-von Osten, J. (1988). Contaminación por compuestos organoclorados en algunos alimentos procedentes de una ciudad de México. *Rev Saúde publ , S Paulo*, **2**, 500-506.
3. Alexander, FE, Patheal, SL, Biondi, A, Brandalise, S, Cabrera, ME, Chan, LC, Chen, Z, Cimino, G, Cordoba, JC, Gu, LJ, Hussein, H, Ishii, E, Kamel, AM, Labra, S, Magalhaes, IQ, Mizutani, S, Petridou, E, de Oliveira, MP, Yuen, P, Wiemels, JL & Greaves, MF. (2001). Transplacental Chemical Exposure and Risk of Infant Leukemia with MLL Gene Fusion. *Cancer Research*, **61**, 2542-2546.
4. Álvarez, M, Ribas, M, Torrent, M, Carrizo, D, García, R, Grimalt, J & Sunyer, J. (2008). Thyroid disruption at birth due to prenatal exposure beta-hexachlorocyclohexane. *Environ Int*, **34**, 737-740.
5. Argemi, F, Cianni, N & Porta, A. (2005). Disrupción endocrina: perspectivas ambientales y salud pública. *Acta Bioquim Clín Latinoam*, **39**, 291-300.
6. Arthur, C & Pawliszyn, J. (1990). Solid phase microextraction with thermal desorption using fused silica optical fibers. *Analytical Chemistry*, **62**, 2145-2148.

7. Ballantyne, B & Marrs, T. (2004). Pesticides: an overview of fundamentals. In *Pesticide toxicology and international regulation*. ed. Marrs, T. & Ballantyne, B. pp. 1-23. John Wiley & Sons.
8. Barrientos, A. (2005). Presencia de residuos de plaguicidas organoclorados en leche cruda de plantas lecheras de la IX y X regiones. Escuela de Ingeniería en alimentos. Facultad de Ciencias Agrarias. Univ. Austral de Chile. 65pp.
9. Becerra, O. (1991). Determinación de pesticidas organoclorados en leche materna de la provincia de Osorno. Tesis Escuela de Medicina Veterinaria, Facultad de Cs. Veterinarias, Universidad Austral de Chile.
10. Beltran, J, Pitarch, E, Egea, S, López, F & Hernández, F. (2001). Gas chromatographic determination of selected pesticides in human serum by head-space solid-phase microextraction. *Chromatographia*, **54**, 757-763.
11. Bergel, N. (2004). Estimación del destino ambiental de los pesticidas empleados en sistemas agroforestales de la cuenca del estero Peupeu, comuna de Lautaro, IX Región. Escuela de ciencias ambientales, Facultad de ciencias: Universidad Católica de Temuco, 135pp.
12. Borghini, F, Grimalt, J, Sánchez-Hernández, J & Bargabli, R. (2005). Organochlorine pollutants in soils and mosses from Victoria land (Antarctica). *Chemosphere*, **58**, 271-278.

13. Bravo, S. (1987). Residuos de pesticidas organoclorados en leches de rebaños de la provincia de Valdivia. Tesis Escuela de Medicina Veterinaria, Facultad de Cs. Veterinarias, Universidad Austral de Chile..
14. Britt, J. (2000). Properties and effects of pesticides. In *Principles of toxicology: environmental and industrial applications*. ed. William, P., James, R. & Roberts, S. John Wiley & Sons, Inc.: New York.
15. Calva, L & Torres, M. (1998). Plaguicidas organoclorados. *ContactoS*, **30**, 35-46.
16. Campos, M. (1990). Residuos de pesticidas organoclorados en leche materna de la provincia de Cautín, Temuco. Tesis Fac. de Ing. y Administración, Universidad de la Frontera..
17. Casida, J & Quistad, G. (1998). Golden age of insecticide research: past, present, or future? *Annu Rev Entomol*, **43**, 1-16.
18. Charlier, C, Albert, A, Herman, P, Hamoir, E, Gaspard, U, Meurisse, M & Plomteux, G. (2003a). Breast cancer and serum organochlorine residues. *Occupational and Environmental Medicine*, **60**, 348-351.
19. Charlier, C, Desai, C & Plomteux, G. (2002). Human exposure to endocrine disrupters: consequences of gastroplasty on plasma concentration of toxic pollutants. *Int J Obes Relat Metab Disord*, **26**, 1465-1468.

20. Charlier, C, Dubois, N, Cucchiaro, S & Plomteux, G. (2003b). Analysis of Polychlorinated Biphenyl Residues in Human Plasma by Gas ChromatographyMass Spectrometry. *Journal of Analytical Toxicology*, **27**, 74-77.
21. Charlier, C & Plomteux, G. (2002a). Determination of organochlorine pesticide residues in the blood of healthy individuals. *Clin Chem Lab Med*, **40**, 361-364.
22. Charlier, C & Plomteux, G. (2002b). [Endocrine disruption and organochlorine pesticides]. *Acta Clin Belg Suppl*, 2-7.
23. Cheremisinoff, NP & King, JA. (1994). *Toxic properties of pesticides*. Marcel Dekker, Inc.: New York.
24. Chevrier, J, Dewailly, E, Ayotte, P, Mauriege, P, Despres, JP & Tremblay, A. (2002). Body weight loss increases plasma and adipose tissue concentrations of potentially toxic pollutants in obese individuals. *Int J Obes Relat Metab Disord*, **24**, 1272-1278.
25. Chhabra, R. (1979). Intestinal absorption and metabolism of xenobiotics. *Environ Health Perspect*, **33**, 61-69.
26. Colón, I & Dimandja, JM. (2004). High-throughput analysis of phthalate esters in human serum by direct immersion SPME followed by isotope dilution-fast GC/MS. *Analytical & Bioanalytical Chemistry*, **380**, 275-283.
27. Cope, WG. (2010). Exposure classes, toxicants in air, water, soil, domestic and occupational settings. In *A textbook of modern toxicology*. ed. Hodgson, E. pp. 31-48. John Wiley & Sons. Inc.: Raleigh, North Carolina.

28. Costa, L. (2008). Toxics effects of pesticides. In *Casarett & Doull's Toxicology The Basic Science of Poisons*. ed. Klaassen, C. pp. 883-930. McGraw Hill: New York.
29. Costabeber, I & Emanuelli, T. (2002). Influencia de hábitos alimentarios sobre las concentraciones de pesticidas organoclorados en tejido adiposo. *Cien Tecnol Aliment , Campinas*, **22**, 54-59.
30. Cravedi, J, Zalko, D, Savouret, J, Menuet, A & Jégou, B. (2007). [The concept of endocrine disruption and human health]. *Med Sci (Paris)*, **23**, 198-204.
31. Donnewald, H, Astolfi, E, Beliera, J, García, J & Fontana, I. (1976). Plaguicidas organoclorados en grasa de pingüinos papua. *Biol Plag*, **15**, 15-17.
32. El-Shahawi, MS, Hamza, A, Bashammakh, AS & Al-Saggaf, WT. (2010). An overview on the accumulation, distribution, transformations, toxicity and analytical methods for the monitoring of persistent organic pollutants. *Talanta*, **80**, 1587-1597.
33. Falck, F, Ricci, A, Wolff, M, Godbold, J & Deckers, P. (1992). Pesticides and polychlorinated biphenyl residues in human breast lipids and their relation to breast cancer. *Archives of Environmental Health*, **47**, 143-146.
34. Fernández, L, Ponce, G, Calva, L, Salgado, I, Botello, A & Díaz, G. (2008). Organochlorine pesticides in lacustrine sediments and tilapias of Metztlán, Hidalgo, Mexico. *Revista de Biología Tropical*, **56**, 1381-1390.

35. Fernández, M, Olmos, B & Oléa, N. (2007). Exposición a disruptores endocrinos y alteraciones del trato urogenital masculino (criptorquidia e hipospadias). *Gac Sanit*, **21**, 500-514.
36. Fernícola, N. (1985). Toxicología de los insecticidas organoclorados. *Bol Of Sanit Panam*, **98**, 10-19.
37. Fowler, P, Abramovich, D, Haites, N, Cash, P, Groome, N, Al-Qahtani, A, Murray, T & Lea, R. (2007). Human fetal testis Leydig cell disruption by exposure to the pesticide dieldrin at low concentrations. *Human Reproduction*, **22**, 2919-2927.
38. Granada, E. (2006). Estimación de la exposición neonatal a pesticidas organoclorados, disruptores endocrinos. Tesis doctoral, Universidad de Granada, 203 p.
39. Haley, T. (1956). The insecticides: The hazard in industry and in the home. *California Medicine*, **84**, 258-264.
40. Henríquez, M, Becerra, J, Barra, R & Rojas, J. (2006). Hydrocarbons and organochlorine pesticides in soils of the urban ecosystem of Chillán and Chilán Viejo, Chile. *J Chil Chem Soc*, **51**, 938-944.
41. Hermosilla, C. (1989). Determinación de pesticidas en leche materna proveniente de la provincia de Valdivia. Tesis Escuela de Med. Veterinaria, Fac. de Cs. Veterinarias, Universidad Austral de Chile.

42. Hernández, F, Pitarch, E, Beltran, J & López, FJ. (2002). Headspace solid-phase microextraction in combination with gas chromatography and tandem mass spectrometry for the determination of organochlorine and organophosphorus pesticides in whole human blood. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, **769**, 65-77.
43. Hoppin, J, Tolbert, P, Brock, J, Korrick, S, Altshul, L, Zhang, R, Bracci, P, Burse, V & Needham, L. (2000). Pancreatic cancer and serum organochlorine levels. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*, **9**, 199-205.
44. Hoyer, AP, Grandjean, P, Jorgensen, T, Brock, J & Hartvig, HB. (1998). Organochlorine exposure and risk of breast cancer. *Lancet*, **352**, 1816-1820.
45. Hue, O, Marcotte, J, Berrigan, F, Simoneau, M, Dorq, J, Marceau, P, Marceau, S, Tremblay, A & Teasdale, N. (2007). Plasma concentration of organochlorine compounds is associated with age and not obesity. *Chemosphere*, **67**, 1463-1467.
46. Jakszyn, P, Goñi, F, Etxeandia, A, Vives, A, Millán, E, López, R, Amiano, P, Ardanaz, E, Barricarte, A, Chirlaque, MD, Dorronsoro, M, Larrazaga, N, Martínez, C, Navarro, C, Rodríguez, L, Sbnchez, MJ, Tormo, MJ, González, CA & Agudo, A. (2009). Serum levels of organochlorine pesticides in healthy adults from five regions of Spain. *Chemosphere*, **76**, 1518-1524.
47. James, R, Roberts, S & William, P. (2000). General principles of toxicology. In *Principles of toxicology: environmental and industrial applications*. ed. James,R., Roberts,S. & William,P. pp. 3-34. John Wiley & Sons, Inc: New York.

48. Jerez, S. (1999). Determinación de pesticidas organoclorados en suelo agrícola y productos agropecuarios de la comuna de Chonchi, provincia de Chiloé. Tesis Escuela de Med. Veterinaria, Fac. de Cs. Veterinarias, Universidad Austral de Chile..
49. Jiménez, M, Rivas, A, Olea, F & Oléa, N. (2004). Pesticidas organoclorados en suero y tejido adiposo de mujeres del sureste español. *Ecosistemas*, **13**, 45-50.
50. Jorgenson, JL. (2001). Aldrin and Dieldrin: A Review of Research on Their Production, Environmental Deposition and Fate, Bioaccumulation, Toxicology, and Epidemiology in the United States. *Environmental Health Perspectives Supplements*, **109**, 113.
51. Kawasaki, S & Tadano, J. (2001). Biological matrices: pesticides content sampling, sample preparation and preservation. In *Encyclopedia of analytical chemistry*. ed. Meyers, R.A. pp. 1-12. John Wiley & Sons.: Chichester, UK.
52. Kortenkamp, A. (2006). Breast cancer, oestrogens and environmental pollutants: a re-evaluation from a mixture perspective. *Int J Androl*, **29**, 193-198.
53. Langer, P, Kocan, A, Tajtáková, M, Susienková, K, Rádiková, Z, Koska, J, Ksinantová, L, Imrich, R, Hucková, M, Drobná, B, Gasperíková, D, Trnovec, T & Klimes, I. (2009). Multiple adverse thyroid and metabolic health signs in the population from the area heavily polluted by organochlorine cocktail (PCB, DDE, HCB, dioxin). *Thyroid Research*, **2**.

54. Lehman-McKeeman, L. (2008). Absorption, distribution and excretion of toxicants. In *Casarett & Doull's Toxicology: The basic science of poisons*. ed. Klaassen, C. pp. 131-159. McGraw-Hill: New York.
55. López, R, Goñi, F, Etxandia, A & Millán, E. (2007). Determination of organochlorine pesticides and polychlorinated biphenyls in human serum using headspace solid-phase microextraction and gas chromatography-electron capture detection. *Journal of Chromatography B*, **846**, 298-305.
56. Lopez-Espinosa, MJ, Vizcaino, E, Murcia, M, Llop, S, Espada, M, Seco, V, Marco, A, Rebagliato, M, Grimalt, JO & Ballester, F. (2009). Association between thyroid hormone levels and 4,4'-DDE concentrations in pregnant women (Valencia, Spain). *Environmental Research*, **109**, 479-485.
57. Ludwigi, JK & Goralczyk, K. (1994). Organochlorine pesticides and PCBs in human adipose tissues in Poland. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, **52**, 400-403.
58. Matthews, GA. (2011). Operator exposure. In *Pesticides: health, safety and the environment*. ed. Matthews, G.A. pp. 78-107. Blackwell Publishing Ltd.: Oxford, UK.
59. Minh, TB, Watanabe, M, Tanabe, S, Yamada, T, Hata, J & Watanabe, S. (2001). Specific accumulation and elimination kinetics of Tris(4-chlorophenyl)methane, Tris(4-chlorophenyl)methanol and other persistent organochlorines in humans from Japan. *Environ Health Perspect*, **109**, 927-935.

60. MINSAL. (2000). Situación epidemiológica de las intoxicaciones agudas por plaguicidas. Ministerio de Salud, Departamento de epidemiología, Chile.
61. Montes, L, Tamayo, R, Pinto, M & Cristi, R. (1986). Residuos de pesticidas en carnes de la décima región. *Amb y Des*, **2**, 91-96.
62. Moraleda, C. (2005). Niveles de residuos de pesticidas organoclorados en leche pasteurizada UHT procedente de la IX y X regiones de Chile. Escuela de ingeniería en alimentos. Facultad de Ciencias Agrarias.: Univ. Austral de Chile. 82pp.
63. Nazer, H, Aravena, C & Cifuentes, O. (2001). Malformaciones congénitas en Chile: un problema emergente (período 1995-1999). *Rev Méd Chile*, **129**, 895-904.
64. Ntow, WJ. (2001). Organochlorine pesticides in water, sediment, crops and human fluids in a farming comunity of Ghana. *Arch Environ Contam Toxicol*, **40**, 557-563.
65. Ntow, WJ, Tagoe, LM, Drechsel, P, Kelderman, P, Gijzen, HJ & Nyarko, E. (2008). Accumulation of persistent organochlorine contaminants in milk and serum of farmers from Ghana. *Environmental Research*, **106**, 17-26.
66. Oléa, N, Fernández, M, Araque, P & Olea-Serrano, F. (2002). Perspectivas en disrupción endocrina. *Gac Sanit*, **16**, 250-256.
67. OMS. (2009). *The WHO recommended classification of pesticides by hazard and guidelines to classification*.
68. ONU. (2004). Eliminando los COPs del mundo: guía del Convenio de Estocolmo sobre contaminantes orgánicos persistentes.

69. Page, BD & Lacroix, G. (1997). Application of solid-phase microextraction to the headspace gas chromatographic analysis of semi-volatile organochlorine contaminants in aqueous matrices. *Journal of Chromatography A*, **757**, 173-182.
70. Palma, H, Quiroz, E, Gutierrez, E, Cristi, E, Jara, B, Keim, ML, Pino, M, Huber, A, Jaramillo, E, Espinoza, O, Quijín, P, Contreras, H & Ramírez, C. (2000). Chemical characterization of a municipal landfill and its influence on the surrounding estuarine system, south central Chile. *Boletín de la Sociedad Chilena de Química*, **45**, 551-561.
71. Parent-Massin, D & Thouvenot, D. (1993). In vitro study of pesticide hematotoxicity in human and rats progenitor. *J Pharmacol Toxicol Methods*, **30**, 203-207.
72. Park, SK, Son, HK, Lee, SK, Kang, JH, Chang, YS, Jacob, DR & Lee, DH. (2010). Relationship between serum concentrations of organochlorine pesticides and metabolic syndrome among non-diabetic adults. *J Prev Med Public Health*, **43**, 1-8.
73. Patnaik, P. (2007a). Pesticides, organochlorine. In *A comprehensive guide to the hazardous properties of chemical substances*. ed. Patnaik, P. pp. 762-781. John Wiley & Sons. Inc: Hoboken, New Jersey.
74. Patnaik, P. (2007b). Toxic properties of chemical substances. In *A comprehensive guide to the hazardous properties of chemical substances*. ed. Patnaik, P. pp. 17-25. John Wiley & Sons, Inc.: Hoboken, New Jersey.

75. Pierik, F, Klebanoff, M, Brock, J & Longnecker, M. (2007). Maternal pregnancy serum level of heptachlor epoxide, hexachlorobenzene and beta-hexachlorocyclohexane and risk of cryptorchidism in offspring. *Environ Res*, **105**, 364-369.
76. Pinto, M, Montes, L, Anrique, R, Carrillo, R & Tamayo, R. (1990). Residuos de plaguicidas organoclorados en leche de vaca y su relación con alimentos para uso animal como fuentes de contaminación. *Arch Med Vet*, **22**, 143-153.
77. Pitarch, E, Serrano, R, López, FJ & Hernández, F. (2003). Rapid multiresidue determination of organochlorine and organophosphorus compounds in human serum by solid-phase extraction and gas chromatography coupled to tandem mass spectrometry. *Analytical & Bioanalytical Chemistry*, **376**, 189-197.
78. PNUMA. (2000). Documento Guía para el acopio y la evaluación de datos sobre fuentes, concentraciones ambientales y efecto de sustancias tóxicas persistentes.
79. Prado, 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. *AgroSur*, **32**, 60-69.
80. Pragst, F. (2007). Application of solid-phase microextraction in analytical toxicology. *Analytical & Bioanalytical Chemistry*, **388**, 1393-1414.
81. Ramírez, JA & Lacasaña, M. (2001). Plaguicidas: clasificación, uso, toxicología y medición de la exposición. *Arch Prev Riesgos Labor*, **4**, 67-75.
82. RAP Chile. (2011). *Plaguicidas. Alianza por una mejor calidad de vida*.

83. Richardson, J, Caudle, W, Wang, M, Dean, E, Penell, K & Miller, G. (2008). Developmental heptachlor exposure increases susceptibility of dopamine neurons to N-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) in a gender-specific manner. *Neurotoxicology*, **29**, 855-863.
84. Richardson, J, Shalat, S, Buckley, B, Winnik, B, O'Suilleabhain, P & Días, R. (2009). Elevated serum pesticide levels and risk of Parkinson disease. *Arch Neurol*, **66**, 870-875.
85. Rivas, A, Granada, A, Jiménez, M, Olea, F & Oléa, N. (2004). Exposición a disruptores endocrinos. *Ecosistemas*, **13**, 7-12.
86. Rogan, W & Ragan, N. (2007). Some evidence of effects of environmental chemicals on the endocrine system in children. *Int Hyg Environ Health*, **210**, 659-667.
87. Rogan, WJ & Ragan, NB. (2003). Evidence of Effects of Environmental Chemicals on the Endocrine System in Children. *Pediatrics*, **112**, 247-252.
88. Rojas, R, Ojeda, B & Barraza, O. (2000). Malformaciones congénitas y exposición a pesticidas. *Revista médica de Chile*, **128**, 399-404.
89. Ruiz, A, Wierna, N & Bovi Mitre, G. (2008). Plaguicidas organoclorados en leche cruda comercializada en Jujuy (Argentina). *Rev Toxicol*, **25**, 61-66.
90. Smith, A. (2004). Toxicology of organochlorine insecticides. In *Pesticide toxicology and international toxicology*. ed. Marrs, T. & Ballantyne, B. pp. 27-88. John Wiley and Sons, Ltd..

91. Smith, A. (2010). Toxicology of DDT and some analogues. In *Hayes' handbook of pesticide toxicology*. ed. Krieger, R. pp. 1975-2032. Academic Press: San Diego.
92. Snedeker, SM. (2001). Pesticides and Breast Cancer Risk: A Review of DDT, DDE, and Dieldrin. *Environmental Health Perspectives Supplements*, **109**, 35.
93. Starek, A. (2003). Estrogens and organochlorine xenoestrogens and breast cancer risk. *International Journal of Occupational Medicine & Environmental Health*, **16**, 113.
94. Voorspoels, S, Covaci, A, Maervoet, J & Schepens, P. (2002). Relationship Between Age and Levels of Organochlorine Contaminants in Human Serum of a Belgian Population. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, **69**, 22-29.
95. Waliszewski, S, Aguirre, A, Infanzón, R & Siliceo, J. (2000). Carry-over of persistent organochlorine pesticides through placenta to fetus. *Salud pública de México*, **42**, 384-390.
96. Waliszewski, S, Bermúdez, T & Infanzón, R. (2002). Niveles de DDT en tejido adiposo materno, suero sanguíneo y leche de madres residentes en Veracruz, México. Estudio 1997-1999. *Rev Int Contam Ambien*, **18**, 17-25.
97. Waliszewski, S, Gómez-Arroyo, S, Carvajal, O, Villalobos-Pietrini, R & Infanzón, R. (2004). Uso del ácido sulfúrico en las determinaciones de plaguicidas organoclorados. *Rev Int Contam Ambien*, **20**, 185-192.

98. Walles, M, Mullett, WM & Pawliszyn, J. (2004). Monitoring of drugs and metabolites in whole blood by restricted-access solid-phase microextraction coupled to liquid chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, **1025**, 85-92.
99. Wistuba, S. (1991). Determinación de residuos de pesticidas organoclorados en leche materna provenientes de las comunas de Lanco y San José de la Mariquina. Escuela de agronomía. Facultad de Ciencias Agrarias, Univ. Austral de Chile. 67pp.
100. Xiaofang, F, Yiping, L & Huwei, L. (2005). Sample preparation for pharmaceutical analysis. *Analytical & Bioanalytical Chemistry*, **381**, 75-77.
101. Zeng, EY & Noblet, JA. (2002). Theoretical Considerations on the Use of Solid-Phase Microextraction with Complex Environmental Samples. *Environmental Science & Technology*, **36**, 3385.

8. ANEXOS

ANEXO 1**Clasificación de pesticidas.**

CUADRO 1. Clasificación química de pesticidas.

Familia química	Ejemplos
Organoclorados	DDT, aldrín, endosulfán, endrín.
Organofosforados	Bromophos, diclorvos, malatión.
Carbamatos	Carbaryl, methomyl, propoxur.
Tiocarbamatos	Dicarbamato, mancozeb, maneb.
Piretroides	Cypermethrin, fenvalerato, permethrin.
Derivados bipiridilos	Clomequat, diquat, paraquat.
Derivados del ácido fenoxiacético	Dicloroprop, piclram, silvex.
Derivados cloronitrofenólicos	DNOC, dinoterb, dinocap.
Derivados de triazinas	Atrazine, ametryn, desmetryn, simazine.
Compuestos organoestánicos	Cyhexatin, dowco, plictrán.
Compuestos Inorgánicos	Pentóxido de arsénico, obpa, fosfito de magnesio, cloruro de mercurio, arsenato de plomo, bromuro de metilo, antimonio, mercurio, selenio, talio y fósforo blanco.
Compuestos de origen vegetal	Rotenona, nicotina, aceite de canola.

FUENTE: Ramírez & Lacasaña (2001)

CUADRO 2. Sistema binario de clasificación química de pesticidas

AS	Compuesto de arsénico	OP	Compuesto organofosforado
BP	Derivado bipiridilo	OT	Compuesto organoestánico
C	Carbamato	PAA	Derivado del ácido fenoxiacético
CO	Derivado cumarínico	PZ	Pirazol
CU	Compuesto de cobre	PY	Piretroide
HG	Compuesto de mercurio	T	Derivado triazínico
NP	Derivado nitrofenólico	TC	Tiocarbamato
OC	Compuesto organoclorado		

FUENTE: OMS (2009)

CUADRO 3. Clasificación de los pesticidas según su persistencia.

Persistencia	Vida media	Ejemplos
No persistente	De días hasta 12 semanas	Malatión, diazinón, carbarilo, diametrín.
Moderadamente persistente	De 1 a 18 meses	Paratión, lannate.
Persistente	De varios meses a 20 años	DDT, aldrín, dieldrín.
Permanentes	Indefinidamente	Productos hechos a partir de mercurio, plomo, arsénico.

FUENTE: Ramírez & Lacasaña (2001)

CUADRO 4. Categorías de pesticidas según toxicidad aguda recomendadas por la OMS

Categoría OMS		LD50 en ratas (mg/Kg de peso corporal)			
		Oral		Dermal	
		Sólidos	Líquidos	Sólidos	Líquidos
Ia	Extremadamente peligrosos	<5	<20	<10	<40
Ib	Altamente peligrosos	5-50	20-200	10-100	40-400
II	Moderadamente peligrosos	50-500	200-2.000	100-1.000	400-4.000
III	Ligeramente peligrosos	Sobre 500	Sobre 2.000	Sobre 1.000	Sobre 4.000

FUENTE: OMS (2009)

CUADRO 5. Categorías de pesticidas según su toxicidad aguda acorde al GHS.

Categoría GHS	Criterio de clasificación			
	Oral		Dermal	
	LD ₅₀ (mg/Kg) ^a	Declaración de peligrosidad	LD ₅₀ (mg/Kg) ^b	Declaración de peligrosidad
Categoría 1	<5	Fatal si es ingerido	<50	Fatal en contacto con la piel
Categoría 2	5-50	Fatal si es ingerido	50-200	Fatal en contacto con la piel
Categoría 3	50-300	Tóxico si es ingerido	200-1000	Tóxico en contacto con la piel
Categoría 4	300-2000	Dañino si es ingerido	1000-2000	Dañino en contacto con la piel
Categoría 5	2000-5000	Puede ser dañino si es ingerido	2000-5000	Puede ser dañino en contacto con la piel

^a Para datos orales la rata es la especie preferida, aunque datos a partir de otras especies pueden ser apropiados cuando se justifica científicamente.

^b Para datos dermales, la rata o el conejo son las especies preferidas, aunque datos a partir de otras especies pueden ser apropiados cuando se justifica científicamente.

FUENTE: OMS (2009)

CUADRO 6. Principales usos de los pesticidas

AC	Acaricida	L	Larvicida
FM	Fumigante	M	Molusquicida
F	Fungicida	N	Nematocida
H	Herbicida	PGR	Regulador del crecimiento de plantas
I	Insecticida	R	Rodenticida.
IGR	Regulador del crecimiento de insectos	RP()	Repelente (especie)

FUENTE: OMS (2009)

ANEXO 2**Compuestos considerados contaminantes orgánicos persistentes por la OMS.**

CUADRO 7. Compuestos considerados contaminantes persistentes por la ONU/PNUMA.

Plaguicidas	Sustancias químicas industriales	Subproductos no deseados
Aldrín, Clordano, DDT, Dieldrín, Endrín, Heptacloro, Hexaclorobenceno, Mirex, Toxafeno	Bifenilos policlorados Hexaclorobenceno.	Dioxinas Furanos

FUENTE: PNUMA (2000)

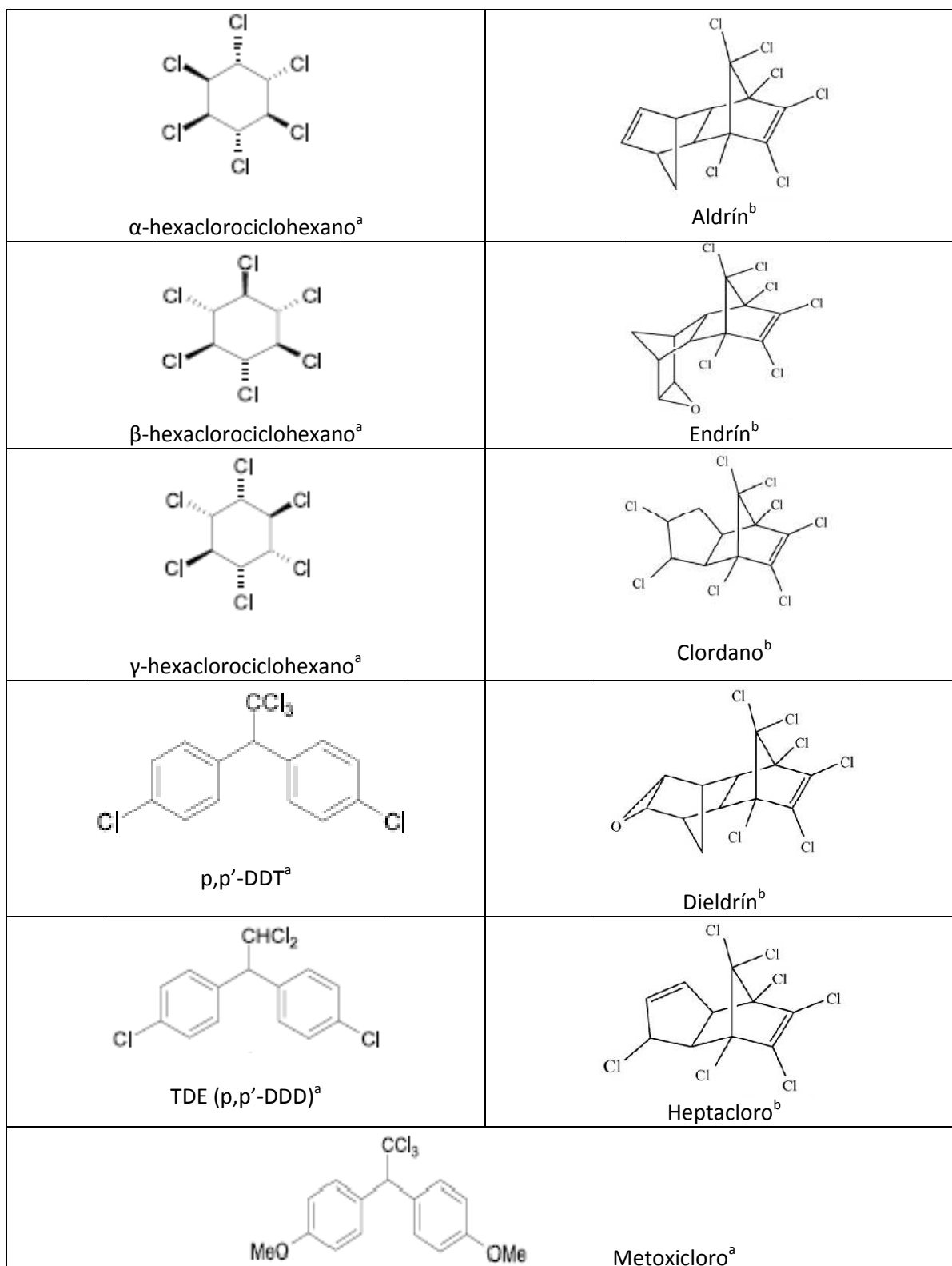
ANEXO 3

Clasificación de los pesticidas organoclorados.

Clasificación según estructura química. Dentro de los compuestos más conocidos y estudiados se encuentran los isómeros alfa, beta, gamma y delta del hexaclorociclohexano (α -HCH, β -HCH, γ -HCH y δ -HCH siendo el γ -HCH más conocido como lindano), hexaclorobenceno (HCB), heptacloro y heptacloroepóxido, α -clordano, γ -clordano, aldrín, dieldrín, endrín, endrín cetona, endrín aldehído, endosulfán I, endosulfán II, endosulfán sulfato, DDT, DDE, DDD y metoxicloro. El orden en el cual se han nombrado estos compuestos obedece a la clasificación según estructura química dada a continuación:

- Derivados alicíclicos clorados, como lo son α -HCH, β -HCH, γ -HCH y δ -HCH. La diferencia entre cada uno de estos compuestos está dada sólo por la posición de los seis átomos de cloro en los planos axial y ecuatorial del anillo ciclohexano.
- Ciclodienos clorados, como heptacloro y heptacloroepóxido, α -clordano y γ -clordano, aldrín, dieldrín, endrín, endrín cetona, endrín aldehído, endosulfán I, endosulfán II, endosulfán sulfato. La estructura básica de todos estos pesticidas es un conjunto de tres anillos condensados y con un par de enlaces dobles que además de cloro puede contener oxígeno y azufre.
- Derivados clorados del 2,2-difeniletano, donde se cuenta el DDT, el metoxicloro y el dicofol. Los compuestos DDE y DDD aparecen como metabolitos del DDT cuando éste es biotransformado por la maquinaria enzimática de diversos seres vivos incluidos los humanos. El DDT, DDE y DDD a su vez pueden tener varios isómeros, que se diferencian sólo por la posición de los átomos de cloro en el par de anillos aromáticos.

FIGURA 1. Estructuras moleculares de algunos pesticidas organoclorados



FUENTE: a. Smith (2004); b. El-Shahawi et al. (2010)

ANEXO 4

Propiedades físicas, químicas y toxicológicas de los pesticidas organoclorados.

Propiedades físicas y químicas. Los pesticidas organoclorados son compuestos altamente liposolubles y termodinámicamente muy estables, con tiempos de vida media promedio de 10 años, lo que les da una increíble persistencia en el medio ambiente, donde pueden permanecer por años depositados en el tejido adiposo de animales, pudiendo diseminarse y bioacumularse en otros ecosistemas. A través de las cadenas alimentarias, los COPs se van bioconcentrado, donde el último eslabón es el ser humano.

La gran estabilidad de estos compuestos se debe en gran medida a la baja reactividad de los enlaces C-Cl. El enlace C-Cl es muy estable frente a la hidrólisis y, en general, mientras mayor sea la sustitución del anillo con átomos de cloro, mayor es la resistencia de la molécula a la degradación biológica o fotolítica.

Todos los pesticidas organoclorados se consideran persistentes, dentro de los cuales destacan el toxafeno con una vida media de 11 años, el DDT y el endrín, con una vida media de 10 años y el clordano con una vida media de 8 años; a estos le siguen el dieldrín, el aldrín, el heptacloro y el lindano, con vidas medias de 7, 5, 5 y 2 años, respectivamente.

En el CUADRO 7 muestran los pesticidas organoclorados y otras sustancias consideradas en la docena sucia de contaminantes orgánicos persistentes elegidas por la OMS.

Hexaclorociclohexano. El llamado HCH técnico es una mezcla de diversos isómeros entre los cuales se cuentan desde el alfa hasta el épsilon-HCH. En general, los porcentajes de cada isómero varían de la siguiente forma: α -HCH (55-80%), β -HCH (5-14%), γ -HCH (8-15%), δ -HCH (2-16%) y ϵ -HCH (3-5%). Dentro de este mezcla, se han hecho estudios que demuestran que el

lindano (γ -HCH) es de 50 a 10.000 veces más activo que los isómeros α y δ , mientras que los isómeros β y ϵ , dependiendo de la especie de insecto, pueden ser casi inactivos. Es por esto que existe también en el comercio lindano puro (99% γ -HCH).

El lindano, y los otros isómeros HCH, son relativamente persistentes en suelo y agua, con vidas medias de 1 a 2 años. A diferencia de los demás COPs, el lindano presenta una mayor solubilidad en agua (10ppm), por lo que su capacidad de bioacumularse es menor. Por otra parte, presenta una presión de vapor de 4.45×10^{-3} Pa a 20°C (altamente volátil) lo que le permite diseminarse hacia otros lugares más alejados del lugar de aplicación del plaguicida. Esto, además, representa una desventaja en el campo de la agricultura, puesto que al ser tan volátil, su tiempo de residencia y acción es mucho menor.

Los procesos por los cuales se lleva a cabo la degradación del HCH incluyen degradación lenta por microorganismos aerobios y anaerobios, dando como productos principales bencenos y fenoles clorados, mientras que por efecto de la luz el γ -HCH se puede transformar en α -HCH.

Ciclodienos. El clordano de grado técnico contiene un 60% de β -clordano y un 25-40% de otros derivados ciclopentadienos clorados, incluyendo heptacloro. Es un compuesto líquido viscoso incoloro o ámbar, insoluble en agua con un alto punto de ebullición (175°C) y una alta tensión de vapor ($6,7 \times 10^{-3}$ Pa). El producto técnico es muy sensible a los álcalis y los compuestos que contienen hierro pueden acelerar su degradación.

De todos los componentes del clordano técnico, el más eficiente es el heptacloro, por lo que se han preparado formulaciones de heptacloro técnico que consisten en un 67% de heptacloro y un 33% de otros compuestos organoclorados. El heptacloro es un compuesto sólido a temperatura ambiente, insoluble en agua pero soluble en la mayoría de los solventes orgánicos. Es un

compuesto altamente volátil (4×10^{-2} Pa a 25°C) que se descompone en su punto de ebullición ($135\text{-}145^\circ\text{C}$, sensible al calor) y es además sensible a la luz, humedad, ácidos, bases y agentes oxidantes. El insecticida es unas 4 a 5 veces más eficiente que el clordano, y en el organismo de insectos se transforma fácilmente a heptacloro epóxido, el cual es aún más activo que el heptacloro.

El aldrín sigue la tendencia de los demás ciclodienos; es un compuesto sólido viscoso con una tensión de vapor alta que lo posiciona como uno de los compuestos organoclorados más volátiles (8×10^{-4} Pa a 25°C). Es insoluble en agua, muy estable en el medio ambiente y compatible con otros pesticidas y fertilizantes, lo que le permite ser aplicado en complejas mezclas de diversos agroquímicos.

En el organismo de seres vivos, el aldrín se convierte fácilmente en dieldrín, un compuesto epoxidado. El dieldrín de grado técnico es un 85% puro, y al igual que el aldrín, es estable frente a los álcalis. Sin embargo, su tensión de vapor es tan baja (2.4×10^{-5} Pa a 25°C) que no puede usarse como insecticida de suelos debido a su baja volatilidad.

El endrín es un derivado de otro plaguicida organoclorado llamado isodrín. Es menos estable que el dieldrín por lo que los preparados de este plaguicida suelen acompañarse de hexametilentetramina como agente estabilizante. A 25°C tiene una presión de vapor de 3×10^{-5} Pa, por lo que es moderadamente volátil.

El endosulfán de grado técnico es una mezcla de dos isómeros, el α -endosulfán y el β -endosulfán. Es un sólido de color café insoluble en agua y sensible a los álcalis.

Derivados del difeniletano. El DDT fue el primer plaguicida organoclorado en ser sintetizado y descubierto como plaguicida. El producto técnico contiene varios isómeros del DDT, como o,o'-DDT, o,p'-DDT y p,p'-DDT, y productos derivados de él como isómeros del DDE y DDD. El p,p'-DDT es muy estable frente a la luz, agentes oxidantes y ácidos inorgánicos, sin embargo, se descompone rápidamente a p,p'-DDE (2,2-bis(p-clorofenil)-1,1-dicloroetano) y p,p'-DDA (ácido 2,2-bis(p-clorofenil)acético). En general, todos los derivados del DDT son altamente volátiles y liposolubles, siendo el p,p'-DDT uno de los componentes más potentes debido a la disposición para-para' de los átomos de cloro en los anillos bencénicos. La alta estabilidad del DDT en la naturaleza le confiere una vida media de unos 10 años promedio, siendo así uno de los plaguicidas organoclorados más persistentes conocidos hasta ahora.

El metoxicloro o 2,2-bis(p-metoxifenil)-1,1,1-tricloroetano (DMDT) es un pesticida organoclorado mucho menos potente que el DDT, cuya diferencia está en que los átomos de cloro unidos al anillo bencénico son cambiados por grupos metoxi, CH₃O-, en las posiciones para de los anillos. Lo que se logró con esta sustitución fue un compuesto mucho menos tóxico y menos persistente que el DDT, aunque se ha visto que el proceso de fotólisis, si bien ocurre más rápido que en el DDT, aún es un proceso lento en la naturaleza.

Toxicidad aguda de los pesticidas organoclorados. La principal acción tóxica de los pesticidas organoclorados es a nivel del sistema nervioso central (SNC), donde interfieren con el intercambio de iones a través de las membranas neuronales, incrementando la irritabilidad neuronal. El efecto visible debido a esta acción son las convulsiones, las cuales pueden causar la muerte al intervenir con el intercambio gaseoso a nivel pulmonar y al provocar una severa acidosis metabólica.

Varios otros disturbios del tacto, coordinación y función mental son característicos de la intoxicación aguda con pesticidas organoclorados. Altas concentraciones tisulares de estos compuestos aumentan la irritabilidad del miocardio, predisponiendo al individuo a sufrir arritmias cardíacas. El cese de los efectos generalmente no se debe a la metabolización del pesticida, sino a la redistribución de éste a otros tejidos indiferentes, como la grasa.

La toxicidad aguda de cualquier xenobiótico se mide por medio del LD50. En los cuadros de a continuación, se muestran los LD50 oral y dermal para ratas de algunos pesticidas organoclorados incluidos en este trabajo.

CUADRO 8. Pesticidas organoclorados Altamente Peligrosos (Categoría Ib de la OMS)

Pesticida	Clasificación química	LD50 (mg/Kg)	
		Oral	Dermal
Aldrín	Ciclodieno	39	98
Dieldrín	Ciclodieno	46	90
Endrín	Ciclodieno	7.5	15
Endosulfán	Ciclodieno	43	130

FUENTE: Smith (2004).

CUADRO 9. Pesticidas organoclorados Moderadamente Peligrosos (Categoría II de la OMS)

Pesticida	Clasificación	LD50 (mg/Kg)	
		Oral	Dermal
Lindano	Hexaclorociclohexano clorado	91	500
Clordano	Ciclodieno	430	530
Heptacloro	Ciclodieno	100	195
DDT	Derivado difeniletano	113-450	250-3000

FUENTE: Smith (2004)

Como se observa en el CUADRO 8, el endrín es el pesticida organoclorado más tóxico administrado por cualquier vía. Sus efectos tóxicos son similares a los producidos por otros ciclodienos como aldrín y dieldrín, e incluyen dolor de cabeza, náusea, vómito y convulsiones,

que son el primer signo de envenenamiento con estos compuestos. Esta sintomatología es también propia de la intoxicación con lindano.

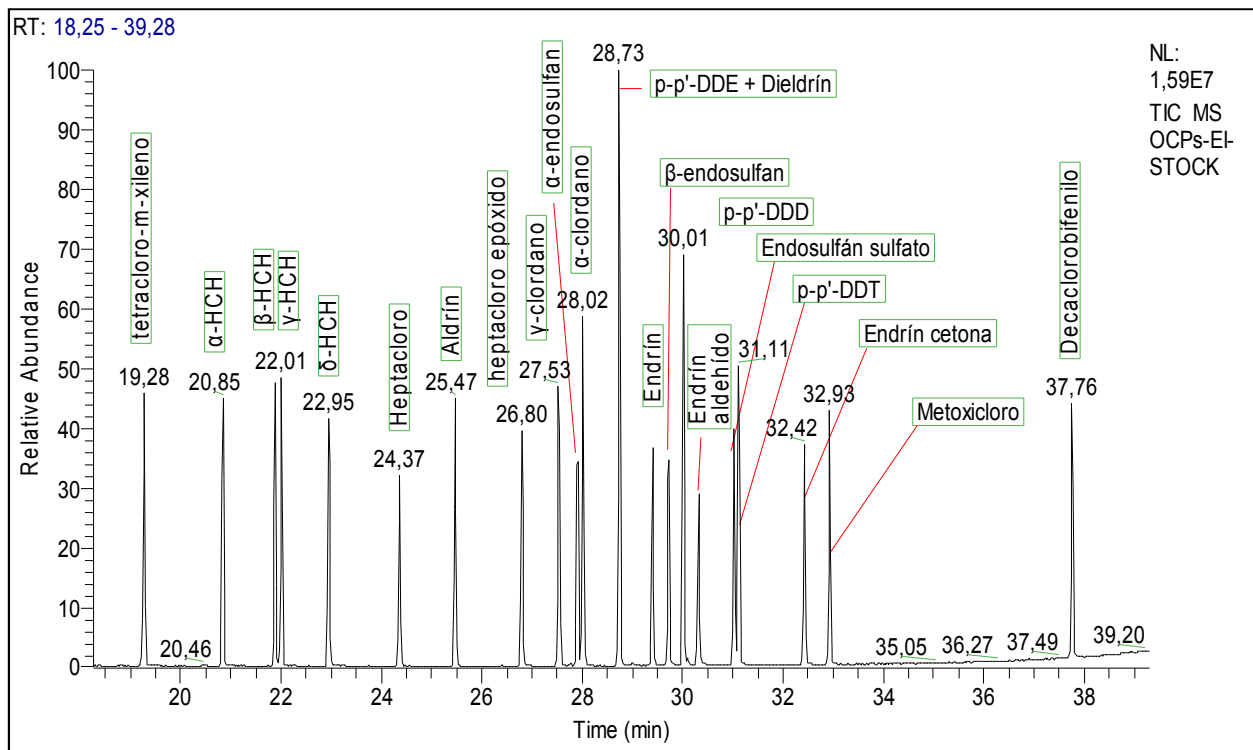
Existe una gran diferencia entre la intoxicación con DDT y ciclodienos y derivados del HCH, y es que con el DDT están presentes los temblores, cosa que no se observa con los ciclodienos ni con HCH.

En humanos, dosis de 10 a 20mg/Kg de DDT producen efectos tóxicos agudos, pero se han visto casos de envenenamiento con dosis superiores a 285mg/Kg sin resultado de muerte. Como se ve en el CUADRO 9, la toxicidad dermal del DDT también es limitada puesto que su absorción por esta vía es pobre. En la época de auge del DDT, este era rociado en grandes campos sobre la gente, sin que esta sufriera los efectos tóxicos.

En humanos, los primeros síntomas de intoxicación con DDT incluyen hiperestesia de la boca y partes bajas de la cara, seguido de parestesia de la misma área y de la lengua. Le siguen los mareos, temblores de extremidades y confusión, mientras que las convulsiones se observan sólo en casos de intoxicación severa.

ANEXO 5

FIGURA 2. Cromatograma obtenido por método de inyección directa de estándar de organoclorados y análisis GC-MS por electroimpacto full scan.



ANEXO 6

Tiempo de retención	Nombre Pesticida	MW	BP
19.28	2,4,5,6-tetracloro-m-xileno	242,00	207,0
20.85	α -HCH	288,00	181,0
21.89	β -HCH	288,00	181,0
22.01	γ -HCH	288,00	181,0
22.95	δ -HCH	288,00	181,0
24.37	Heptacloro	370,00	100,1
25.47	Aldrin	362,00	66,1
26.80	Heptacloroepoxido	386,00	81,1
27.53	γ -clordano	406,00	372,9
27.92	α -endosulfan	404,00	195,0
28.02	α -clordano	406,00	374,9
28.73	p-p'-DDE	316,00	246,1
28.73	Dieldrín	378,00	79,1
29.40	Endrin	378,00	81,1
29.73	β -endosulfan	404,00	195,0
30.01	p-p'-DDD	318,00	235,1
30.32	endrin aldehído	378,00	67,1
31.03	endosulfan sulfato	420,00	271,9
31.11	p-p'-DDT	352,00	235,1
32.42	endrin cetona	378,00	67,1
32.93	Metoxicloro	344,00	227,2
37.76	Decaclorobifenilo	494,00	214,0

MW: ión correspondiente a la masa molecular del compuesto

BP: base peak, correspondiente al ión más abundante en el espectro de masas obtenido por electroimpacto.

ANEXO 7

Número	t _R EI	t _R NCI	Δt _R	Nombre Pesticida	Quan m/z	Qual m/z
1	19,28	19,46	-0,18	2,4,5,6-tetracloro-m-xileno	35	-
2	20,85	20,98	-0,13	α-HCH	71	35
3	21,89	22,04	-0,15	β-HCH	71	35
4	22,01	22,18	-0,17	γ-HCH	71	35
5		22,32		PCNB	249	267
6	22,95	23,11	-0,16	δ-HCH	71	35
7	24,37	24,54	-0,17	Heptacloro	266	35
8	25,47	25,65	-0,18	Aldrin	237	35
9	26,8	26,99	-0,19	Heptacloroepoxido	35	237
10	27,53	27,68	-0,15	γ-clordano	266	71
11	27,92	28,05	-0,13	α-endosulfan	232	272
12	28,02	28,19	-0,17	α-clordano	266	71
13	28,73	28,88	-0,15	Dieldrín	237	-
14	28,73	28,88	-0,15	p-p'-DDE	35	318
15	29,4	29,57	-0,17	Endrin	35	272
16	29,73	29,89	-0,16	β-endosulfan	232	406
17	30,01	30,17	-0,16	p-p'-DDD	71	35
18	30,32	30,45	-0,13	endrin aldehído	272	270
19	31,03	31,14	-0,11	endosulfan sulfato	386	352
20	31,11	31,28	-0,17	p-p'-DDT	71	35
21	32,42	32,57	-0,15	endrin cetona	308	-
22	32,93			Metoxicloro	35	37
23	37,76	37,89	-0,13	Decaclorobifenilo	498	500

ANEXO 8

Efecto de la salinidad y el volumen del headspace (HS) en la Miroextracción en Fase Sólida (SPME).

Para este estudio se analizó el efecto del volumen del espacio en cabeza del vial y la presencia de NaCl sobre la extracción, visualizada por medio de la variación de las áreas de los picos cromatográficos.

Está documentado que para una HS-SPME exitosa, los volúmenes de HS óptimos pueden ser de 3/4 ó 3/5 del total del volumen del vial. Esto significa que para un vial de 4mL, se probaron volúmenes de HS de 3mL y 2,4mL. En general, mientras más volátil sea el compuesto y mayor sea el volumen del HS, mayor será la cantidad de analito presente en la fase de vapor que podrá ser extraído.

La presencia de NaCl en la muestra de suero aumenta la fuerza iónica de la solución facilitando que aquellos compuestos iónicos o polares interactúen menos con el agua y sean capaces de pasar a la fase de vapor. El NaCl suele no tener efecto alguno cuando los compuestos son apolares. Una concentración de NaCl de 15% P/V es suficiente en la muestra según otros trabajos previos de extracción de pesticidas por medio de la técnica SPME.

El estudio consistió en fortificar una muestra de 500 μ L suero con 50 μ L de un estándar de pesticidas de concentración promedio de 80ng/mL de solución en hexano, en la cual se encontraba presente el pentacloronitrobenzeno (PCNB) como estándar interno a una concentración de 1 μ g/mL. Este procedimiento también incluye la adición de 50 μ L de ácido sulfúrico como agente destructor de proteínas y grasas del suero. El volumen de la solución se ajustó con agua destilada a 1mL total cuando el volumen del HS era de 3/4 y a 1.6mL cuando el

volumen del HS era de 3/5, en ambos casos con agua destilada. El NaCl se agregó en la cantidad justa de tal forma que su concentración en la solución final fuera de 15%P/V.

Los resultados de los tratamientos se muestran en la tabla de a continuación

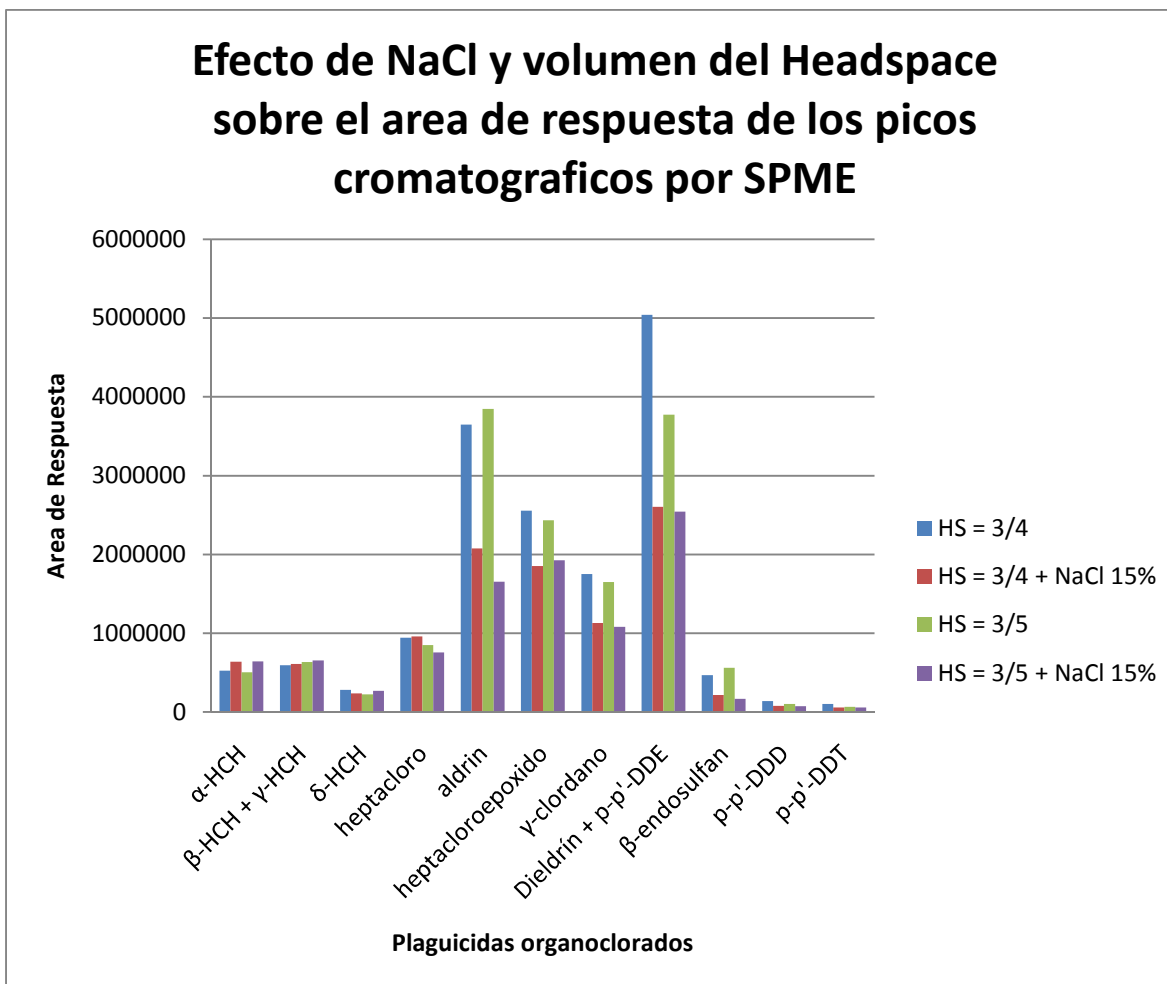
t_R NCI	compuesto	Areas de respuesta			
		HS = 3/4	HS = 3/4 + NaCl 15%	HS = 3/5	HS = 3/5 + NaCl 15%
21,35	α -HCH	526150	639638	506517	641927
22,55	β -HCH + γ -HCH	592475	610802	634597	654470
22,69	PCNB	33481472	33370621	27318616	33369688
23,52	δ -HCH	280499	234967	226188	270865
24,91	heptacloro	945502	957961	849191	757719
26,01	aldrin	3649929	2076738	3846568	1655022
27,35	heptacloroepoxido	2557772	1854660	2434850	1926718
28,09	γ -clordano	1751371	1130961	1648311	1082920
29,29	Dieldrín + p-p'-DDE	5040444	2605668	3773306	2543586
30,26	β -endosulfan	468193	215182	563478	168257
30,59	p-p'-DDD	139170	80147	102534	75398
31,56	p-p'-DDT	101441	58764	64543	58502

HS = 3/4: volumen de espacio en cabeza igual a los 3/4 del volumen total del vial (3mL de HS)

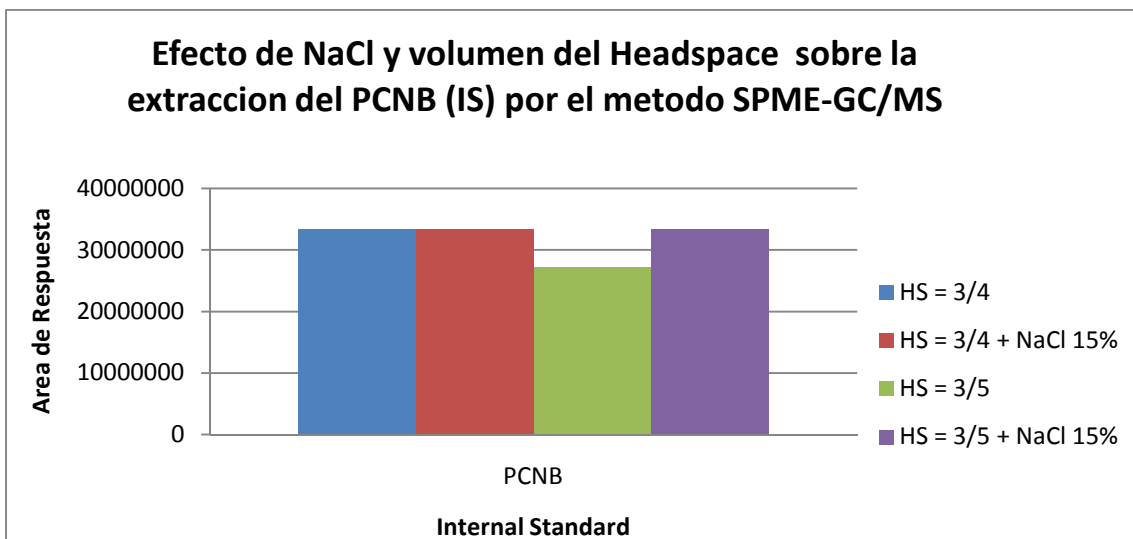
HS = 3/4 + NaCl 15%: 3mL en HS y 0,15g de NaCl en 1mL de solución de suero.

HS = 3/5: volumen en espacio en cabeza igual a los 3/5 del volumen total del vial (2,4mL de HS)

HS = 3/5 + NaCl 15%: 2,4mL en HS y 0,24g de NaCl en 1,6mL de solución de suero.



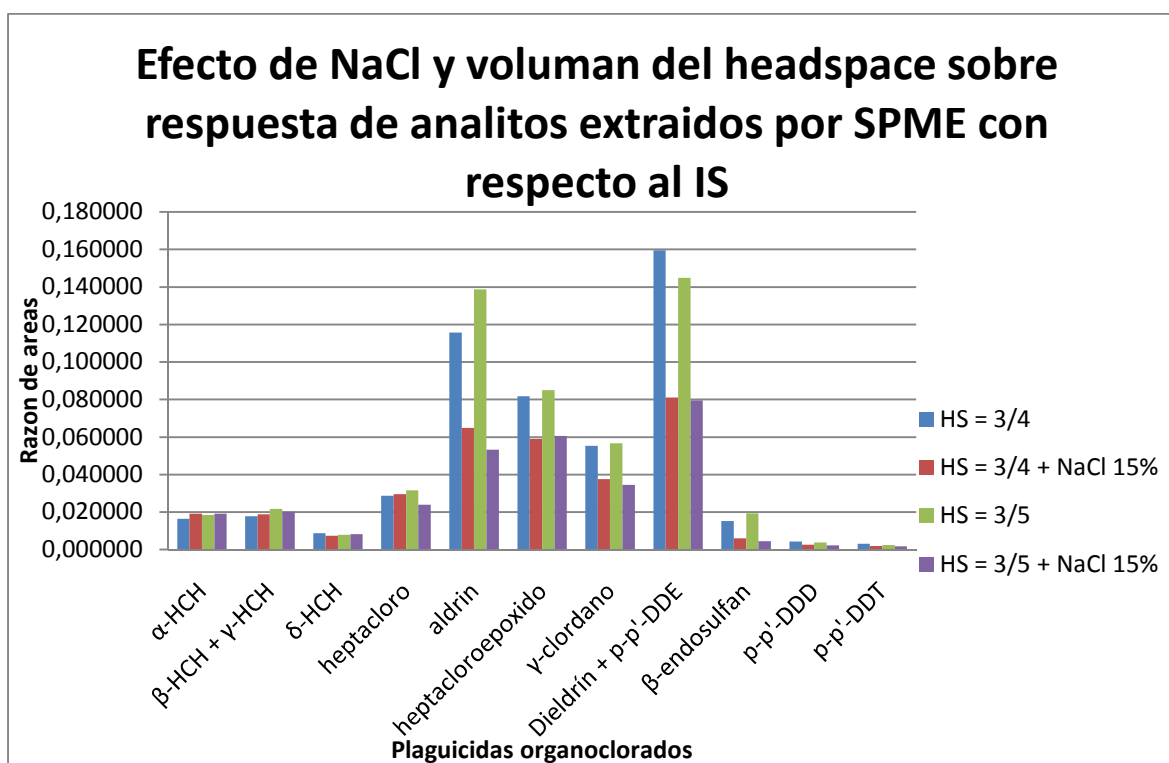
En el gráfico se observa que los mejores tratamiento son los que usan un volumen de espacio en cabeza (HS) igual a 3/4 y 3/5 del total del volumen del vial, y sin cloruro de sodio en la disolución de suero. El NaCl pareciera dificultar la extracción puesto que el área de los picos cromatográficos disminuye.



En este gráfico, se muestra la influencia de los tratamientos sobre el área del pico cromatográfico del estándar interno. Se observa que el NaCl no influye de manera importante en el área de respuesta del pentacloronitrobenceno (IS).

En esta tabla se muestran las mismas áreas de los picos cromatográficos pero cada una de ellas ha sido dividida por el área del pico cromatográfico del estándar interno (IS).

tr NCI	compuesto	Razones de área de respuesta con respecto al IS			
		HS = 3/4	HS = 3/4 + NaCl 15%	HS = 3/5	HS = 3/5 + NaCl 15%
21,35	α -HCH	0,016378	0,019096	0,018489	0,019105
22,55	β -HCH + γ -HCH	0,017889	0,018755	0,021651	0,020190
23,52	δ -HCH	0,008764	0,007466	0,007971	0,008171
24,91	heptacloro	0,028729	0,029554	0,031578	0,023931
26,01	aldrin	0,115713	0,064805	0,138750	0,053327
27,35	heptacloroepoxido	0,081738	0,059117	0,085015	0,060682
28,09	γ -clordano	0,055267	0,037509	0,056637	0,034551
29,29	Dieldrín + p-p'-DDE	0,159475	0,081160	0,144834	0,079603
30,26	β -endosulfan	0,015182	0,005987	0,019356	0,004474
30,59	p-p'-DDD	0,004387	0,002691	0,003767	0,002358
31,56	p-p'-DDT	0,003203	0,001985	0,002395	0,001779



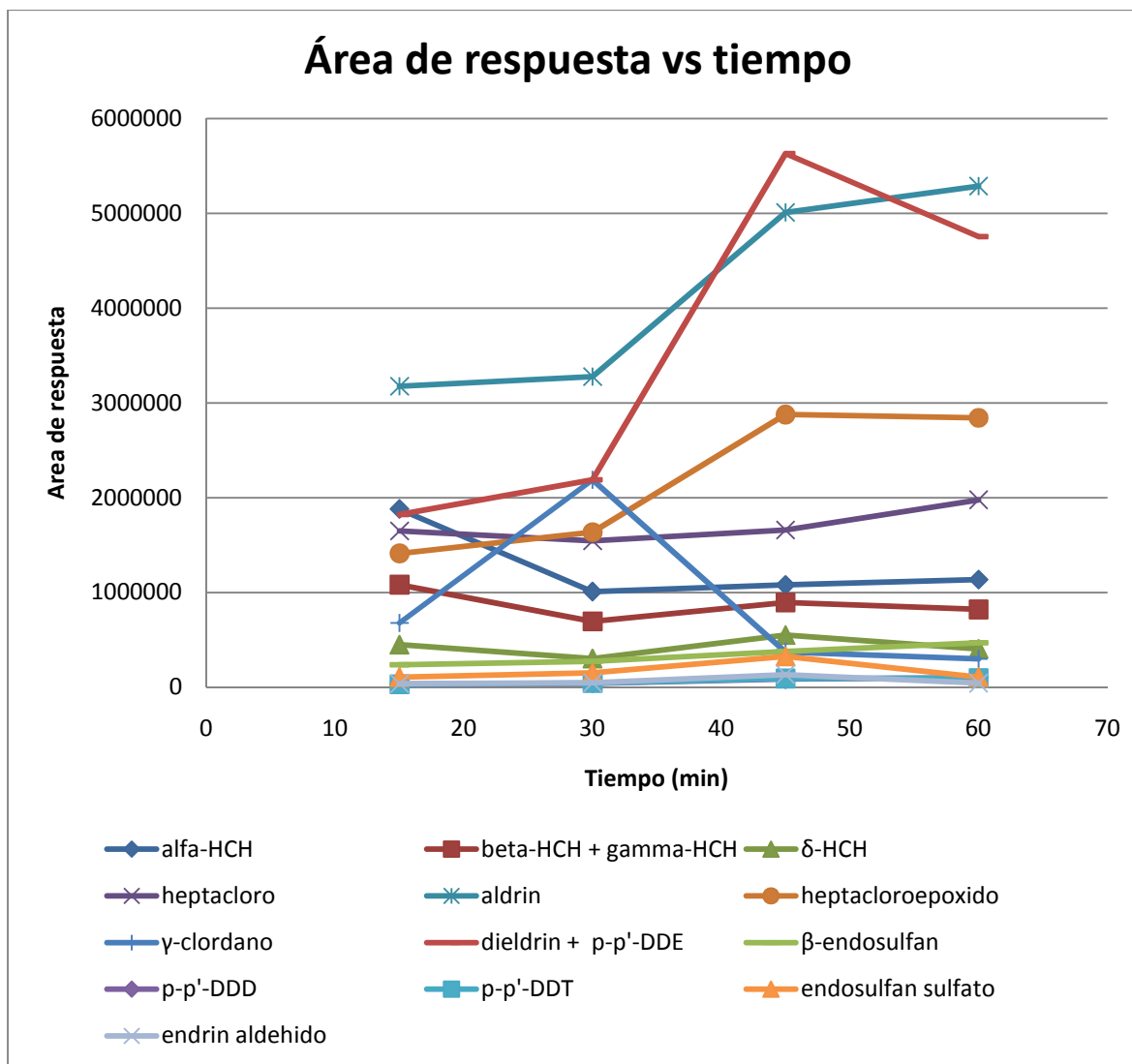
En este gráfico puede verse que el mejor tratamiento es aquel que no usa NaCl y usa un volumen de espacio en cabeza que corresponde a los $3/5$ del total del volumen del vial. La razón área de analito/área del IS es proporcional a la razón de concentraciones de ambas especies, por lo tanto, mientras mayor es esta razón, mayor es la cantidad de analito extraído cuando la concentración del IS se mantiene constante. La razón a la cual puede deberse que un volumen menor del HS sea mejor que la del volumen mayor es que con un volumen de HS de $3/5$ (1,6mL) el suero que da diluído a la mitad con el agua destilada agregada (solución de suero 1:2) de modo que el efecto más matriz es menor cuando la solución de suero se aproxima mediante dilución a una simple disolución acuosa. Sin embargo, para confirmar una sospecha de este tipo se necesita probar cómo se modifica la pendiente de una curva de calibración cuando aumento o disminuye la dilución de la muestra de suero.

ANEXO 9.**Determinación del tiempo de duración de la extracción con el método SPME.**

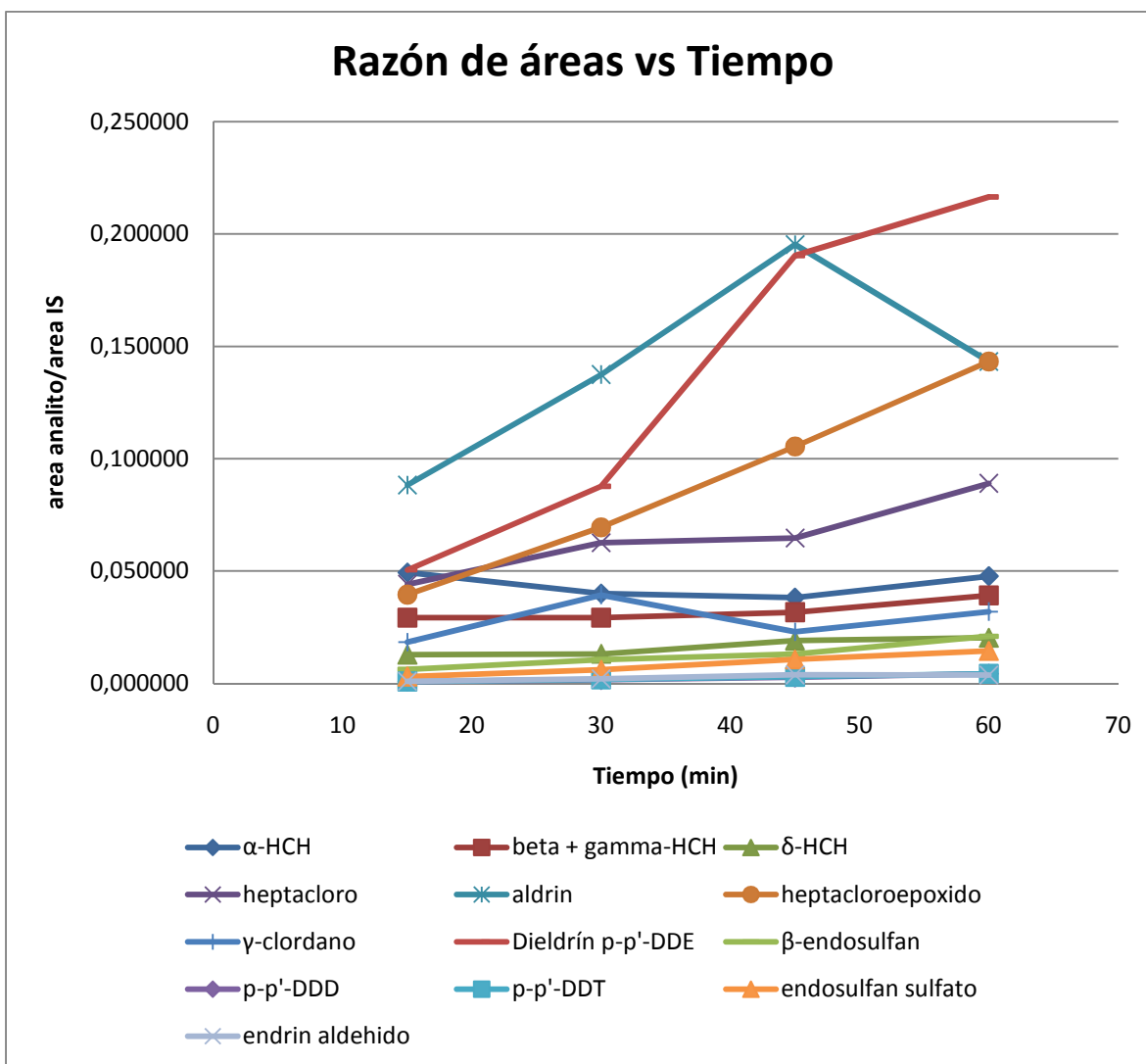
		área de respuesta			
		Tiempo (min)			
t_R NCI	compuesto	15	30	45	60
21,35	α-HCH	1879272	1008724	1079086	1135812
22,55	γ-HCH	1081888	694293	893680	821126
22,69	PCNB	37961048	26766721	29201607	23816381
23,52	δ-HCH	449026	303044	551256	404867
24,91	heptacloro	1648811	1543825	1659142	1977156
26,01	aldrín	3175542	3276874	5007651	5286876
27,35	heptacloroepóxido	1411911	1636538	2876748	2842113
28,09	γ-clordano	678430	2188389	372826	300411
29,29	Dieldrín	1822785	2188389	5630252	4754781
30,26	β-endosulfán	236482	273288	378150	468564
30,59	p-p'-DDD	31647	41819	85980	99648
30,86	endrín aldehído	38637	46378	134499	43170
31,56	endosufán sulfato	108181	151927	325432	108181
31,56	p-p'-DDT	32484	45691	92538	95549

En la gráfica siguiente, distinguen cuatro tratamientos de la muestra. Cada uno de ellos se diferencian por el tiempo de extracción, ya que la muestra se prepara en un vial de 4mL con 500μL de suero de prueba, 50μL de ácido sulfúrico 9M, 50μL de solución estándar de la mezcla de compuestos organoclorados a concentración promedio de 80ng/mL y PCNB 1μg/mL, y 1mL de agua destilada.

El volumen del headspace ya se había fijado en 2,4mL aproximadamente (3/5).



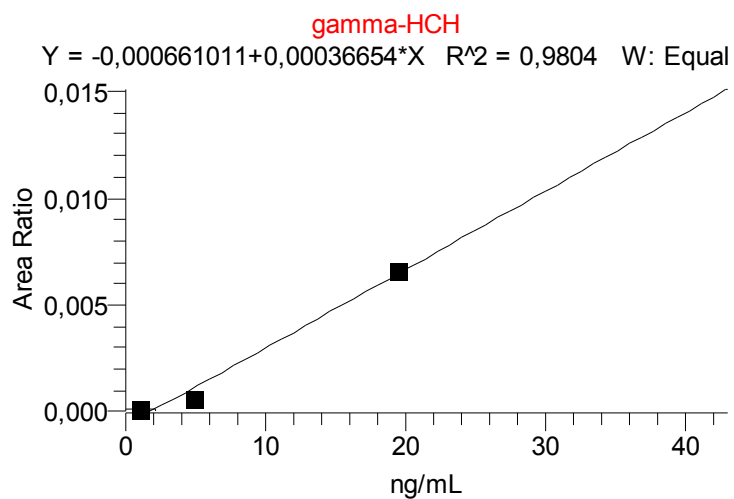
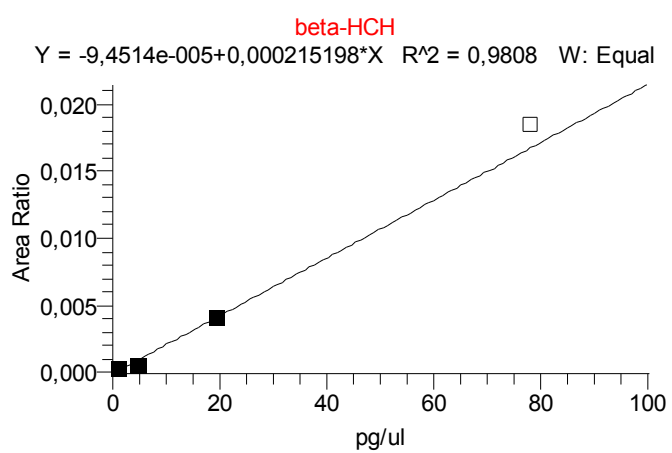
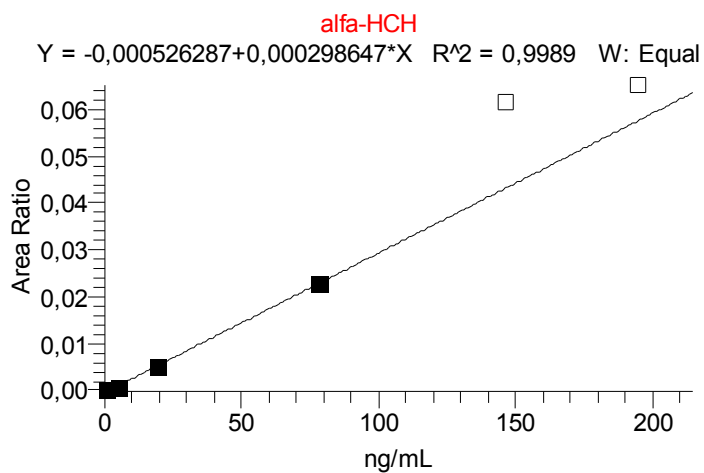
En esta gráfica se observa que con un tiempo de extracción de 45min, la mayoría de los pesticidas logran su mayor área de respuesta, lo que significa que a los 45min la extracción es máxima.

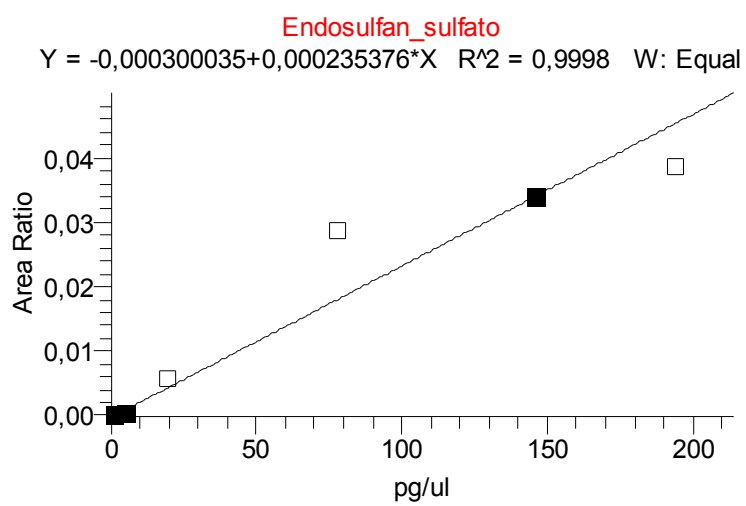
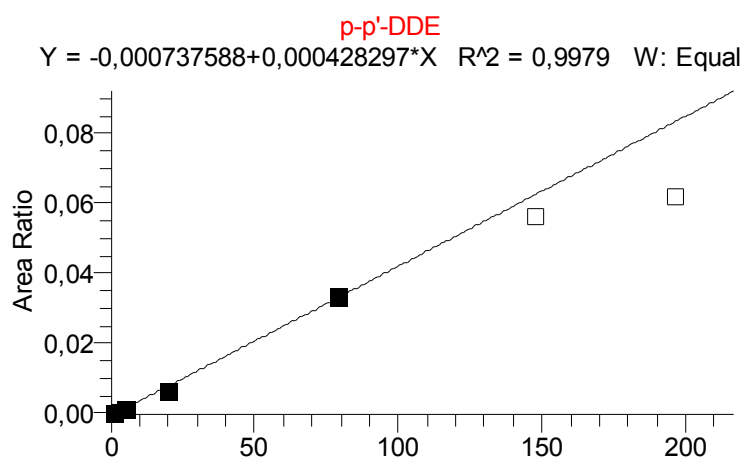
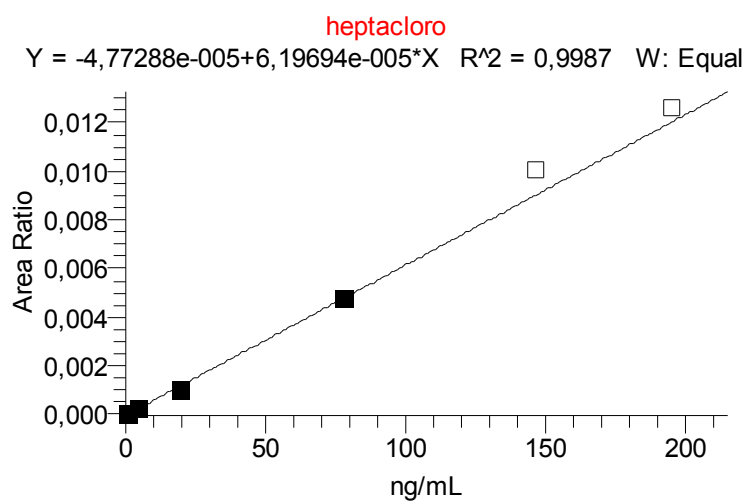


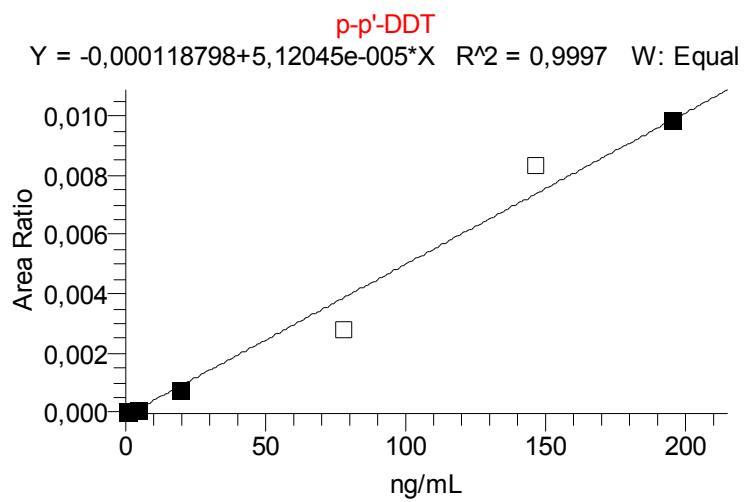
La razón de áreas es proporcional a la razón de concentraciones de los analitos con respecto al estándar interno. Se observa que mientras mayor es el tiempo, mayor es la cantidad de analito extraído. Finalmente se fijó un tiempo óptimo de extracción de 45min y un mayor tiempo de extracción no se justificaba teniendo en cuenta que bajo las condiciones fuertemente ácidas muchos de los pesticidas son inestables y se degradan, mientras que otros no presentaron una mejora notable en la extracción cuando se pasaba de los 45 a los 60min.

ANEXO 10

Curvas de calibración de pesticidas detectados en las muestras de suero de Lanco.







Nota: puntos en blanco son puntos excluidos de la curva de calibración. Cada curva tiene un mínimo de tres puntos.

ANEXO 11

Nombre de muestra	concentración de DDT (ng/mL)	Concentración de DDE	Concentración de α -HCH (ng/mL)	Concentración de β -HCH (ng/mL)	Concentración de γ -HCH (ng/mL)	Concentración de endosulfán sulfato (ng/mL)	Concentración de Heptacloro (ng/mL)	Total de pesticidas
05-DID-L	NF	NF	1,956	NF	1,860	NF	NF	2
06-DID-L	NF	NF	2,134	0,860	2,072	NF	1,779	4
07-DID-L	3,286	NF	8,737	2,590	3,074	NF	10,682	5
08-DID-L	3,466	2,709	1,937	NF	1,859	NF	NF	4
09-DID-L	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF	0
10-DID-L	NF	NF	NF	NF	1,892	1,379	1,217	3
11-DID-L	NF	NF	2,128	0,710	1,964	NF	NF	3
12-DID-L	NF	NF	2,029	NF	1,938	NF	NF	2
13-DID-L	NF	NF	NF	NF	1,818	NF	NF	1
14-DID-L	3,094	7,950	2,075	NF	1,903	NF	NF	4
15-DID	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF	0
16-DID	4,110	NF	NF	NF	2,044	NF	NF	2
17-DID	2,966	7,311	3,604	2,584	3,006	2,296	10,658	7
18-DID	NF	NF	NF	NF	1,922	NF	NF	1
19-DID	3,156	NF	2,843	NF	1,896	NF	NF	3
20-DID	NF	NF	3,123	1,306	2,313	NF	NF	3
21-DID	NF	NF	2,161	NF	2,231	NF	NF	2
22-DID-L	NF	NF	1,864	NF	1,810	NF	NF	2
23-DID-L	2,393	NF	2,066	0,838	2,084	NF	1,158	5
24-DID-L	NF	NF	1,860	NF	NF	NF	NF	1
25-DID-L	2,409	NF	NF	NF	1,888	NF	NF	2
26-DID-L	NF	NF	NF	NF	1,884	NF	NF	1
27-DID-L	NF	NF	NF	1,908	2,672	NF	NF	2
28-DID-L	NF	NF	1,958	NF	NF	NF	NF	1
29-DID-L	NF	3,122	1,966	0,829	2,006	NF	1,430	5
30-DID-L	NF	NF	1,972	0,567	1,874	NF	NF	3
31-DID-L	NF	NF	NF	NF	1,824	NF	NF	1
32-DID-L	NF	2,999	1,922	NF	1,869	NF	1,081	4
33-DID-L	NF	NF	3,183	1,267	2,285	NF	1,852	4
34-DID-L	2,834	3,686	1,886	NF	1,929	NF	NF	4
35-DID-L	NF	NF	2,088	0,862	2,038	NF	1,398	4
36-DID-L	NF	2,756	2,064	NF	1,873	NF	NF	3
37-DID-L	NF	3,485	NF	NF	1,881	NF	NF	2
38-DID-L	NF	2,699	2,229	1,147	2,280	NF	1,627	5
39-DID-L	NF	NF	2,024	NF	1,868	NF	NF	2
40-DID-L	NF	NF	NF	NF	1,820	1,324	NF	2
41-DID-L	NF	NF	1,897	NF	1,955	NF	2,048	3
42-DID-L	NF	NF	NF	NF	NF	NF	NF	0
43-DID-L	2,596	NF	NF	NF	1,808	NF	NF	2
PROMEDIO	3,031	4,080	2,468	1,289	2,042	1,666	3,176	
S.D.	0,523	2,048	1,385	0,701	0,314	0,546	3,717	
Número de muestras +	10	9	25	12	34	3	11	
% muestras positivas	25,64	23,08	64,10	30,77	87,18	7,69	28,21	

ANEXO 12

Estadísticas descriptivas de la variable de cruce

	Obs	Total	Media	Varianza	Desviación típica
a-HCH	25	61,7069	2,4683	1,9190	1,3853
b-HCH	12	15,4700	1,2892	,4919	,7013
DDE	9	36,7155	4,0795	4,1943	2,0480
DDT	10	30,3105	3,0311	,2739	,5233
Endosulfan sulfato	3	4,9985	1,6662	,2978	,5457
g-HCH	34	69,4374	2,0423	,0984	,3137
Heptacloro	11	34,9310	3,1755	13,8197	3,7175

	Mínimo	25%	Mediana	75%	Máximo	Moda
a-HCH	1,8605	1,9562	2,0636	2,1612	8,7365	1,8605
b-HCH	0,5675	0,8336	1,0047	1,6070	2,5900	0,5675
DDE	2,6986	2,7556	3,1222	3,6857	7,9501	2,6986
DDT	2,3931	2,5964	3,0301	3,2858	4,1101	2,3931
Endosulfan sulfato	1,3242	1,3242	1,3788	2,2955	2,2955	1,3242
g-HCH	1,8083	1,8689	1,9123	2,0716	3,0738	1,8083
Heptacloro	1,0813	1,2166	1,6266	2,0483	10,6819	1,0813

ANOVA, test paramétrico para comparación de medias

(Para datos normalmente distribuidos)

Variación	SC	gl	MS	Estadístico F
Entre grupos	56,7238	6	9,4540	3,9953
Intra grupo	229,5262	97	2,3662	
Total	286,2499	103		

Valor p= 0,0013

Bartlett's Test for Inequality of Population Variances

Bartlett's chi square= 121,8752 df=6 valor p=0,0000

Un valor de p pequeños (menor de 0,05) sugiere que las varianzas no son homogéneas y que el test ANOVA no es apropiado.

(Test de Kruskal-Wallis)

H de Kruskal-Wallis (equivalente a Chi cuadrado)= 48,8491

Grados de libertad= 6

Valor p= 0,0000