

 XOCHIMILCO SERVICIOS DE INFORMACION
ARCHIVO HISTORICO

83771

UNIVERSIDAD AUTONOMA METROPOLITANA
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS



***“EVALUACION DE LA PRESENCIA DE RESIDUOS DE PLAGUICIDAS Y
SUBSTANCIAS QUIMICAS DE USO VETERINARIO (SULFONAMIDAS Y
NITROFURANOS) EN LECHE PASTEURIZADA COMERCIALIZADA EN EL
DISTRITO FEDERAL”***

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTORA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
P R E S E N T A
NORMA ALICIA PEREZ FLORES

COMITE TUTORAL:

TUTOR: DR. GILBERTO DIAZ GONZALEZ
ASESOR INTERNO: DR. HECTOR LUNA CONTLA
ASESOR EXTERNO: DR. MARIO NOA PEREZ

MEXICO DISTRITO FEDERAL, MAYO DEL 2003.

“El Doctorado en Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma Metropolitana pertenece al Padrón de Posgrados de Excelencia del CONACyT y además cuenta con apoyo del mismo Consejo, con el Convenio PFP-200-93”.

El jurado designado por las Divisiones de Ciencias Biológicas y de la Salud de las
Unidades Iztapalapa y Xochimilco
aprobó la tesis que presentó

Norma Alicia Pérez Flores

El día 4 de julio del año de 2003

Jurado:

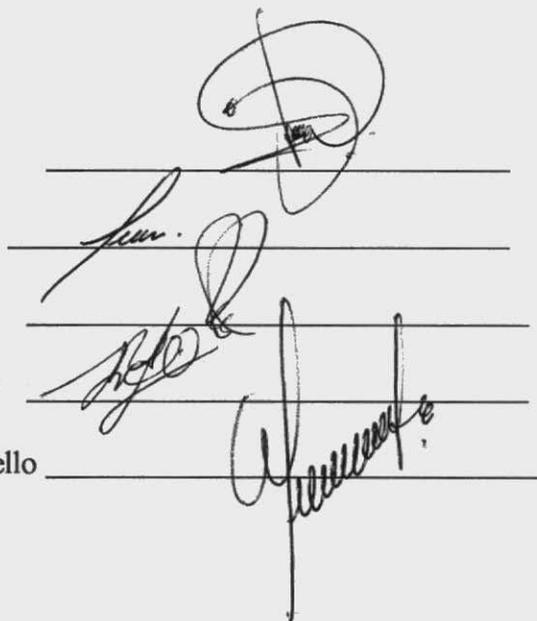
Tutor: Dr. Gilberto Díaz González

Asesor: Dr. Héctor Luna Contla

Asesor: Dr. Mario Noa Pérez

Sinodal: Dr. Salvador Vega y León

Sinodal: Dr. Alfonso Vázquez Botello



The image shows five horizontal lines, each corresponding to a name in the list above. Handwritten signatures are written over these lines. From top to bottom: 1. A large, stylized signature for Dr. Gilberto Díaz González. 2. A signature for Dr. Héctor Luna Contla. 3. A signature for Dr. Mario Noa Pérez. 4. A signature for Dr. Salvador Vega y León. 5. A signature for Dr. Alfonso Vázquez Botello.

AGRADECIMIENTOS

A mi comité tutorial por guiarme de manera experta en esta búsqueda del conocimiento.

A los doctores Salvador Vega y León, Alfonso Vázquez Botello y Mariano García Garibay por el tiempo que dedicaron a la revisión de este documento y sus sugerencias para mejorarlo.

A mis amigos y compañeros Rey Gutiérrez, José Salas, Ma. Magdalena González, Irma Escobar y Zenaida Munive porque gracias a su apoyo alcancé esta meta.

Al M.en C. Isidro Osuna y al Biol. Héctor Zazueta por las facilidades brindadas para el análisis de los plaguicidas organofosforados.

A mi familia, la felicidad de mi vida

RESUMEN

El objetivo de este trabajo fue determinar la presencia de residuos de 9 antimicrobianos (6 sulfonamidas y 3 nitrofuranos) y 13 plaguicidas organofosforados en 4 marcas de leche pasteurizada, de amplia distribución, comercializadas en el Distrito Federal. El muestreo se realizó quincenalmente durante un año. Además se evaluó la estabilidad de los residuos bajo estudio en presencia de dicromato de potasio y bicloruro de mercurio, sustancias frecuentemente usadas para prolongar el tiempo de almacenamiento de muestras de leche destinadas para análisis químicos.

El análisis de sulfonamidas y nitrofuranos se realizó por cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) con detector ultravioleta. Para el análisis de los plaguicidas organofosforados se utilizó la cromatografía de gases con detector fotométrico de flama (FPD). Se determinaron los parámetros de calidad de las metodologías utilizadas para asegurar que los resultados obtenidos fueran confiables. La selectividad, sensibilidad, linealidad, precisión y exactitud fueron adecuadas para el análisis de residuos.

Se encontraron residuos de sulfonamidas en las 4 marcas de leches pasteurizadas analizadas. En las leches A, B y D, se encontraron residuos de las 6 sulfonamidas estudiadas: sulfatiazol, sulfamerazina, sulfametazina, sulfametoxazol, sulfamonometoxina y sulfacloropiridazina, en cambio en la leche C no aparecieron residuos de las últimas dos. Los porcentajes de muestras positivas a sulfonamidas fueron: 47.7% (leche A), 58.3% (leche B), 44.7%(leche C) y 50% (leche D). Los residuos más frecuentes fueron sulfatiazol, sulfamerazina y sulfametazina. Los niveles promedio totales de residuos estuvieron entre 0.4 y 4.2 µg/kg. De las 96 muestras analizadas, sólo la leche B presentó 3 muestras con niveles de sulfonamidas (sulfamerazina, sulfatiazol, sulfametoxazol) superiores al límite máximo de residuos permitido (LMR).

No se detectaron residuos de los nitrofuranos: nitrofurazona, furazolidona y furaltadona en ninguna muestra de las leches estudiadas.

Se encontraron residuos de plaguicidas organofosforados (POF) en las 4 marcas de leche analizadas, en algunas muestras con uno o varios residuos de plaguicidas por encima de los LMR establecidos. De los 13 plaguicidas estudiados sólo el coumafós no apareció en ninguna de ellas. Los porcentajes de muestras positivas a residuos de POF fueron: 29.2% (leche A), 44.7% (leche B), 37.5% (leche C) y 50% (leche D). Los POF que aparecieron con mayor frecuencia fueron diclorvos, forato y diazinón. El 8.3% del total de muestras de leche analizadas (n = 96) presentaron niveles de POF que sobrepasaron los límites aceptables. Los plaguicidas en niveles objetables fueron: diclorvos, clorfenvinfos, forato y clorpirifos. Sólo una muestra de la leche A presentó niveles de POF por encima del LMR; las leches C y D, 2 y la leche B, 5.

La adición de dicromato de potasio como conservador en muestras de leche cruda, en un nivel del 0.1%, no interfiere en la estabilidad de residuos de sulfonamidas y nitrofuranos en un lapso de 6 a 7 días, dependiendo del antimicrobiano, por lo que se puede recomendar su uso cuando sea necesario prolongar el tiempo de conservación de las muestras. El bicloruro de mercurio en un nivel del 0.05% también puede usarse, salvo para medir residuos de sulfatiazol, ya que aparentemente este antibacteriano se descompone.

La conservación de muestras de leche cruda con dicromato de potasio (0.1%) o con bicloruro de mercurio (0.05%) puede afectar a algunos de los plaguicidas organofosforados en leche. El dicromato de potasio aparentemente afectó los plaguicidas mevinfos y paratión metílico, y el bicloruro de mercurio los plaguicidas: diclorvos, clorpirifos, forato, dimetoato, mevinfos y paratión metílico.

ABSTRACT

The aim of this work was to determine the presence of 9 antimicrobials (6 sulfonamides and 3 nitrofurans) and 13 organophosphorus pesticides residues in four commercial pasteurized milk brands, with a wide distribution in Mexico City. Samples were taken every two weeks during one year.

In this work it was also investigated the stability of the antimicrobials and organophosphorus pesticides residues under study, in the presence of preservative substances such as potassium dichromate and mercuric bichloride, which are commonly added to increase milk sample storage when sampling and analyses may not be done immediately.

Sulfonamides and nitrofurans were analyzed by high performance liquid chromatography with ultraviolet detection and organophosphorus pesticides were analyzed by gas chromatography with a flame photometric detector (FPD). Quality parameters of the analytical methods used were determined to assure reliable data. Selectivity, sensibility, linearity, precision and accuracy attained were acceptable for residue analysis.

Sulfonamide residues were found in all commercial pasteurized milk brands analyzed. The six sulfonamides under study: sulfathiazole, sulfamethazine, sulfamerazine, sulfamethoxazole, sulfachloropyridazine and sulfamonomethoxine were detected in milks A, B and D, but in milk C the last two were not present. Percentages of positive samples to sulfonamides residues were: 47.7% (milk A), 58.3% (milk B), 44.7% (milk C) and 50% (milk D). Higher frequencies were observed for the sulfonamides: sulfamerazine, sulfathiazole and sulfamethazine. Total average sulfonamides residues were between 0.4 – 4.2 µg/kg. From the 96 milk samples investigated only 3 contained sulfonamides residues

(sulfamerazine, sulfathiazole, sulfamethoxazole) over the maximum residue limits (MRL) established.

Nitrofurazone, furaltadone and furazolidone residues were not present in any milk sample analyzed.

Organophosphorus pesticides, OP, residues were detected in the 4 pasteurized milk brands analyzed and in some samples one or several OP were over the maximum residues limits tolerated. Of the 13 pesticides investigated only coumaphos was not present in any of them. Percentages of positive samples to OP residues were: 29.2% (milk A), 44.7% (milk B), 37.5% (milk C) y 50% (milk D). Higher frequencies were observed for the OP: dichlorvos, phorate and diazinon. From the 96 milk samples under study, 8.3% presented violative residue levels of dichlorvos, chlorfenvinphos, phorate and chlorpyrifos. Milk A only presented one sample with residue levels over the MRL, milks C and D, two and milk B, five.

The addition of potassium dichromate (0.1%) to raw milk samples did not affect the stability of the sulfonamides and nitrofurans under study, during a storage period of 6 to 7 days, depending on the antimicrobial. Mercuric bichloride (0.05%) could also be used, except for the analysis of sulfathiazole residues, which apparently degraded in the presence of this preservative.

Preservation of raw milk samples with potassium dichromate (0.1%) or mercuric bichloride (0.05%) may affect the stability of some organophosphorus pesticides. Potassium dichromate (0.1%) apparently affected: mevinphos and methyl parathion, and mercuric bichloride (0.05%): dichlorvos, chlorpyrifos, phorate, dimethoate, mevinphos and methyl parathion.

INDICE

	Página
ANTECEDENTES.....	14
1. REVISION BIBLIOGRAFICA	
1.1 Sulfonamidas.....	20
1.2 Nitrofuranos.....	28
1.3 Plaguicidas organofosforados.....	33
2. MATERIALES Y METODOS	
2.1 Materiales.....	46
2.2 Técnica de análisis multiresiduos de sulfonamidas y nitrofuranos.....	46
2.3 Técnica de análisis multiresiduos de plaguicidas organofosforados.....	50
2.4 Estandarización de las técnicas de análisis.....	52
2.5 Estabilidad de los residuos de sulfonamidas y nitrofuranos en muestras de leche adicionadas con agente conservador.....	53
2.6 Estabilidad de los residuos de plaguicidas organofosforados en muestras de leche adicionadas con agente conservador.....	55
3. RESULTADOS Y DISCUSION	
3.1 Estandarización de la técnica de análisis multiresiduos de sulfonamidas y nitrofuranos.....	57

	Página
3.2 Estandarización de la técnica de análisis multiresiduos de plaguicidas organofosforados	65
3.3 Determinación de la presencia de residuos de sulfonamidas y nitrofuranos en leche comercializada en el Distrito Federal.....	70
3.4 Determinación de la presencia de residuos de plaguicidas organofosforados empleados para uso pecuario y en pastos, en leche comercializada en el Distrito Federal.....	78
3.5 Efecto de la adición de agentes conservadores en la estabilidad de los residuos de sulfonamidas y nitrofuranos en muestras de leche cruda.....	88
3.6 Efecto de la adición de agentes conservadores en la estabilidad de los residuos de plaguicidas organofosforados en muestras de leche cruda.....	95
4. CONCLUSIONES.....	101
5. RECOMENDACIONES.....	103
6. BIBLIOGRAFÍA.....	104

ANEXO

ARTICULO CIENTIFICO: Pérez N., Gutiérrez R., Noa M., Díaz G., Luna H., Escobar I., Munive Z., (2001) Liquid Chromatographic Determination of Multiple Sulfonamides, Nitrofurans and Chloramphenicol Residues in Pasteurized Milk. J. AOAC Int. 85 (1): 20-24

INDICE DE TABLAS

	Página
Tabla 1.1 Métodos empleados para el monitoreo de residuos de sulfonamidas en leche	23
Tabla 1.2 Métodos instrumentales para el análisis de sulfonamidas en leche.....	26
Tabla 1.3 Dosis letal media (oral en rata), intervalo de seguridad o tiempos de espera, ingesta diaria admisible (humanos) y límites máximos de residuos de plaguicidas organofosforados autorizados en México para uso en bovinos, pastos y otros cultivos utilizados en alimentación animal.....	41
Tabla 1.4 Métodos utilizados en el análisis de residuos de plaguicidas organofosforados en leche.....	42
Tabla 3.1 LECHE A. Límite máximo de residuos (LMR), % de muestras positivas, % de muestras positivas con niveles de residuos (ppb) mayores al LMR permitido para sulfonamidas y nitrofuranos y la relación X/LMR (n= 24 muestreos).....	71
Tabla 3.2 LECHE B. Límite máximo de residuos (LMR), % de muestras positivas, % de muestras positivas con niveles de residuos (ppb) mayores al LMR permitido para sulfonamidas y nitrofuranos y la relación X/LMR (n= 24 muestreos).....	72

Tabla 3.3 LECHE C. Límite máximo de residuos (LMR), % de muestras positivas, % de muestras positivas con niveles de residuos (ppb) mayores al LMR permitido para sulfonamidas y nitrofuranos y la relación X/LMR (n= 24 muestreos).....	73
Tabla 3.4 LECHE D. Límite máximo de residuos (LMR), % de muestras positivas, % de muestras positivas con niveles de residuos (ppb) mayores al LMR permitido para sulfonamidas y nitrofuranos y la relación X/LMR (n= 24 muestreos).....	74
Tabla 3.5 Número de muestras de leche positivas a la presencia de residuos de sulfonamidas y nitrofuranos en las 4 marcas de leche analizadas (n = 96).....	75
Tabla 3.6 LECHE A. Límites máximos de residuos permitidos, % de muestras positivas con residuos de plaguicidas organofosforados, % de muestras que sobrepasan los LMR, valores promedio de los residuos encontrados y la relación de este promedio con respecto al LMR (X/LMR) para 24 muestreos.....	79
Tabla 3.7 LECHE B. Límites máximos de residuos permitidos, % de muestras positivas con residuos de plaguicidas organofosforados, % de muestras que sobrepasan los LMR, valores promedio de los residuos encontrados y la relación de este promedio con respecto al LMR (X/LMR) para 24 muestreos.....	80

Tabla 3.8 LECHE C. Límites máximos de residuos permitidos, % de muestras positivas con residuos de plaguicidas organofosforados, % de muestras que sobrepasan los LMR, valores promedio de los residuos encontrados y la relación de este promedio con respecto al LMR (X/LMR) para 24 muestreos.....	81
Tabla 3.9 LECHE D. Límites máximos de residuos permitidos, % de muestras positivas con residuos de plaguicidas organofosforados, % de muestras que sobrepasan los LMR, valores promedio de los residuos encontrados y la relación de este promedio con respecto al LMR (X/LMR) para 24 muestreos.....	82
Tabla 3.10 Número de muestras positivas a la presencia de plaguicidas organofosforados de cuatro marcas de leche estudiadas (n = 96).....	83
Tabla 3.11 Valores del percentil al 95 de los plaguicidas organofosforados presentes en el total (n=96) de muestras de leche pasteurizada analizadas y sus LMR.....	85
Tabla 3.12 Porcentajes de recuperación promedio, mínimos y máximos de residuos de sulfonamidas y nitrofuranos en leche conservada con dicromato de potasio (0.1%) en refrigeración, durante un periodo de 7 días y las pérdidas en los porcentajes de recuperación alcanzadas para el día 7.....	90

Tabla 3.13 Porcentajes de recuperación promedio, mínimos y máximos de residuos de sulfonamidas y nitrofuranos en leche conservada con bicloruro de mercurio (0.05%) en refrigeración, durante un periodo de 7 días y las pérdidas en los porcentajes de recuperación alcanzadas para el día 7..... 94

Tabla 3.14 Porcentajes de recuperación promedio, mínimos y máximos de residuos de plaguicidas organofosforados en muestras de leche conservada con dicromato de potasio (0.1%) en refrigeración, durante un periodo de 7 días..... 96

Tabla 3.15 Porcentajes de recuperación promedio, mínimos y máximos de residuos de plaguicidas organofosforados en muestras de leche conservada con bicloruro de mercurio (0.05%) en refrigeración, durante un periodo de 7 días..... 97

Tabla 3.16 Estabilidad de residuos de plaguicidas organofosforados en muestras de leche con conservador almacenada en refrigeración durante siete días, medida a través de la pérdida en los porcentajes de recuperación..... 98

INDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1.1 Estructuras moleculares de las sulfonamidas cuyos residuos pueden aparecer en leche.....	22
Figura 1.2 Estructuras moleculares de los nitrofuranos cuyos residuos pueden aparecer en leche.....	30
Figura 1.3 Estructuras moleculares de los plaguicidas organofosforados que pueden aparecer como residuos en leche.....	38
Figura 3.1 Cromatogramas de: A) Mezcla estándar de sulfonamidas (50 ng/ml de cada uno): 1) sulfatiazol, 2)sulfamerazina, 3) sulfametazina, 4) sulfamonometoxina, 5) sulfacoloropiridazina y 6) sulfametoxazol. B) Leche control negativo. C) Leche fortificada con la mezcla estándar a un nivel de 50 ppb.....	60
Figura 3.2 Cromatogramas de: A) Mezcla estándar de nitrofuranos (50 ng/ml de cada uno): 1) nitrofurazona , 2) furazolidona, 3) furaltadona. B) Leche control negativo. C) Leche fortificada con la mezcla estándar a un nivel de 50 ppb.....	61

Figura 3.3 Cromatogramas de plaguicidas organofosforados. A) Mezcla de estándares de trabajo: 1: Diclorvos, 2: Mevinfos, 3: Forato, 4: Dimetoato, 5: Disulfotón, 6: Metil-paratión, 7: Malatión, 8: Fentión, 9: Clorpirifos, 10: Clorfenvinfos, 11: Etión, 12: Zolone + Gutión, 13: Coumafos. B) Muestra de leche control. C) Muestra de leche contaminada (0.050 mg/l) con mezcla de estándares de trabajo..... 67

Figura 3.4 Estabilidad de residuos de sulfonamidas en muestras de leche cruda conservadas con dicromato de potasio (0.1%) y bicloruro de mercurio (0.05%) durante 7 días en refrigeración..... 91

Figura 3.5 Estabilidad de residuos de nitrofuranos en muestras de leche cruda conservadas con dicromato de potasio (0.1%) y bicloruro de mercurio (0.05%) durante 7 días en refrigeración..... 92

Figura 3.6 Estabilidad de residuos de plaguicidas organofosforados en muestras de leche cruda conservadas con dicromato de potasio (0.1%) y bicloruro de mercurio (0.05%) durante 7 días en refrigeración..... 99

ABREVIATURAS

AOAC Asociación Oficial de Químicos Analíticos

ARN ácido ribonucleico

CCF cromatografía en capa fina

CG cromatografía de gases

FAO Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación

FDA Administración de Alimentos y Medicamentos de EE.U.U.

FDP detector fotométrico de flama

FIL federación internacional de lechería

HPLC cromatografía de líquidos de alta resolución

HPTLC cromatografía en capa fina de alta resolución

LDM límite de detección del método

NPD detector nitrógeno-fósforo

OMS Organización Mundial de la Salud

POF plaguicidas organofosforados

SCP sulfacloropiridazina

SMM sulfamonometoxina

SMR sulfamerazina

SMT sulfametazina

SMX sulfametoxazol

STZ sulfatiazol

ANTECEDENTES

La utilización de medicamentos de uso veterinario y de algunos plaguicidas organofosforados en el ganado productor de leche es una práctica común para prevenir y controlar enfermedades en el mismo. Por otro lado, los plaguicidas organofosforados también se utilizan en el control de plagas y enfermedades de cultivos destinados a la alimentación del ganado lechero, como pastos, alfalfa, sorgo y maíz, entre otros. Cuando estas sustancias se aplican inadecuadamente pueden generar residuos tóxicos en la leche.

Los medicamentos y plaguicidas autorizados para usarse en el ganado lechero deben especificar tiempos de espera entre la administración del medicamento y el ordeño de la leche para consumo. De la misma manera los plaguicidas utilizados en la producción de pastos y cultivos destinados a la alimentación animal, también deben indicar tiempos de espera entre su aplicación y la cosecha. La aparición de residuos en la leche se debe generalmente a que no se respetan estos tiempos de espera o se usan dosis excesivas (sin seguir las indicaciones de la etiqueta), o cuando se usan medicamentos no permitidos en las vacas lecheras o plaguicidas no autorizados.

Entre los residuos de medicamentos más comunes en la leche se encuentran las sulfonamidas y nitrofuranos, que se usan para el control de enfermedades infecciosas en la vaca, especialmente en la mastitis (inflamación de la ubre) y los plaguicidas organofosforados que se aplican como ectoparasiticidas para el control de moscas y garrapatas, principalmente.

La Federación Internacional de Lechería, FIL (Honkanen y Reybroeck, 1997; Heeschen y col., 1997) señala que los residuos de sulfonamidas, nitrofuranos y plaguicidas organofosforados en la leche pueden generar efectos tóxicos en los humanos, en especial en

los niños, ya que por su alto consumo en este alimento y su bajo peso corporal pueden resultar más sensibles a estas sustancias.

Se ha señalado que los antimicrobianos, entre ellos sulfonamidas y nitrofuranos, pueden influir en la inducción de resistencia microbiana, desórdenes de la flora intestinal y reacciones alérgicas (Honkanen y Reybroek, 1997). Algunos como la sulfametazina y la furazolidona se consideran carcinogénicos.

Los daños a la salud ocasionados por los plaguicidas organofosforados están relacionados con su capacidad de inhibir la enzima colinesterasa que interviene en la transmisión de los impulsos nerviosos. Sus efectos tóxicos a largo plazo se han estudiado en trabajadores expuestos cotidianamente a esas sustancias. Entre ellos se mencionan: efectos neurotóxicos y conductuales; influencia positiva en la aparición del mal de Parkinson; exacerbación de enfermedades infecciosas; leucemia linfocítica crónica (Ortega y col., 1994). Algunos se consideran teratogénicos y carcinogénicos (INE, 2000).

Los posibles efectos tóxicos de los residuos de medicamentos veterinarios y plaguicidas en la leche han llevado a las autoridades sanitarias de los países a establecer límites máximos de estos residuos en ella para poder garantizar la inocuidad de este importante alimento. A nivel internacional la Organización Mundial de la Salud (OMS) y la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO), han formado un programa conjunto, a través del Codex Alimentarius, para establecer y recomendar los límites máximos de residuos de medicamentos de uso veterinario y plaguicidas en la leche. A nivel nacional, cada país implanta sus propias regulaciones al respecto. Se ha observado que en los países donde se tienen programas periódicos de seguimiento de residuos en la leche se ha logrado disminuir su incidencia (Honkanen y Reybroek, 1997).

En México no existen normas oficiales que regulen la presencia de sulfonamidas, nitrofuranos y plaguicidas organofosforados en leche. Sólo existe la NOM 091-SSA1-1994 sobre disposiciones y especificaciones sanitarias en leche pasteurizada, donde se señalan algunos inhibidores bacterianos pero no incluyen sulfonamidas o nitrofuranos. A pesar de que en nuestro país desde 1984 se estableció un Programa Nacional de Control de Residuos Tóxicos, Biológicos y Contaminantes en tejidos animales para consumo humano (Romero, 1997), cuyo responsable es la Secretaría de Agricultura, Ganadería y Pesca, éste sólo ha tenido un avance importante en el análisis y control de estos residuos en carne, probablemente debido a la necesidad de exportar carne de alta calidad sanitaria. Albert (1997) señala que en México la legislación y normatividad sobre la presencia de residuos tóxicos en alimentos aún está incompleta, lo que impide garantizar plenamente la calidad sanitaria de los alimentos.

La producción de alimentos de alta calidad y sin residuos tóxicos es una exigencia en los países desarrollados, a la cual tienden los países en vías de desarrollo. Esto principalmente debido a que los consumidores están cada vez más preocupados por su salud y mejor informados sobre los efectos tóxicos que algunos residuos pueden generar. A pesar de esto, la presencia de residuos tóxicos en alimentos sigue siendo un problema vigente.

La presencia de residuos de sulfonamidas en leche ha sido informada en varios países: Costa Rica (Monge y col., 1993), Alemania (Grether y col., 1994), Italia (Ferrini y col., 1994) y Estados Unidos (Zomer y col., 1992; Schwart y Lightfield, 1995). Sólo en las leches de Italia y Costa Rica se encontraron niveles de residuos por encima de los máximos recomendados internacionalmente.

En la literatura no se encontraron informes sobre la presencia de residuos de nitrofuranos en leche, aunque sí en alimentos destinados a la alimentación animal (Bautista y col., 1995). y en algunos otros alimentos de origen animal como carne de pollo y huevo (Kumar y col., 1994) y en hígado de cerdo ((Horne y col., 1996).

En el caso de los residuos de plaguicidas organofosforados también se han detectado en la leche producida en países como: Francia (Venant y col., 1989), Estados Unidos (Yess y col., 1991), Egipto (Abd-Alla y col., 1991; El-Hoshy, 1997), Cuba (Noa y col., 1992), Australia (Spradbery y Tozer, 1996) y Eslovenia (Ganick y col., 2000). En casi todos los estudios realizados, excepto en Francia y Eslovenia, se encontraron algunas muestras con residuos superiores a los límites máximos permitidos.

En México, en la época en que se realizó este trabajo, estaban señalados para uso en ganado lechero: 6 sulfonamidas, 3 nitrofuranos y 5 ectoparasiticidas organofosforados (Directorio de Medicina Veterinaria, Nutrición y Zootecnia, 1997). Además en el Catálogo Oficial de Plaguicidas (CICOPLAFEST, 1997) estaban autorizados para uso pecuario (en bovinos) y agrícola (pastizales, alfalfa y otros cultivos usados en alimentación del ganado lechero como maíz, sorgo y soya) 13 plaguicidas organofosforados.

JUSTIFICACION

En México, de acuerdo a la revisión bibliográfica realizada, no existen trabajos publicados sobre la presencia de residuos de medicamentos veterinarios y POF en leche pasteurizada comercializada en el Distrito Federal, por lo que sería deseable estudiar la situación actual de los niveles de estas sustancias y en caso de ser necesario, tratar de colaborar con las instancias adecuadas para su prevención.

El establecimiento de un programa de detección y prevención de la presencia de residuos en la leche es un instrumento útil para promover los niveles de calidad necesarios en este sentido, y constituye una necesidad real imperiosa desde el punto de vista económico actual. Por otro lado, los requerimientos comerciales actuales en el mundo tienen como parte indispensable el control de los residuos y contaminantes más comunes, por lo que resulta imposible acceder a este mercado sin desarrollar dicho control de forma sistemática.

El desarrollo de metodologías para el análisis de residuos tóxicos en los alimentos abre la posibilidad de brindar asesoría y capacitación a productores lecheros y a la industria láctea.

En México no existe una norma oficial que establezca el límite máximo de residuos permisibles para sulfonamidas, nitrofuranos y plaguicidas organofosforados en leche. Por lo que los resultados obtenidos en esta investigación podrían ser de utilidad como base para hacer una propuesta de norma nacional para el control de estos residuos en leche pasteurizada.

HIPOTESIS

La presencia de algunas sustancias químicas de uso veterinario como plaguicidas organofosforados, sulfonamidas y nitrofuranos en la leche pasteurizada comercializada en el Distrito Federal alcanza niveles dañinos para la salud humana.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar la presencia de residuos de sustancias químicas de uso veterinario en la leche pasteurizada comercializada en el Distrito Federal.

OBJETIVOS ESPECIFICOS:

OBJETIVO 1: Medir la presencia de residuos de las sulfonamidas y nitrofuranos usados por el servicio veterinario en leche pasteurizada comercializada en el Distrito Federal.

OBJETIVO 2: Determinar la presencia de los plaguicidas organofosforados empleados para uso pecuario y en pastos en leche pasteurizada comercializada en el Distrito Federal.

OBJETIVO 3: Determinar si la adición de agentes conservadores a las muestras de leche afecta la concentración de los residuos de sulfonamidas, nitrofuranos y plaguicidas organofosforados estudiados.

1. REVISION BIBLIOGRAFICA

1.1 Sulfonamidas

Las sulfonamidas son un grupo de compuestos orgánicos sintéticos, que tienen una amplia actividad antibacteriana (actúan contra gérmenes gram positivos y negativos). Su núcleo base es el ácido p-aminobenzen-sulfónico. Tienen efecto bacteriostático porque interfieren en la asimilación del ácido p-aminobenzoico, necesario para la producción del ácido fólico por las bacterias, lo que deprime la síntesis de ADN. Cuando se usan combinadas tienen efectos sinérgicos y su combinación con trimetropim es a menudo bactericida. En medicina veterinaria también se les usa combinadas con antibióticos (Sumano y Ocampo, 1997).

Metabolismo.- Las sulfas son metabolizadas por el hígado y varios otros tejidos. Durante su metabolismo se oxidan y forman derivados con el ácido glucurónico. También pueden acetilarse (Sumano y Ocampo, 1997).

Excreción.- Las sulfonamidas se excretan principalmente por el riñón, aunque también se eliminan por heces, bilis, sudor y en la leche de los animales lactantes en concentraciones muy similares a las de la sangre (Sumano y Ocampo, 1997). La velocidad de excreción de las sulfonamidas es variable. Paulson y col. (1994) observaron la presencia de residuos de sulfametazina en leche de vaca en niveles de 20 ppb, 4 días después de administrada la dosis y de 2 ppb después de 7 días. Por otro lado, Mitchell y col. (1999) informaron que cuando administraron alimento adicionado con dosis muy altas de sulfametazina (250 mg/kg de alimento), se encontraron residuos de esta sustancia en niveles de 21-120 µg/L mientras el alimento se administró, pero por otra parte a los 2 días de retirado el alimento ya no se detectaron residuos. Sheleih y col. (1997) encontraron

residuos de sulfametazina en leche de búfalas después de 108 horas de haberla administrado por vía intravenosa.

Toxicidad aguda.- midriasis, debilidad muscular, ataxia, colapso y posible muerte.

Toxicidad crónica.- baja de peso, inhibición del crecimiento, reacciones en la piel, daños en el tejido hematopoyético. La sulfametazina (sulfadimidina) se considera carcinogénica.

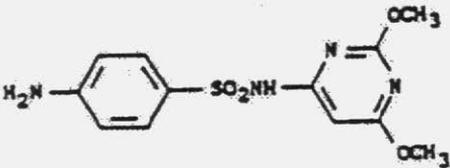
Límites máximos de residuos en leche: El Codex Alimentarius y La Unión Europea establecen 100 $\mu\text{g/L}$ para cualquier sulfonamida, excepto la sulfametazina, que por sus posibles efectos carcinogénicos el LMR es de 25 $\mu\text{g/L}$. La FDA, en Estados Unidos, establece un LMR de 10 $\mu\text{g/L}$ para esta misma sulfonamida (Honkanen y Reybroeck, 1997).

De acuerdo con el Directorio de Medicina Veterinaria, Nutrición y Zootecnia (1997), en México se usan en forma mayoritaria en el ganado productor de leche 6 sulfonamidas: sulfatiazol, sulfamerazina, sulfametazina, sulfamonometoxina, sulfametoxazol y sulfacloropiridazina, sus fórmulas estructurales se presentan en la Figura 1.1. Se les encuentra en mezclas de 2 a 3 de ellas, combinadas con trimetropin y en algunos casos mezcladas con antibióticos.

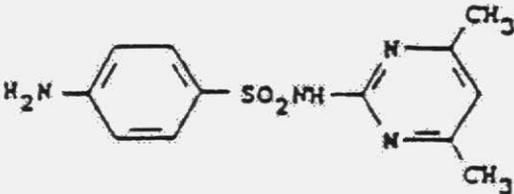
La aplicación de estos medicamentos está indicado para casos de mastitis, infecciones respiratorias, gastrointestinales y genitourinarias. Las vías de administración pueden ser oral o inyectable.

Figura 1.1 Estructuras moleculares de las sulfonamidas cuyos residuos pueden aparecer en leche.

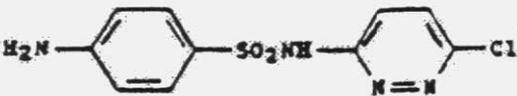
Sulfamonometoxina



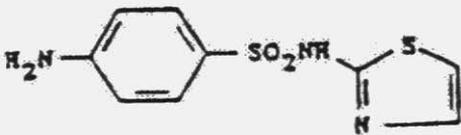
Sulfametazina



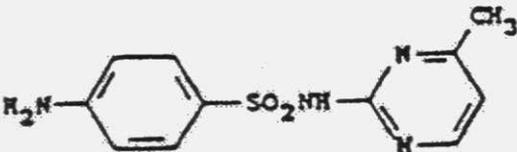
Sulfacoloropiridazina



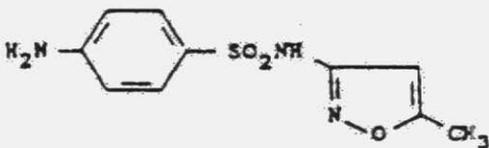
Sulfatiazol



Sulfamerazina



Sulfametoxazol



En todas las presentaciones comerciales de estos medicamentos veterinarios se indican tiempos de espera entre su aplicación a las vacas y la recolección de leche para consumo. Los tiempo fluctúan de 3 a 5 días en mezclas que sólo contiene sulfonamidas y trimetropin, y de 3 a 14 días en algunas mezclas con antibióticos.

Métodos de análisis de sulfonamidas

La determinación de residuos de sulfonamidas en leche puede realizarse a diferentes niveles. Existen pruebas de monitoreo (para detectar muestras positivas a la presencia de antimicrobianos) y pruebas de confirmación e identificación. Las pruebas de monitoreo de sulfonamidas se basan en la inhibición del desarrollo de un microorganismo (Tabla 1.1).

Tabla 1.1 Métodos empleados para el monitoreo de residuos de sulfonamidas en leche.

Método	Microorganismo	Sensibilidad	Referencia
Ensayo de disco	<i>B. stearothermophilus</i>	0.1 – 1 µg/ml	Monge y col. , 1993
Reducción del negro brillante (BRT)	<i>B. stearothermophilus</i>	0.1 – 1 µg/ml	Heeschen, 1993
Valio T 101	<i>S. thermophilus</i>	0.5 - 2.5 µg/ml	Carlsson y Björck, 1991
Arla microtest	<i>B. subtilis</i>	1.0 µg/ml	Charm y Ruth 1991
Charm II	Receptor microbiano	2.5 µg/kg 10 µg/kg	Ferrini y col. , 1994
Prueba en placa	<i>B. subtilis</i>	≥10 µg/kg	Nouws y col., 1999

Estas pruebas son de utilidad para trabajos de monitoreo por su amplio espectro de detección, su fácil manejo, la posibilidad de trabajar sin equipo sofisticado ni personal entrenado y su relativamente bajo costo. No obstante, estas pruebas tienen la desventaja de ser inespecíficas y que algunas sustancias del mismo grupo se detectan con mayor o menor sensibilidad, dependiendo de su forma de actuar sobre el microorganismo de prueba (Suhren y Heeschen, 1996).

Como puede observarse en la Tabla 1.1, una parte de estos métodos no cumplen con el requisito de sensibilidad requerido indispensable para alcanzar el nivel del LMR de sulfonamidas en leche. Por esta razón fue necesario diseñar otros métodos analíticos que cumplieran con dicho requisito, y que, además, fueran capaces de identificar positivamente al compuesto específico presente. Las pruebas de confirmación pueden ser por inhibición microbiana, receptor microbiano, receptor de anticuerpos, inmunoensayo, cromatografía en capa fina (CCF), cromatografía en capa fina de alta resolución (HPTLC), cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) o espectrofluorométricos. Algunas de estas pruebas sirven, además, para identificar la sulfonamida presente.

Las pruebas de receptor microbiano se basan en que la mayoría de las sustancias antibióticas actúan uniéndose específicamente a un sitio en el microorganismo, causando una interrupción de la actividad metabólica. En estas pruebas se detectan grupos o familias de sustancias y tienen la ventaja de ser más específicas que las técnicas de monitoreo (Petz, 1990). Otros métodos son los inmunoenzimáticos: en este grupo Grether y col. (1994) y Wu y col. (1999) diseñaron pruebas de ELISA con límites de detección inferiores a 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$.

Los análisis cromatográficos instrumentales permiten identificar y cuantificar con

precisión los residuos de sulfonamidas. Son los que más se utilizan actualmente, sin embargo, son análisis costosos, que implican mayor tiempo y personal capacitado. En la tabla 1.2 se presentan algunas de las metodologías informadas en la literatura.

El análisis de residuos de sulfonamidas en leche por HPLC consta de varias partes: extracción de los residuos de la matriz, purificación y análisis cromatográfico. Como las sulfonamidas son bastante solubles en disolventes polares, generalmente la extracción se realiza con cloroformo, diclorometano, acetona, acetonitrilo o acetato de etilo. Además algunos de estos disolventes tiene la ventaja de que desnaturalizan las proteínas de la leche, lo que produce extractos más limpios y favorecen la extracción de los residuos que están unidos a las proteínas. La purificación de los residuos se realiza por reextracción de las sulfonamidas en un medio acuoso, a un pH determinado (éste factor es crítico para lograr recuperaciones adecuadas) o por extracción en fase sólida, en algunas metodologías más modernas. Una vez purificado el extracto, los residuos se detectan y cuantifican por HPLC; principalmente se utiliza la fase reversa (con columnas C_{18}) y utilizando como fase móvil mezclas de buffer con metano o acetonitrilo. La detección puede hacerse con detectores UV o arreglo de diodos UV-VIS.

Tabla 1.2 Métodos instrumentales para el análisis de sulfonamidas en leche.

TÉCNICA ANALÍTICA	CONDICIONES DE ANÁLISIS	SENSIBILIDAD	REFERENCIA
HPTLC	Placas de silicagel para HPTLC. Identificación con fluorescamina. Cuantificación por densitometría fluorescente a 366 nm	ng	Knupp y col. , 1986 Sherma y Duncan, 1986
HPLC	Columna C ₁₈ con buffer acetato de sodio 0.01 M, pH 4.6: acetonitrilo. Detector UV a 270 nm	10 µg/kg	Hoffmeister y col., 1991
HPLC	Columna C ₁₈ , fase móvil buffer acetato (pH 4.7)/ metanol. Detector: arreglo de diodos	< 10 µg/kg	Agarwal, 1993
HPLC	Columna C ₁₈ , fase móvil buffer acetato (pH 4.5)/ acetonitrilo Detector: UV con arreglo de diodos	3 µg/kg	Ferrini y col., 1994
Espectrofluorometría	Primera derivada Primera y segunda derivada	6 -21 µg/kg para sulfapiridazina 0.7 -2.7 µg/kg para sulfanilamida	Mahedero y col., 1994 a y b
HPLC	Fase reversa con detector de arreglo de diodos	10 µg/L	AOAC (Método oficial), 1995
HPLC	Fase reversa con detector de espectrometría de masas de ionización química a presión atmosférica	10 a 100 ng	Combs y col., 1996

Problemática mundial de residuos de sulfonamidas

En varios estudios realizados en Estados Unidos entre 1985 y 1990, se encontraron muestras de leche positivas a sulfonamidas con niveles de residuos entre 5 y 75 $\mu\text{g}/\text{kg}$. A partir de estos resultados la FDA (Departamento de alimentos y drogas de EE.U.U.) introdujo valores de seguridad para sulfonamidas en leche de 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$, aunque la Comunidad Económica Europea (CEE) aprobó un contenido de 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ para residuos totales de sulfonamidas y el CODEX adoptó 25 $\mu\text{g}/\text{kg}$ para sulfametazina (CEE, 1992; CODEX, 1997).

En un estudio desarrollado en leche comercial en Estados Unidos, Zomer y col. (1992) detectaron residuos de sulfametazina, sulfametoxina y sulfatiazol, entre otros. Más tarde Schwartz y Lightfield (1995) al analizar 250 muestras de leche, sólo encontraron 2 muestras con niveles de sulfametazina de 10 ppb y el resto con niveles de 1 ppb en su mayoría.

Hoffmeister y col. (1991) analizaron 215 muestras de leche, procedentes de 8 países europeos para determinar residuos de sulfonamidas, utilizando ensayos de inhibición microbiana (BR- Test, Enterotox AS y Delvotest SP), así como por el Charm Test II y un método inmunoenzimático. Las muestras positivas o dudosas a la presencia de sulfonamidas por las técnicas anteriores fueron analizadas por HPLC para determinar sulfadimidina, pero en ningún caso se pudo encontrar esta sustancia.

Monge y col. (1993) informaron que de 200 muestras analizadas en San José de Costa Rica, un 9% de la leche cruda y un 2% de la leche pasteurizada presentaron inhibidores, incluyendo antibióticos y sulfonamidas

En Alemania Grether y col. (1994) encontraron 6 muestras de leche cruda y 5 de

leche UHT contaminadas con sulfadimidina, de un total de 197 y 252 analizadas respectivamente, aunque los autores consideraron que estos resultados positivos se deberían tomar con reserva por la antigüedad de las muestras.

En la zona de Lazio, Italia, Ferrini y col. (1994) refirieron un 37% de muestras positivas para sulfonamidas en un estudio realizado en 102 muestras de leche cruda. Los niveles de residuos informados fueron de 3.2 - 19.7 $\mu\text{g}/\text{kg}$. La sulfametazina fue el residuo más común (19 muestras); también identificaron sulfamerazina (2 muestras) y sulfaquinoxalina (3 muestras).

Mellgren y col.(1996) en Suecia, encontraron 6 muestras positivas a sulfametazina, de 330 analizadas, en niveles inferiores al LMR.

En Eslovenia, Ganick y col. (2000) analizaron 406 muestras de leche y ninguna presentó residuos de sulfonamidas.

A la fecha, en México no se han encontrado trabajos publicados sobre la presencia de residuos de sulfonamidas en leche.

1.2 Nitrofuranos

Son compuestos sintéticos derivados del furano; tienen un amplio espectro, principalmente dirigido a bacterias gramnegativas, algunos hongos y protozoarios.

Los nitrofuranos en general actúan disminuyendo los procesos oxidativos en la bacteria y esto reduce la generación de energía aprovechable por los gérmenes destruyéndolos. Su mecanismo de acción antibacteriano presenta dos aspectos: inhibición del metabolismo de carbohidratos y rompimiento de la cadena de ARN por parte de los metabolitos secundarios de los nitrofuranos (Sumano y Ocampo, 1997).

Según el Directorio de Medicina Veterinaria y Zootecnia (1997), en México se encuentran en uso 3 nitrofuranos, que son nitrofurazona, furazolidona y furaltadona, cuyas estructuras se muestran en la Figura 1.2.

La nitrofurazona generalmente se usa a nivel local, en el tratamiento de heridas y quemaduras. En el ganado adulto se emplea en el tratamiento de la mastitis como secador (Sumano y Ocampo, 1997).

La furazolidona o furoxona es muy útil para el tratamiento de enteritis e infecciones por *Salmonella spp.*, *E. coli*, *Enterobacter spp.* y *Shigella spp.* Se emplea en becerros para el tratamiento de la diarrea a dosis entre 5 y 20 mg/kg.

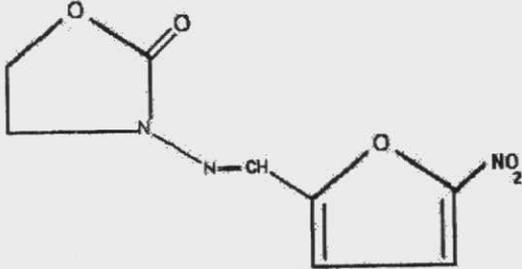
La furaltadona se ha utilizado básicamente en el tratamiento de la mastitis, aplicándola por vía intramamaria a razón de 500 mg/cuarto. Se informa que su vida media en leche puede ser desde 13 minutos hasta 2.5 horas en prurumiantes (Sumano y Ocampo, 1997).

Metabolismo.- Los nitrofuranos se absorben rápido por el tracto gastrointestinal. El 40% de las dosis administradas son excretadas por la orina sin sufrir cambio alguno y el resto lo metaboliza el organismo animal.

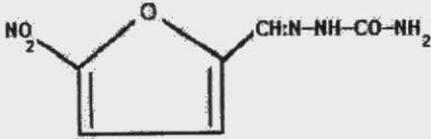
Toxicidad aguda.- La furazolidona es sumamente tóxica por vía oral cuando se administra a becerros. Dosis tan bajas como 3 mg/ kg. producen en uno o dos días parálisis del tren posterior, a menudo irreversible, y dosis más altas llegan a producir convulsiones. Pueden causar también daños en la médula ósea produciendo hemorragias y cambios hemáticos.

Figura 1.2 Estructuras moleculares de los nitrofuranos cuyos residuos pueden aparecer en leche.

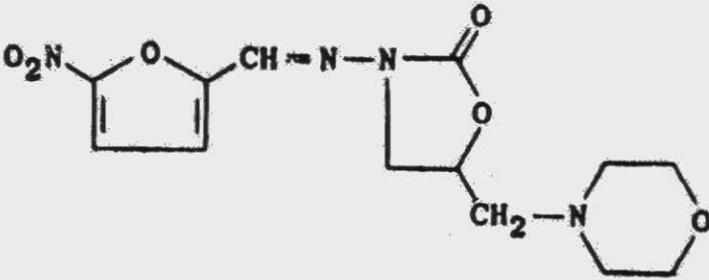
Furazolidona



Nitrofurazona



Furaltadona



Toxicidad crónica.- La administración continua de nitrofurazona es capaz de reducir la ingestión de alimentos. Por estas razones, se contraindica el uso de la nitrofurazona en los becerros. Se han detectado alteraciones funcionales inducidas por residuos de furazolidona en alimentos sobre un tipo de células tumorales intestinales (Vincentini y col. , 1993).

Límites máximos de residuos.- No obstante su amplio uso en veterinaria, no existe una reglamentación homogénea respecto a su empleo. Por ejemplo, en Canadá está prohibida la venta de derivados del 5-nitrofurano para su utilización en animales productores de alimentos, en cambio en España, Galeano y col. (1994) mencionan que existen formulaciones de mezclas de nitrofuranos que se administran con los alimentos, sobre todo en explotaciones de tipo intensivo. En Estados Unidos no se admite la aparición de sus residuos en alimentos desde hace años (Hapke y Grahwit, 1987), mientras en la Comunidad Económica Europea se toleran 5 µg/kg en músculo y vísceras, no así en leche (CEE, 1992).

El control de residuos de nitrofuranos en alimentos de origen animal es un esfuerzo que se hace internacionalmente. La Comisión Mixta de Expertos en Aditivos Alimentarios de la FAO/OMS (1992) en su Reunión No. 40 revisó los aspectos de seguridad de los residuos de furazolidona y nitrofurazona, sin embargo, ambos compuestos se encuentran incluidos en el listado de sustancias ante las cuales el CODEX no ha tomado aún ninguna medida (CODEX, 1997), por lo que el asunto de la presencia de estos residuos en la leche no es aún un tema concluido.

En México no existe una norma que regule el contenido de residuos de nitrofuranos

en leche.

Métodos de análisis de nitrofuranos

Existen en la actualidad en el mundo un buen número de métodos analíticos que permiten analizar nitrofuranos en leche y otros alimentos de origen animal con suficiente sensibilidad y precisión. Debido a que son extremadamente fotosensibles su análisis requiere de precauciones.

Entre las técnicas analíticas para la determinación de nitrofuranos en leche se han utilizado la cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) y la cromatografía en capa fina de alta resolución (HPTLC).

Degroodt y col. (1992) diseñaron una técnica de HPLC en fase reversa con detección por arreglo de diodos para la determinación de nitrofuranos y cloranfenicol en carnes y pescado, con una sensibilidad de 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ para nitrofurazona y furazolidona y 2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ para furaltadona.

Galeano y col. (1994) detectaron nitrofurantoina, furazolidona y furaltadona por HPLC; utilizaron columna de fase reversa de alta velocidad (0.46 cm d.i., 3.3 cm de largo) y como fase móvil buffer de acetatos (pH 3.7) con acetonitrilo. La detección se hizo en UV a 360 nm. El análisis en muestras de leche fortificadas con nitrofuranos a concentraciones entre 0.25 a 0.50 $\mu\text{g}/\text{g}$ arrojó niveles de recuperación entre 79.2 y 87.6%.

Etcherhoff y Petz (1994), aplicaron la técnica de HPTLC en placas de silicagel para detectar furazolidona, nitrofurazona, furaltadona y nitrofurantoina. Los residuos se extrajeron con acetonitrilo. La separación de los nitrofuranos en la placa se hizo con la fase móvil metanol- ácido acético glacial (70-30 v/v) y la detección se realizó por derivatización con piridina, para producir derivados fluorescentes. El límite de detección obtenido fue

menor de 0.5 µg/kg y los niveles de recuperación de la técnica estuvieron entre 54 y 94%.

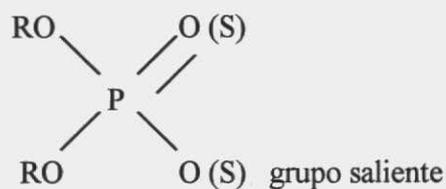
Problemática mundial de los residuos de nitrofuranos

En la literatura mundial no se encontraron informes sobre la presencia de residuos de nitrofuranos en leche, aunque sí en alimentos destinados a la alimentación animal (Bautista y col., 1995) y en algunos otros alimentos de origen animal. Horne y col. (1996) detectaron residuos de furazolidona en niveles entre 1.6-2.1 µg/g en hígado de cerdos tratados (6 días después del retiro) y Bellomonte y col. (1993) encontraron residuos de nitrofurazona, furazolidona y furaltadona, entre 10-20 ppb, en hígado de pollos medicados (3 días después del retiro). Kumar y col. (1994) encontraron residuos de furaltadona en carne de pollo (1 día después del retiro) y en huevo (3 días después del retiro).

En México, Bautista y col. (1995) encontraron furazolidona y nitrofurazona en alimentos comerciales para pollos de engorda, cuya información en la etiqueta no indicaba la presencia de estas sustancias, mientras estos mismos autores revelan que las concentraciones en alimentos destinados al consumo humano sobrepasan los valores establecidos internacionalmente al efecto.

1.3 Plaguicidas organofosforados

Son ésteres orgánicos del ácido fosfórico, con fórmula estructural general:



Los grupos R son etilos o metilos generalmente. De acuerdo a la unión del átomo de fósforo con oxígeno o con azufre se clasifican en : ortofosfatos (unido a 2 átomos de oxígeno), ditiofosfatos (unido a 2 átomos de azufre), tionofosfatos (P=O, P-S), tiolfosfatos (P=S, P-O). Atendiendo a la naturaleza del grupo saliente puede ser alcano, alqueno o aromático, entre otros (Hassal, 1990; Repetto y col., 1996).

Los plaguicidas organofosforados (POF) son sustancias muy solubles en disolventes orgánicos y presentan de poca a moderada solubilidad en agua. A pesar de que son liposolubles su bioacumulación en los seres vivos es poca comparada con sus congéneres clorados, muchos de los cuales ya están prohibidos mundialmente como es el caso del DDT, eldrín y dieldrin, entre otros.

Se considera que los POF son poco persistentes en el ambiente y biodegradables, por ello su uso se ha incrementado en el control de plagas y enfermedades tanto en agricultura como en ganadería, pues son muy efectivos en el control de insectos y ácaros. Sin embargo, debido a sus efectos nocivos a la salud humana y por su alto uso agrícola, industrial y doméstico, en Estados Unidos se están reevaluando para determinar si es necesario cancelar los registros y prohibir el uso de algunos de ellos (Cortinas, 2001).

Degradación en el medio ambiente.- El calor, la luz, el aire, el pH y los microorganismos pueden degradar los POF en el medio ambiente. Las principales reacciones que sufren los POF son hidrólisis, reducción y oxidación.

Metabolismo.- En general el metabolismo de los POF en los seres vivos consiste en la transformación de las moléculas originales en compuestos más polares y solubles que faciliten el transporte y excreción de estos metabolitos. Las principales reacciones que ocurren son hidrólisis, oxidación y conjugación, ésta última casi siempre después de que ocurren las dos

primeras. Los metabolitos oxidados de algunos POF se convierten en inhibidores de la acetilcolinesterasa más potentes que el compuesto original, esto ocurre más comúnmente en insectos que en vertebrados (Hassal,1990).

En los humanos las enzimas que intervienen principalmente en el metabolismo de plaguicidas son hidrolasas (esterasas, amidasas), oxigenasas (sistema monooxigenasa del citocromo P₄₅₀, del retículo endotelial de los hepatocitos) y transferasas (glutación y glucuroniltransferasas) [Hassal,1990].

Excreción.- Los POF y sus metabolitos se eliminan por la orina y las heces. Además pueden excretarse en la leche de los mamíferos (Hassal, 1990; Repetto y col., 1996).

Toxicidad.- Todos los POF deben sus efectos tóxicos a la inhibición de la enzima colinesterasa que interviene en la transmisión de los impulsos nerviosos. La toxicidad de los POF depende de varios factores: estructura, concentración, persistencia, metabolismo, niveles de exposición y sensibilidad del individuo (Repetto y col., 1996).

Toxicidad aguda.- Las manifestaciones clínicas más frecuentes son dolor de cabeza, mareos, debilidad, falta de coordinación, temblores, náusea, diarrea, salivación y miosis, que pueden complicarse con broncoconstricción, edema pulmonar, parálisis respiratoria y muerte, dependiendo de la gravedad de la intoxicación (Palacios y col., 1999).

Neuropatía intermedia.- Se presenta después de uno a tres días de la intoxicación aguda, comprende debilidad y parálisis de los músculos proximales de las extremidades y de los flexores del cuello. Es un cuadro severo producido por algunos POF como: dimetoato, fentión, metamidofós y monocrotofós (Repetto y col., 1996).

Neuropatía retardada.- Aparece después de dos o tres semanas de una intoxicación aguda. Comienza con calambres agudos en las pantorrillas, adormecimiento de pies y a veces de manos y finalmente debilidad en los mismos. Algunos de los POF que pueden producir este

problema son: clorpirifos, dimetoato, metamidofós, triclorfón, entre otros (Repetto y col., 1996).

Toxicidad Crónica.- A través de estudios epidemiológicos se ha informado que los POF pueden causar: alteraciones emocionales, disminución de la capacidad de concentración y de la memoria, parkinsonismo y exacerbación de enfermedades infecciosas, entre otros (Palacios y col., 1999; Ortega y col., 1994). Algunos POF se consideran carcinogénicos (diclorvos), inductores de tumores (fentión, naled, paratión) y teratogénicos (etiión, forato) [Moses, 1992; INE, 2000].

La CICOPPLAFEST (Comisión Intersecretarial para el Control del Proceso y Uso de Plaguicidas, Fertilizantes y Sustancia Tóxicas), en la que participan las Secretarías de: Agricultura, Ganadería y Desarrollo Rural; Medio Ambiente, Recursos Naturales y Pesca; Salud; Comercio y Fomento Industrial, es quien se encarga de la regulación y control de los plaguicidas en México. Esta comisión edita el Catálogo Oficial de Plaguicidas, el cual contiene los plaguicidas autorizados en el territorio nacional, indicando sus usos, aplicaciones y presentaciones. Se estima que en México la importación de plaguicidas en los años de 1997, 1998 y 1999 fue de 89, 99 y 80 millones de kilogramos, respectivamente. Además de las 70 toneladas anuales producidas en el país en esos años (INE, 2000).

En México, los POF clorfenvinfos, clorpirifos etil, coumafos, diazinón, diclorvos, etiión y fentión están autorizados para uso pecuario (bovinos), se utilizan principalmente como garrapaticidas aunque algunos también se aplican contra larvas, moscas y piojos. Su forma de aplicación es en baños de inmersión o de aspersion (CICOPPLAFEST, 1997; Directorio de Especialidades Veterinarias, 1997).

Los POF autorizados para uso agrícola en pastizales y alfalfa son: clorpirifos etil, dimetoato (cygon), disulfotón (disyston), metil-paratión, diazinon, etión, fentión y malatión. Los anteriores y otros como el mevinfos (fosdrin) y forato se utilizan también en algunos cultivos como maíz, sorgo y soya (CICOPLAFEST, 1997) que se emplean mucho en la alimentación del ganado lechero. Estos dos últimos plaguicidas son de uso restringido, es decir que “sólo podrán ser adquiridos en las comercializadoras mediante la presentación de una recomendación escrita de un técnico oficial o privado que haya sido autorizado por el gobierno federal” (CICOPLAFEST, 1997). En la Figura 1.3 se presentan las fórmulas estructurales de todos los POF mencionados.

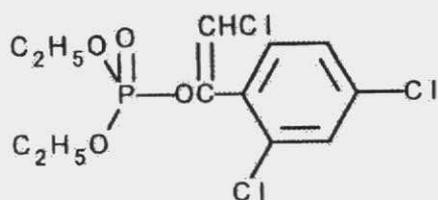
De acuerdo a la Asociación Mexicana de la Industria Fitosanitaria, los POF metil-paratión, clorpirifos, malatión, diazinón y mevinfos están entre los de mayor uso a nivel nacional (INE, 2000).

La clasificación por peligrosidad de los POF señalados varía entre extremadamente tóxicos y moderadamente tóxicos (DL_{50} oral en rata entre 5 y 2500 mg/kg) y su ingesta diaria admisible en el humano fluctúa entre 0.0005 y 0.02 mg/kg de peso corporal (Tabla 1.3).

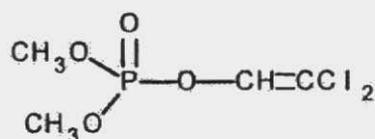
Los intervalos de seguridad que deben guardarse entre la aplicación del plaguicida y la recuperación de la cosecha, el pastoreo del ganado o la obtención de la leche de las vacas es de suma importancia para evitar la presencia de sus residuos. Sin embargo, en el Catálogo Oficial de Plaguicidas (1997) sólo 2 de los 6 plaguicidas para uso pecuario indican el intervalo de seguridad para leche. De los 11 de uso en pastos, forrajes y otros cultivos sólo el disulfotón no tiene señalado su intervalo de seguridad en los cultivos (Tabla 1.3), aunque señala que debe aplicarse en el momento de la siembra. En el Directorio

Figura 1.3 Estructuras moleculares de plaguicidas organofosforados que pueden aparecer como residuos en la leche.

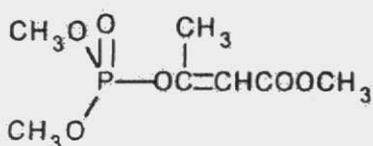
Clorfenvinfos



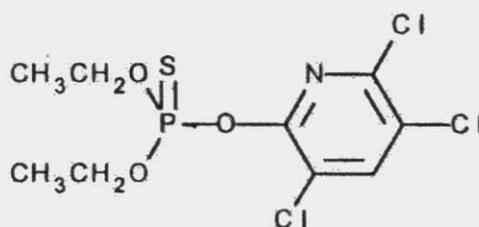
Diclorvos



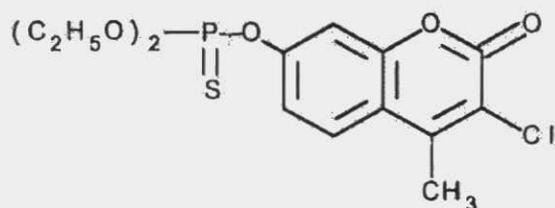
Mevinfos



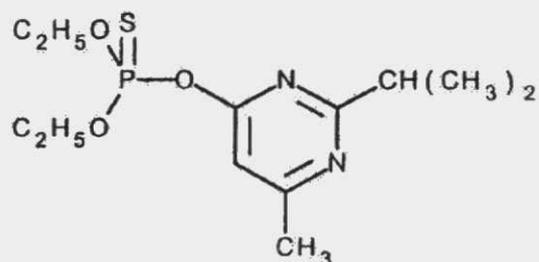
Clorpirifos



Coumafos

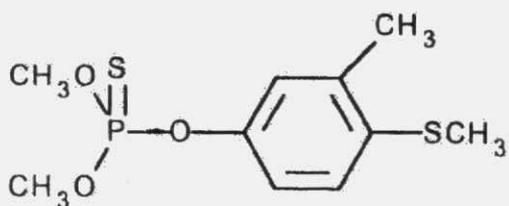


Diazinón

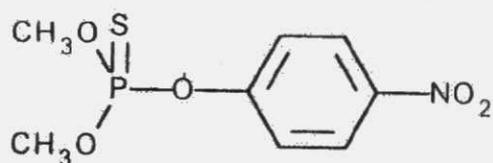


...continúa

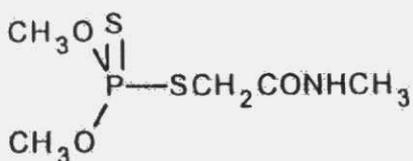
Fentión



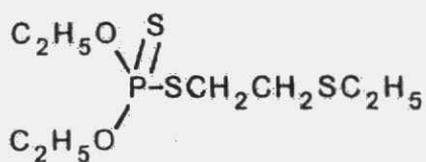
Metil paratión



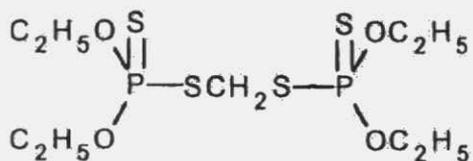
Dimetoato



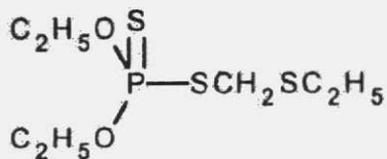
Disulfotón



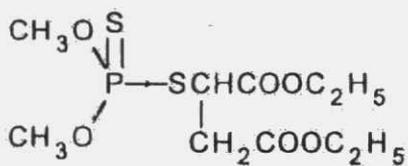
Etión



Forato



Malatión



de Especialidades Veterinarias (1997) no se señalan tiempos de espera entre la aplicación del plaguicida y la obtención de la leche.

En el Catálogo Oficial de Plaguicidas también se indican los límites máximos de residuos (LMR) permitidos en la leche (Tabla 1.3). Todos los plaguicidas mencionados de uso pecuario tienen señalados estos límites, los cuáles son semejantes a los establecidos por el Codex (1993), excepto para coumafos que es mucho menor (0.02mg/kg). En el caso de los de uso agrícola y pecuario, el fentión y el clorpirifos sí tienen establecido su LMR en leche, sin embargo, para el fentión el LMR del CODEX es mayor (0.05 mg/kg). De los 6 plaguicidas de uso agrícola que no tienen un LMR para leche, el CODEX sí da un límite de 0.02 mg/kg para el disulfotón y 0.05 mg/kg para el forato. En el Catálogo Oficial de Plaguicidas, todos los plaguicidas de uso agrícola tienen establecidos sus LMR en los cultivos donde está autorizado su uso, excepto para el disulfotón.

Métodos de análisis de plaguicidas organofosforados

Los residuos de plaguicidas organofosforados en leche se determinan por métodos como la cromatografía de gases (CG) y la de líquidos de alta resolución (HPLC). Aunque la primera es la más común (Tabla 1.4) utilizando detectores selectivos como el de nitrógeno-fósforo (NPD) y el fotométrico de flama (FPD) o acoplada a la espectrometría de masas.

Tabla 1.3 Dosis letal media (oral en rata), intervalo de seguridad o tiempos de espera, ingesta diaria admisible (humanos) y límites máximos de residuos de plaguicidas organofosforados autorizados en México para uso en bovinos, pastos y otros cultivos utilizados en alimentación animal.

Plaguicida (P)= Pecuario (A)= Agrícola	DL₅₀ oral en rata (mg/kg)	Intervalo de seguridad o tiempo de espera (días)	IDA (mg/kg de peso corporal)	LMR en leche (mg/kg)
Clorfenvinfos (P)	10	Leche (3-5 horas)	0.0005	0.008
Coumafos (P)	16	Bovinos (20)	0.0005	0.500
Diclorvos (P)	25-56	No indica	0.004	0.02
Diazinón (P y A)	1250	Leche (3) Alfalfa (10) Pastos (21)	0.002	0.02
Etion (P y A)	208	Sorgo (30) Maíz (50)	0.002	0.02
Clorpirifos (P y A)	96-270	Alfalfa y potreros (21)	0.01	0.01
Disulfotón (A)		No indica	0.003	No indica
Dimetoato (A)	200-320	Alfalfa (10)	0.01	No indica
Fention (P y A)	250	Bovinos (14) Pastizales (14) Alfalfa (Sin límite)	0.001	0.01
Forato (A)	2	Sorgo (30) 30 (maíz)	0.0005	No indica
Mevinfos (A)	3-7	Sorgo (3) Maíz (20)	0.0015	No indica
Malatión (A)	2500	Alfalfa y pastizales (Sin límite) Sorgo (7) Maíz (5)	0.02	No indica
Paratión-metilico (A)	6	Alfalfa y pastizales (15)	0.02	No indica

Fuente: CICOPLAFEST, 1992, 1997, 1999

Tabla 1.4 Métodos utilizados en el análisis de residuos de plaguicidas organofosforados en leche.

Plaguicida	Método	Referencia
Metil-paratión	CGL-FPD	Baynes y Bowen, 1995 a,b
Multiresiduos	CGL-FPD	AOAC, 1995
Diazinón	CGL-MS	Spradbery y Tozer, 1996
Multiresiduos	CGL-FPD/AFID	Analytical Methods for Pesticides in Foodstuffs, 1996
Malatión	HPLC-UV	Cannon y col., 1996
Multiresiduos	CGL-FPD	El-Hoshy, 1997
Clorfenvinfos	HPLC-UV	Kituyi y col., 1997
Multiresiduos	CGL-NPD	López-Avila y Benedicto, 1998
Clorpirifos	CGL-FPD	Bolles y col., 1999

CGL: cromatografía gas-líquido; HPLC: cromatografía de líquidos de alta resolución

NPD: detector de nitrógeno-fósforo; FPD: detector fotométrico de flama; UV: detector ultravioleta; MS: espectrometría de masas

En la mayoría de los métodos referidos en la Tabla 1.4, la extracción de los residuos de POF fue por partición líquido-líquido o por extracción en fase sólida. Algunas metodologías hacen además una purificación de los residuos extraídos mediante cromatografía en columna.

Problemática mundial de los residuos de plaguicidas organofosforados

Los plaguicidas autorizados para uso pecuario y en pastos, son por lógica los que mayores probabilidades tienen de estar presentes en la leche, aunque no se excluye la posible presencia de residuos debida al consumo de subproductos de otros cultivos como fuente de alimento.

Johnson y col. (1971) encontraron residuos de dimetoato en leche después del consumo de alfalfa contaminada, por lo que este plaguicida en particular podría aparecer como producto de la ingestión de pastos o forrajes tratados.

Un monitoreo de plaguicidas realizado en Estados Unidos por la FDA entre 1978 y 1982, que incluyó tanto organoclorados como organofosforados (Yess y col., 1991), indicó que de 2450 muestras comerciales de leche o crema analizadas, solamente el 1% contenía plaguicidas en concentraciones violatorias de la legislación, en tanto que de 52 muestras importadas, el 6 % sobrepasaba estos niveles.

En Francia Venant y col. (1989), en un estudio realizado entre 1980 y 1987, no detectaron plaguicidas organofosforados en 2777 muestras de leche analizadas.

Brathen (1990) reporta la aparición de organofosforados en mantequilla, en Noruega, dentro del límite admitido por FAO/WHO.

En Cuba, un monitoreo de plaguicidas organofosforados mostró un 30% de las muestras positivas a la presencia de clorfenvinfos y la aparición ocasional de residuos de organofosforados como malatión y metil-paratión, que no tienen uso directo en el tratamiento de los animales, como producto posiblemente de la contaminación ambiental en zonas cercanas a los establos (Noa y col. 1992).

Abd-Alla y col. (1991) reportaron en una zona de Egipto la presencia de malatión entre otros POF en leche, con una concentración promedio de 0.08 mg/kg en un rango de 0.002-0.526 mg/kg. Más tarde Abo-El-Nor y col. (1994) encontraron residuos de diazinón en leche 36 horas después de haberlo aplicado al ganado en baño de aspersion. Un estudio más reciente en este país (El-Hoshy,1997) señala la presencia de residuos de plaguicidas como diazinón, malatión y clorpirifos, con valores promedio entre 0.059 a 120.8 ppm, siendo el diazinón el de mayor frecuencia (33.86% de las muestras) y el que se encontró en algunas muestras en niveles objetables. En este mismo estudio los autores observaron que la pasteurización (62°C,0.5h) y la ebullición (5 min) de la leche con residuos de POF presentó una disminución de los mismos entre 44.68-70.54% y 55.32-78.1%, respectivamente, dependiendo del plaguicida. Las pérdidas mayores se dieron en diazinón y las menores en clorpirifos.

En Australia, Spradbery y Tozer (1996) encontraron que la leche de ganado lechero tratado con orejeras impregnadas con diazinón, presentó residuos de este plaguicida en el rango de 0.01-0.04 mg/kg, donde el nivel más alto sobrepasa el LMR del CODEX (0.02 mg/kg).

En Kenya, Kituyi y col. (1997) encontraron residuos de clorfenvinfos en leche, en niveles entre 1.18 y 10.40 µg/kg. De las 100 muestras que analizaron la mayoría presentó residuos por debajo del LMR establecido por el CODEX (8 µg/kg). Además observaron que la leche de vacas sometidas a baños de inmersión con este plaguicida presentó niveles de residuos más altos que cuando el baño fue de aspersion manual.

De acuerdo a la revisión bibliográfica realizada no se encontraron trabajos publicados sobre la presencia de residuos de POF en leche producida y comercializada en

México, aunque sí existen algunos estudios de la presencia de estos contaminantes en sistemas costeros (Osuna y col., 1998).

2. MATERIALES Y METODOS

2.1 Materiales

Se procesaron muestras procedentes de 4 marcas de leche pasteurizada. Los criterios para seleccionar estas marcas fueron su amplia distribución en el Distrito Federal, además de que tres de ellas (A, B y C) acopian leche de varios estados del país (Larrondo, 1997), lo que puede dar una idea de la situación más allá del ámbito local. En el caso de la leche D, además de tener una amplia distribución, está dirigida para el consumo de los estratos sociales de menos recursos.

Las muestras se obtuvieron aleatoriamente en supermercados con una frecuencia quincenal durante 12 meses. Las muestras se analizaron dentro de las 24 horas de haberse obtenido. En cada análisis de las 4 marcas bajo estudio se incluyó una muestra testigo (leche libre de residuos) y una contaminada al nivel del LMR de cada sulfonamida, nitrofurano y plaguicida organofosforado de interés.

2.2 Técnica de análisis multiresiduos de sulfonamidas y nitrofuranos

Se hizo una modificación del método oficial del AOAC para determinar residuos múltiples de sulfonamidas en leche cruda (AOAC, 1995). Se cambió la fase móvil de metanol:buffer de fosfato por acetonitrilo:buffer de acetato y los 2 análisis isocráticos por un programa de gradiente.

El método se basó en la extracción selectiva de los residuos de sulfonamidas y nitrofuranos presentes en la leche con una mezcla cloroformo-acetona. El extracto se evaporó hasta sequedad a presión reducida y se redisolvió en una solución acuosa de fosfato de potasio monobásico 0.1M. (pH 4.5). El extracto se desgrasó por partición con hexano. La fase acuosa contiene los residuos de sulfonamidas y nitrofuranos. El extracto

se filtró por membrana e inyectó al cromatógrafo de líquidos de alta resolución con detección UV-visible y en una columna de fase reversa (C₁₈).

Extracción

Se midieron 10 ml de leche previamente homogeneizada y transfirieron a un embudo de separación de 250 ml. Se agregaron al embudo 50 ml de la solución de extracción (cloroformo-acetona, 2+1 v/v). Se tapó el embudo y agitó vigorosamente durante 1 minuto, venteando el embudo ocasionalmente por el tapón, no por la llave y se dejó reposar y posteriormente se repitió la agitación. Se dejaron separar las fases por 5 minutos y se filtró la fase inferior a través de papel filtro previamente lavado con el disolvente de extracción. El filtrado se colectó en un matraz de fondo redondo de 100 ml. Se repitió la extracción de la leche con otros 25 ml de solución de extracción, se filtró y unieron los extractos en el matraz de fondo redondo. Se lavó el papel filtro 2 veces con 5 ml de la solución de extracción y se colectaron en el mismo matraz de fondo redondo. Se evaporó justo a sequedad en el evaporador rotatorio, cuidando que la temperatura del baño no excediera $30 \pm 1^\circ\text{C}$.

Purificación

El residuo del matraz se recuperó con 1 ml de solución acuosa de fosfato de potasio monobásico 0.02M. Se agitó por 1 minuto en Vortex y se adicionaron inmediatamente 5 ml de hexano y se trasvasó, con pipeta Pasteur, a un tubo para centrifuga graduado de 15 ml. Se agitó por 1 minuto en Vortex y se dejaron separar las fases durante 2 minutos. Se agitó nuevamente 1 minuto en Vortex. Se dejaron separar las fases durante 15 minutos y se

extrajo la fase inferior (acuosa) con una pipeta Pasteur. El extracto purificado se filtró por filtro de membrana de 0.45 μm y se guardó en un vial de 2 ml, quedando listo para inyectarse al cromatógrafo de líquidos.

Análisis cromatográfico

1) Condiciones cromatográficas para análisis de sulfonamidas

Para analizar las muestras de sulfonamidas se utilizó el siguiente gradiente binario:

Fase móvil A: Buffer de acetato de sodio 0.02M (pH 4.8): acetonitrilo (95:5) (v/v).

Fase móvil B: Buffer de acetato de sodio 0.02M (pH 4.8): acetonitrilo (80:20) (v/v)

Programa de gradiente

Tiempo	Fase móvil A (%)	Fase móvil B (%)
0	100	0
5	100	0
20	0	100
30	0	100
35	100	0
45	100	0

Flujo de fase móvil durante todo el gradiente: 1 ml/min (constante).

Detección: 275 nm.

Volumen de inyección: 20 μl de la muestra y 5 μl del estándar.

2) Condiciones cromatográficas para el análisis de nitrofuranos

Para el análisis de nitrofuranos se utilizó un programa isocrático con la composición correspondiente a la fase móvil B (buffer acetato de sodio pH 4.8: acetonitrilo (80:20) (v/v). La detección fue a 370 nm y el flujo de fase móvil fue de 1.2 ml/min.

Cálculo de la concentración

La concentración de los residuos se calculó por el método del estándar externo por comparación con los patrones de trabajo cuyos picos sean semejantes en altura según la siguiente expresión:

$$C(\text{mg/L}) = (A_m \cdot C_p \cdot V_p \cdot V_d) / (A_p \cdot V_m \cdot P \cdot F)$$

donde:

A_m : área del pico de la muestra (mm^2)

A_p : área del pico del patrón de trabajo más semejante a la muestra

C_p : concentración del patrón de trabajo inyectado

V_m : volumen de muestra inyectado (μl)

V_p : volumen del patrón de trabajo inyectado (μl)

V_d : volumen de dilución de la muestra (μl)

P : volumen de muestra representado en el extracto final (10ml)

F : factor de recobrado unitario: se calcula mediante la siguiente expresión:

$$F = M_1/M_2$$

donde:

M_1 : microgramos del compuesto recobrados al final del proceso de extracción

M_2 : microgramos del compuesto añadidos a una muestra control no contaminada y procesada según el procedimiento de extracción utilizado para las muestras

2.3 Técnica de análisis multiresiduos de plaguicidas organofosforados

La determinación de residuos de POF en leche se realizó empleando el método de análisis multiresiduo descrito en *Analytical Methods for Pesticides* (1996). Este método permite analizar a todos los compuestos de interés en concentraciones iguales o menores al LMR en leche. En el análisis se hizo una muestra testigo negativo (leche descremada OXOID preparada en una relación 1:10 con agua destilada) y un control positivo de la misma leche contaminada a un nivel de 50 µg/kg de cada plaguicida.

Preparación de la muestra de ensayo

Las muestras de leche tomadas en su envase original de 1 litro se calentaron en baño de agua a 40°C y se homogeneizaron por agitación manual para tomar la alícuota necesaria para el análisis.

Procedimiento

Se colocaron en un vaso de licuadora 50 ml de la muestra de leche y se adicionaron 100 ml de acetato de etilo. Se agitó durante 1 minuto. Se transfirió a un vaso de precipitados con 50 g de sulfato de sodio anhidro. Se agitó ligeramente a mano y se dejó reposar 5 minutos. Se decantó la fase líquida hacia un balón de destilación y se evaporó a 40°C en evaporador rotatorio hasta sequedad. El residuo se redisolvió en 10 ml de n-hexano y se trasvasó hacia un embudo de separación de 100 ml. Se extrajo con 2 porciones de 25 ml de acetonitrilo saturado con n-hexano durante 1 minuto cada vez y los extractos se concentraron a sequedad de la forma antes descrita. Se redisolvió inmediatamente en 1.5 ml de iso-octano para inyectar al cromatógrafo de gases con detector fotométrico de flama (FPD).

La muestra de leche control (libre de residuos) y la fortificada con la mezcla de plaguicidas (50 ppb de cada uno) se extrajeron de la misma manera.

Identificación y cuantificación por cromatografía de gases

Las condiciones de operación del cromatógrafo de gases deben regularse de forma tal que 2 ng de metil paratión provoquen una deflexión de al menos el 50 % de la escala del registrador. Se inyectaron alternadamente volúmenes de 1µl del extracto de las muestras y las soluciones de patrones de trabajo.

Cálculo de la concentración

La concentración de los residuos se calculó por el método del estándar externo por comparación con los patrones de trabajo cuyos picos sean semejantes en altura según la siguiente expresión:

$$C(\text{mg/L}) = (A_m \cdot C_p \cdot V_p \cdot V_d) / (A_p \cdot V_m \cdot P \cdot F)$$

donde:

A_m : área del pico de la muestra (mm^2)

A_p : área del pico del patrón de trabajo más semejante a la muestra

C_p : concentración del patrón de trabajo inyectado

V_m : volumen de muestra inyectado (μl)

V_p : volumen del patrón de trabajo inyectado (μl)

V_d : volumen de dilución de la muestra (μl)

P : volumen de muestra representado en el extracto final (50ml)

F : factor de recobrado unitario: se calcula mediante la siguiente expresión:

$$F = M1/M2$$

donde:

M1: microgramos del compuesto recobrados al final del proceso de extracción

M2: microgramos del compuesto añadidos a una muestra control no contaminada y procesada según el procedimiento de extracción utilizado para las muestras

2.4 Estandarización de las técnicas de análisis

Se determinaron los parámetros de calidad: selectividad, linealidad, precisión, exactitud y sensibilidad, de las metodologías utilizadas para asegurar que los resultados obtenidos fueron confiables.

Selectividad:

Se inyectaron la mezcla estándar, el control negativo y la muestra fortificada con los analitos de interés para determinar si el método producía una señal debida a la presencia del analito y sin interferencias de otros compuestos.

Linealidad:

Se realizó una curva de calibración, por triplicado, de los compuestos de interés en cada una de las metodologías propuestas. Se determinaron los coeficientes de correlación.

Precisión:

Se analizaron 10 repeticiones de una muestra de leche fortificada a un nivel de 50 ppb de cada una de las sustancias de interés, para cada una de las metodologías propuestas. Se determinaron los coeficiente de variación.

Exactitud:

Se midió a través del porcentaje de recuperación obtenido a partir del análisis de 10 repeticiones de una muestra de leche fortificada a un nivel de 50 ppb de cada una de las sustancias de interés, para cada una de las metodologías propuestas.

Sensibilidad:

El límite de detección se calculó conforme al propuesto por el Centro Nacional de Metrología (CENAM, 1997) para la determinación de residuos de plaguicidas. Se calculó a partir de cuando menos 7 repeticiones, determinando la desviación estándar (S) y multiplicando por el valor t de Student para n-1 grados de libertad y 99% de confianza, con la fórmula: $LDM = t(n-1) S$

2.5 Estabilidad de los residuos de sulfonamidas y nitrofuranos en muestras de leche adicionadas con agente conservador.

Se probaron los preservantes dicromato de potasio y bicloruro de mercurio, sustancias recomendadas (FIL, 1988; AOAC, 1995) para prolongar el tiempo de conservación de muestras de leche, con el objeto de determinar si estas sustancias no interfieren en el análisis por HPLC de las sulfonamidas y nitrofuranos estudiados.

Metodología

Preparación de la muestra.- A partir de 1 litro de leche cruda se separaron dos fracciones de 500ml (A y B).

La fracción A se adicionó con dicromato de potasio hasta una concentración de 0.1% (FIL, 1988) y se mezcló perfectamente.

La fracción B se adicionó con bicloruro de mercurio hasta una concentración de 0.05% (FIL, 1988) y se mezcló perfectamente.

Soluciones blanco de dicromato de potasio y bicloruro de mercurio.- Se colocaron 50 ml de cada fracción, por separado, en un frasco de vidrio con tapa. Estas alícuotas son las leches control.

Muestras fortificadas.- Las fracciones A y B se contaminaron, respectivamente, con la mezcla estándar de 6 sulfonamidas y 3 nitrofuranos para obtener una concentración de 0.05µg /ml (50 ppb) de cada uno de los antimicrobianos. Se mezclaron perfectamente. De cada fracción ya fortificada se separaron alícuotas de 50 ml en 6 frascos de vidrio con tapa. Cada recipiente se etiquetó de la siguiente manera:

Fracción A: Dicromato día 0, Dicromato día 1, Dicromato día 2, Dicromato día 3, Dicromato, día 5 y Dicromato día 7.

Fracción B: Se señalaron los mismos días pero con Bicloruro de mercurio.

Almacenamiento de las muestras: Los blancos de dicromato y bicloruro y las muestras señaladas con el día 0, se analizaron el mismo día de su preparación. Todas las demás muestras se guardaron en refrigeración hasta el día señalado para su análisis.

Análisis de las muestras.- Las muestras se analizaron con la misma metodología utilizada para el análisis multiresiduos de sulfonamidas y nitrofuranos por HPLC, de las 4 marcas de leche pasteurizada estudiadas.

Análisis estadístico.- Los datos obtenidos fueron sometidos a un análisis de varianza y comparación de medias en el programa estadístico SPSS.

2.6 Estabilidad de residuos de plaguicidas organofosforados en muestras de leche adicionadas con agente conservador

Se probaron los agentes conservadores dicromato de potasio y bicloruro de mercurio, sustancias recomendadas (FIL/IDF, 1988; AOAC, 1995) para prolongar el tiempo de conservación de muestras de leche, con el objeto de determinar si no interfieren en el análisis por cromatografía de gases de los plaguicidas organofosforados estudiados.

Metodología

Preparación de la muestra.- A partir de 2.8 litros de leche cruda se separaron dos fracciones de 1.4 litros (A y B).

La fracción A se adicionó con dicromato de potasio hasta una concentración de 0.1% (FIL/IDF, 1988) y se mezcló perfectamente.

La fracción B se adicionó con bicloruro de mercurio hasta una concentración de 0.05% (FIL/IDF, 1988) y se mezcló perfectamente.

Soluciones blancos de dicromato de potasio y bicloruro de mercurio.- Se colocaron 50 ml de cada fracción, por separado, en un frasco de vidrio con tapa. Estas alícuotas son las leches control.

Muestras fortificadas.- Las fracciones A y B se contaminaron, respectivamente, con la mezcla estándar de 11 POF (diclorvos, mevinfos, forato, dimetoato, diazinon, disulfotón, metil-paration, fention, clorpirifos, clorfenvinfos y etion) para obtener una concentración de 0.05µg /ml (50 ppb) de cada uno. Se mezclaron perfectamente. De cada fracción ya fortificada se separaron alícuotas de 200 ml en 6 frascos de vidrio con tapa. Cada recipiente se etiquetó de la siguiente manera:

Fracción A: Dicromato día 0, Dicromato día 1, Dicromato día 2, Dicromato día 3, Dicromato, día 5 y Dicromato día 7.

Fracción B: Se señalan los mismos días pero con Bicloruro.

Almacenamiento de las muestras: Los blancos de dicromato de potasio y bicloruro de mercurio y las muestras señaladas con el día 0, se analizaron el mismo día de su preparación. Todas las demás muestras se guardaron en refrigeración hasta el día señalado para su análisis.

Análisis de las muestras.- Las muestras se analizaron con la misma metodología del análisis multiresiduos de POF por cromatografía gaseosa utilizada en las 4 marcas de leche pasteurizada estudiadas. Todas las muestras se analizaron por triplicado.

Análisis estadístico.- Los datos obtenidos fueron sometidos a un análisis de varianza y comparación de medias en el programa estadístico SPSS.

3. RESULTADOS Y DISCUSION

3.1 Estandarización de la técnica de análisis multiresiduos de sulfonamidas y nitrofuranos

Selectividad

Con la técnica de extracción propuesta en el AOAC (1995) para el aislamiento de residuos múltiples de sulfonamidas también fue posible extraer los tres nitrofuranos bajo estudio con niveles de recuperación adecuados (72.38 –100.76%), lo cual amplía el alcance propuesto de esta metodología .

Las fases móviles propuestas en el AOAC: Fase móvil A (metanol- buffer de fosfato, 12%) y Fase móvil B (metanol-buffer de fosfato, 30%) se tuvieron que modificar a acetonitrilo- buffer acetato ya que en las pruebas iniciales la columna que se utilizó perdió resolución. Por otro lado, en lugar de hacer dos análisis isocráticos para la determinación de las sulfas como indicaba la técnica del AOAC, se probó un sistema de gradiente para hacerla en una sola corrida y así ahorrar reactivos y tiempo.

Bajo las condiciones cromatográficas establecidas se pudieron separar adecuadamente las 6 sulfonamidas analizadas, la nitrofurazona y la furazolidona. Sin embargo la furaltadona no tuvo una buena resolución porque se traslapó con el sulfametoxazol.

La determinación de los nitrofuranos se pudo hacer más eficiente utilizando la fase móvil B (acetonitrilo – buffer de acetato, 20:80) en condiciones isocráticas y midiendo a una longitud de onda de 370 nm. En estas condiciones el patrón de elución de la furaltadona se mejoró, los tres nitrofuranos presentaron una buena resolución y sin interferencias, ya que las sulfonamidas no absorben a esta longitud de onda.

Si el equipo utilizado hubiera contado con un detector de arreglo de diodos la detección y cuantificación de las sulfonamidas y nitrofuranos se hubiera podido realizar en una sola corrida, puesto que el detector permite el análisis a diferentes longitudes de onda.

Los tiempos de retención (min) de las sulfonamidas en el sistema en gradiente (a 275 nm) fueron:

Sulfatiazol	15.56
Sulfamerazina	16.45
Sulfametazina	18.21
Sulfamonometoxina	20.10
Sulfacloropiridazina	20.60
Sulfametoxazol	21.66

Los tiempos de retención (min) de los nitrofuranos en condiciones isocráticas (a 370 nm) fueron:

Nitrofurazona	7.91
Furazolidona	8.28
Furaltadona	10.98

En la Figura 3.1 se presentan los cromatogramas de la mezcla estándar de sulfonamidas, la leche control y la leche fortificada con 50 ppb de cada sulfonamida. En la Figura 3.2 se presentan los cromatogramas de la mezcla estándar de nitrofuranos, la leche control y la leche fortificada con 50 ppb de cada nitrofurano.

El análisis de la leche control, en el sistema en gradiente, muestra algunos picos pequeños debidos a la matriz que coinciden con los tiempos de retención de las sulfonamidas estudiadas; los valores promedio de estas interferencias estuvieron en el rango de 3 a 7 ppb. Takeda y Akiyama (1992) también informaron interferencias por efectos de matriz en sulfametazina, sulfamerazina, sulfamonometoxina y sulfametoxazol. La técnica del AOAC, sólo señala que pueden aparecer picos interferentes correspondientes a posibles metabolitos de las sustancias originales en leches obtenidas de vacas tratadas. Fue necesario incluir una leche control negativo durante cada muestreo a realizar para tomar en cuenta estas posibles interferencias. En el análisis de los nitrofuranos, en el sistema isocrático, no hubo interferencias.

Las fluctuaciones de temperatura ambiente a lo largo del día produjeron variación en los tiempos de retención en un rango de 0.09 min (sulfametazina) hasta 0.29 min (sulfamerazina), por lo que fue conveniente inyectar la solución estándar cada 3 muestras.

El sistema de gradiente utilizado redujo el tiempo de análisis del método AOAC original de 80 minutos (2 análisis isocráticos de 40 min cada una) a 45 min para la detección simultánea de las sulfonamidas: sulfatiazol, sulfamerazina, sulfametazina y sulfaclopiridazina.

Figura 3.1 Cromatogramas de: A) Mezcla estándar de sulfonamidas (50 ng/ml de cada uno): 1) sulfatiazol, 2) sulfamerazina, 3) sulfametazina, 4) sulfamonometoxina, 5) sulfacloropiridazina y 6) sulfametoxazol. B) Leche control negativo. C) Leche fortificada con la mezcla estándar a un nivel de 50 ppb.

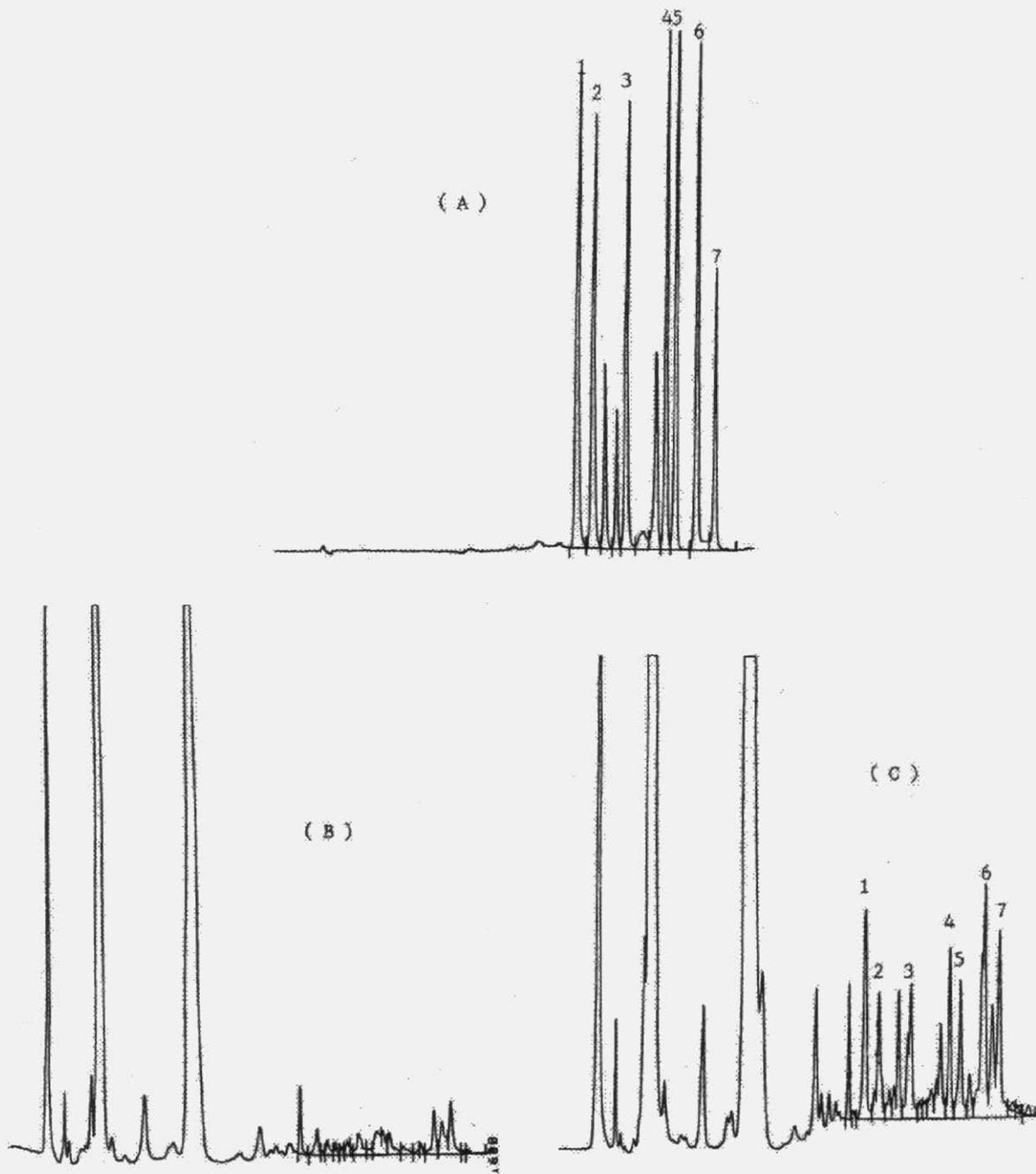
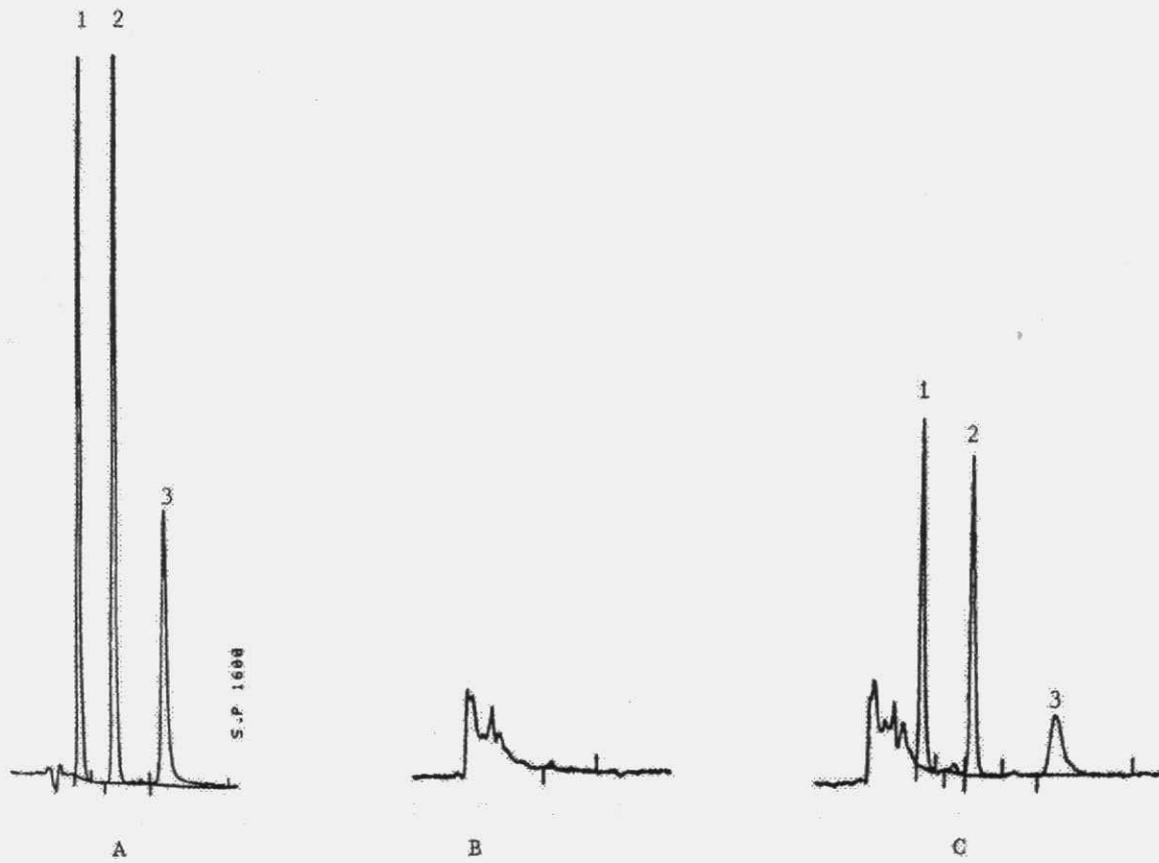


Figura 3.2 Cromatogramas de: A) Mezcla estándar de nitrofuranos (50 ng/ml de cada uno): 1) nitrofurazona, 2) furazolidona y 3) furaltadona. B) Leche control negativo. C) Leche fortificada con la mezcla estándar a un nivel de 50 ppb.



Linealidad

La curva de calibración, por triplicado, de la mezcla estándar de sulfonamidas a concentraciones de 25, 50 y 100 ng/ml, dio coeficientes de correlación superiores a 0.99.

Precisión y Exactitud

Los resultados del análisis de 10 repeticiones de una muestra de leche fortificada a un nivel de 50 ppb de cada una de las sulfonamidas y nitrofuranos estudiados se presentan a continuación.

	% de Recuperación	D.S.	C.V.
Sulfatiazol	65.52	10.63	16.22
Sulfametazina	93.94	11.32	12.05
Sulfacloropiridazina	75.94	10.15	13,37
Sulfamerazina	75.36	9.42	12.50
Sulfamonometoxina	83.45	9.12	10.93
Sulfametoxazol	85.18	10.67	12.52
Nitrofurazona	91.81	2.65	2.89
Furazolidona	100.76	5.57	5.53
Furaltadona	72.38	9.48	13.10

Cuando se analizan compuestos a nivel de trazas (10 a 100 ppb), los coeficientes de variación pueden ser hasta del 20%, dependiendo de la complejidad de la matriz (CODEX, 1995). El método del AOAC para el análisis multiresiduo de sulfonamidas informa

coeficientes de variación de 5.42, 5.56, 7.0 y 11.0 % para sulfametazina, sulfacloropiridazina, sulfamerazina y sulfatiazol, respectivamente. Para la metodología probada, los coeficientes de correlación estuvieron entre 1.63 y 2.66 veces por arriba de los señalados en el AOAC. Se ha visto que la inyección manual puede disminuir la precisión del método, y los coeficientes indicados en la técnica AOAC se obtuvieron en un equipo con inyector automático. También las características propias del sistema cromatográfico pueden influir en la precisión del método.

Aunque la precisión del método ensayado no igualó la del AOAC, los coeficientes de variación obtenidos (menores al 20%) fueron aceptables para la determinación de sustancias en niveles de ppb.

Los porcentajes de recuperación obtenidos para sulfonamidas fueron superiores a los del AOAC en algunos casos.

	AOAC	Obtenidos
Sulfatiazol	56.14	65.52
Sulfametazina	81.80	93.94
Sulfacloropiridazina	67.88	75.94
Sulfamerazina	82.44	75.36

Esto probablemente debido a que el nivel de fortificación de las muestras (50 ppb) fue mayor al propuesto en el método AOAC (20 ppb). Esta modificación se hizo después de algunas pruebas preliminares, ya que con 20 ppb los parámetros de calidad del método y la identificación de los analitos no era adecuada para el sistema cromatográfico utilizado ya

que la capacidad del lazo de inyección era 5 veces menor (20µl) que el informado en el método AOAC (100 µl) .

Los coeficientes de recuperación de la nitrofurazona y furazolidona fueron similares a los obtenidos por Galeano y col. (1994) con un sistema de extracción a base de dimetilformamida-acetonitrilo, aunque para la furaltadona, estos autores encontraron un nivel de recuperación mayor (81.8%) que el obtenido con cloroformo-acetona (72.38%).

Sensibilidad

El límite de detección (LDM) del método determinado a partir del análisis de 10 repeticiones a un nivel de fortificación de 50 µg/l de cada sulfonamida y nitrofurano fue el siguiente.

Compuesto	LDM (µg/l)
Sulfatiazol	15
Sulfametazina	16
Sulfacloropiridazina	15
Sulfamerazina	13
Sulfamonometoxina	13
Sulfametoxazol	15
Nitrofurazona	4
Furazolidona	8
Furaltadona	13

El límite de detección informado para el método del AOAC fue de 5 µg/l. Aunque en la técnica desarrollada no se alcanzó este nivel de detección, para efectos del muestreo a realizar los límites de detección obtenidos fueron suficientes ya que el límite máximo de residuos permitido para sulfonamidas es de 25 µg/l para sulfametazina y de 100 µg/l para las demás sulfonamidas (CODEX, 1995).

En el caso de los nitrofuranos, no hay límites internacionales establecidos, pero la técnica fue capaz de detectar estos antimicrobianos en niveles de partes por billón.

3.2 Estandarización de la técnica de análisis multiresiduos de plaguicidas organofosforados

Selectividad

Con la metodología probada se pudieron separar e identificar adecuadamente los 13 plaguicidas bajo estudio. Los tiempos de retención (min) obtenidos fueron:

	Tiempos de retención (min)
Diclorvos	7.69
Mevinfos	9.59
Forato	12.68
Dimetoato	13.49
Diazinón	14.62
Disulfotón	15.10
Metil-paratión	17.15

Malatión	18.13
Fentión	19.38
Clorpirifos	19.47
Clorfenvinfos	21.63
Etión	26.58
Coumafos	33.09

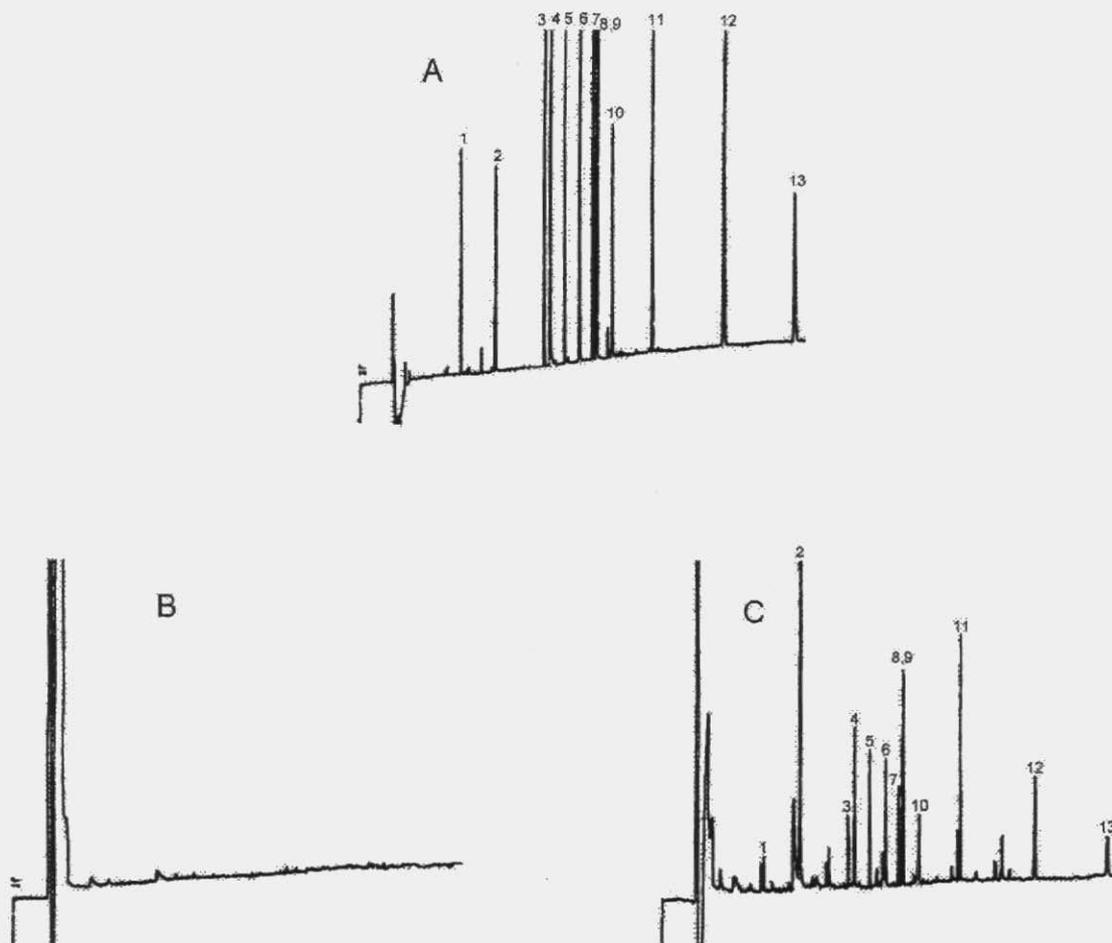
Durante el día se encontraron desviaciones en los tiempos de retención en el rango de 0.024 min (diclorvos) a 0.078 min (fentión). Se ha visto que la inyección manual en la cromatografía de gases puede generar leves desviaciones en los tiempos de retención.

En la Figura 3.3 se presentan los cromatogramas de la mezcla estándar de POF, la leche control contaminada y la leche fortificada con 50 ppb de cada POF.

Linealidad

La curva de calibración, por triplicado, de la mezcla estándar de plaguicidas organofosforados en niveles de 1, 5, y 10 ng, dió coeficientes de correlación superiores a 0.99.

Figura 3.3. Cromatogramas de plaguicidas organofosforados. A) Mezcla de estándares de trabajo: 1: Diclorvos, 2: Mevinfos, 3: Forato, 4: Dimetoato, 5: Disulfotón., 6: Metilparatión, 7: Malatión, 8: Fentión, 9: Clorpirifos, 10: Clorfenvinfos, 11: Etión, 12: Zolone + Gutión, 13: Coumafos, (1 $\mu\text{g/ml}$). B) Muestra de leche control. C) Muestra de leche contaminada (0.050 mg/l) con mezcla de estándares de trabajo.



Precisión y Exactitud

Los porcentajes de recuperación del análisis de 10 repeticiones de una muestra de leche fortificada a un nivel de 50 µg/l, sus desviaciones estándar y los coeficientes de variación se presentan a continuación.

Plaguicida	%Recuperación	D.S.	C.V
Diclorvos	63.02	9.71	15.41
Mevinfos	60.18	10.05	16.70
Forato	75.12	9.64	12.83
Dimetoato	81.07	7.41	9.14
Diazinón	83.57	8.17	9.78
Disulfotón	33.04	3.51	10.63
Metil-paratión	60.04	3.02	5.02
Malatión	47.20	10.43	22.10
Fentión	75.52	9.02	11.94
Clorpirifos	94.42	9.67	10.24
Clorfenvinfos	98.89	12.83	12.97
Etión	43.26	5.99	13.85
Coumafos	60.72	11.36	18.71

La metodología empleada señala niveles de recuperación entre 75 – 100 %, lo que no se obtuvo para diclorvos, mevinfos, disulfotón, metil-paratión, malatión, etión y coumafos. Sin embargo, en el análisis de trazas (ppb) se consideran aceptables niveles entre 60 y 120% (Quattrocchi y col., 1992), por lo que los resultados podrían ser objetables sólo

para disulfotón, malatión y etión. En los análisis multiresiduos es difícil conseguir las condiciones óptimas de análisis para todas las sustancias bajo estudio, sin embargo, se lograron parámetros de calidad adecuados para 10 de 13 plaguicidas.

La precisión del método fue adecuada ya que está por debajo de lo señalado para el análisis de trazas (20%). La Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (EPA) establece coeficientes de variación inferiores al 30% (Magdic y col., 1996).

Sensibilidad

A continuación se presentan los límites de detección del método (LDM) para los 13 plaguicidas organofosforados estudiados, además se señalan los límites máximos de residuos (LMR) en leche establecidos por el CODEX y CICOPLAFEST para algunos de ellos.

Plaguicida	LDM (mg/l)	LMR en leche (mg/kg)
Diclorvos	0.014	0.020
Mevinfos	0.016	
Forato	0.014	0.050
Dimetoato	0.012	
Diazinon	0.013	0.020
Disulfotón	0.005	
Metil-paratión	0.005	
Malatión	0.019	

Plaguicida	mg/l	LMR (mg/kg)
Fentión	0.013	0.050
Clorpirifos	0.014	0.010
Clorfenvinfos	0.009	0.008
Etión	0.009	0.020
Coumafos	0.014	

Los límites de detección alcanzados coincidieron con lo señalado en la metodología utilizada (0.001 a 0.010 mg/l) en 4 de los plaguicidas estudiados, los otros 9 estuvieron ligeramente por encima. No obstante, fueron adecuados para el estudio realizado ya que estuvieron por debajo de los límites máximos de residuos permitidos (LMR). En el caso de clorpirifos y clorfenvinfos se trabajó en el límite de detección.

3.3 Determinación de la presencia de residuos de sulfonamidas y nitrofuranos en leche comercializada en el Distrito Federal

Los niveles de residuos de sulfonamidas y nitrofuranos determinados por HPLC encontrados en cada una de las marcas de leche analizadas se muestran en las Tablas 3.1 a 3.5.

Tabla 3.1 LECHE A. Límite máximo de residuos (LMR), % de muestras positivas, % de muestras positivas con niveles de residuos (ppb) mayores al LMR permitido para sulfonamidas y nitrofuranos y la relación X/LMR (n= 24 muestreos).

	LMR (ppb)^a	% muestras positivas	% muestras > LMR	Valor promedio (X) (ppb)	Relación X/LMR^b
Sulfatiazol		33.3	0	4.65	0.05
Sulfamerazina		8.3	0	3.23	0.03
Sulfametazina	25	8.3	0	1.24	0.05
Sulfamonometoxina		8.3	0	0.85	0.008
Sulfaclopiridazina		8.3	0	1.39	0.01
Sulfametoxazol		8.3	0	4.99	0.05
Nitrofuranos		0	0	-	-

a Todas las sulfonamidas, exceptuando la sulfametazina tienen un LMR= 100 ppb

Para los nitrofuranos no hay un LMR establecido

b Cuando la relación X/LMR es mayor a 1 indica que la media rebasa el límite máximo de residuos permitido

Tabla 3.2 LECHE B. Límite máximo de residuos (LMR), % de muestras positivas, % de muestras positivas con niveles de residuos (ppb) mayores al LMR permitido para sulfonamidas y nitrofuranos y la relación X/LMR (n= 24 muestreos).

	LMR (ppb)^a	% muestras positivas	% muestras > LMR	Valor promedio (X) (ppb)	Relación X/LMR^b
Sulfatiazol		20.8	0	8.1	0.08
Sulfamerazina		37.5	8.3	19.4	0.19
Sulfametazina	25	8.3	0	0.3	0.01
Sulfamonometoxina		8.3	0	1.22	0.01
Sulfacloropiridazina		8.3	0	0.64	0.006
Sulfametoxazol		8.3	0	4.06	0.04
Nitrofuranos		0	0	-	-

a Todas las sulfonamidas, exceptuando la sulfametazina tienen un LMR= 100 ppb

Para los nitrofuranos no hay un LMR establecido

b Cuando la relación X/LMR es mayor a 1 indica que la media rebasa el límite máximo de residuos permitido

Tabla 3.3 LECHE C. Límite máximo de residuos (LMR), % de muestras positivas, % de muestras positivas con niveles de residuos (ppb) mayores al LMR permitido para sulfonamidas y nitrofuranos y la relación X/LMR (n= 24 muestreos).

	LMR (ppb)^a	% muestras positivas	% muestras > LMR	Valor promedio X (ppb)	Relación X/LMR^b
Sulfatiazol		8.3	0	0.89	0.009
Sulfamerazina		20.8	0	3.06	0.03
Sulfametazina	25	16.7	0	1.92	0.08
Sulfamonometoxina		0	0	-	-
Sulfacloropiridazina		0	0	-	-
Sulfametoxazol		8.3	0	3.66	0.04
Nitrofuranos		0	0	-	-

a Todas las sulfonamidas, exceptuando la sulfametazina tienen un LMR= 100 ppb

Para los nitrofuranos no hay un LMR establecido

b Cuando la relación X/LMR es mayor a 1 indica que la media rebasa el límite máximo de residuos permitido

Tabla 3.4 LECHE D. Límite máximo de residuos (LMR), % de muestras positivas, % de muestras positivas con niveles de residuos (ppb) mayores al LMR permitido para sulfonamidas y nitrofuranos y la relación X/LMR (n= 24 muestreos).

	LMR (ppb)^a	% muestras positivas	% muestras > LMR	Valor promedio (X) (ppb)	Relación X/LMR^b
Sulfatiazol		16.67	0	2.09	0.02
Sulfamerazina		16.67	0	3.90	0.04
Sulfametazina	25	4.17	0	0.43	0.02
Sulfamonometoxina		12.5	0	1.27	0.01
Sulfacloropiridazina		12.5	0	4.17	0.04
Sulfametoxazol		8.3	0	2.48	0.02
Nitrofuranos		0	0	-	-

a Todas las sulfonamidas, exceptuando la sulfametazina tienen un LMR= 100 ppb

Para los nitrofuranos no hay un LMR establecido

b Cuando la relación X/LMR es mayor a 1 indica que la media rebasa el límite máximo de residuos permitido

Tabla 3.5 Número de muestras de leche positivas a la presencia de residuos de sulfonamidas y nitrofuranos en las 4 marcas de leche analizadas (n = 96).

	Leche A	Leche B	Leche C	Leche D	% Muestras positivas	%Muestras >LMR
Sulfatiazol	8	5	2	4	19.79	0
Sulfamerazina	2	9	5	4	20.83	2.08
Sulfametazina	2	2	4	1	9.38	0
Sulfamonometoxina	2	2	0	3	7.29	0
Sulfacloropiridazina	2	2	0	3	7.29	0
Sulfametoxazol	2	2	2	2	8.33	0
Residuos múltiples de sulfonamidas	6	4	3	5	18.75	1.04
Nitrofuranos	0	0	0	0	0	0

Se detectaron residuos de sulfonamidas en las 4 marcas de leches pasteurizadas analizadas. En las leches A, B y D, se encontraron residuos de las 6 sulfonamidas estudiadas, en cambio en la leche C sólo se detectaron 4 sulfonamidas, ya que no aparecieron residuos de sulfamonometoxina y sulfacloropiridazina.

Los porcentajes de muestras positivas a sulfonamidas fueron: 47.7% (leche A), 58.3% (leche B), 44.7% (leche C) y 50% (leche D). Estos valores fueron superiores a los informados en otros países como Costa rica, 2% (Monge y col., 1993) e Italia, 37% (Ferrini y col., 1994).

En la leche A los valores promedios de residuos de sulfonamidas fluctuaron entre 0.8 - 5.0 $\mu\text{g}/\text{kg}$ y el residuo más frecuente fue el sulfatiazol (33.3% de las muestras). En la leche B los valores promedios estuvieron entre 0.3 – 19.4 $\mu\text{g}/\text{kg}$ y los residuos más frecuentes fueron sulfamerazina (37.5%) y sulfatiazol (20.8%). En la leche C los valores promedios fluctuaron entre 0.9 – 3.7 $\mu\text{g}/\text{kg}$ y los residuos más comunes fueron sulfamerazina (20.8%) y sulfametazina (16.7%). En la leche D las sulfonamidas que aparecieron con mayor frecuencia fueron sulfatiazol (16.7%) y sulfamerazina (16.7%) y los niveles promedio de residuos estuvieron entre 0.4 – 4.2 $\mu\text{g}/\text{kg}$.

En muestras de leche positivas los residuos de sulfonamidas con los niveles promedio más altos fueron: sulfametoxazol (57.4 $\mu\text{g}/\text{kg}$ leche A y 42.15 $\mu\text{g}/\text{kg}$, leche C), sulfamerazina (49.53 $\mu\text{g}/\text{kg}$, leche B) y sulfatiazol (37.24 $\mu\text{g}/\text{kg}$, leche B).

Una de las sulfonamidas más vigilada a nivel internacional es la sulfametazina (sulfadimidina) debido a sus posibles propiedades carcinogénicas. En el presente estudio se encontraron residuos de esta sustancia en algunas muestras de leche: 8.3% (leches A y B), 16% (leche C) y 4.2 % (leche D); estos valores fueron superiores a los informados en leches alemanas, 2% (Grether y col., 1994) y suecas, 1.8% (Mellgren y col., 1996). Los niveles de esta sulfonamida en las leches bajo estudio fueron inferiores al LMR de 25 $\mu\text{g}/\text{kg}$ establecido por el Codex.

De las 96 muestras analizadas el 47.9% presentaron residuos de sulfonamidas y el 3.12% resultaron con niveles objetables. La leche B presentó niveles superiores al límite máximo permitido para sulfamerazina en dos ocasiones (141.2 y 180 ppb). También en un muestreo se presentaron residuos múltiples de sulfatiazol, sulfamerazina y sulfametoxazol cuya suma (110.5 ppb) estuvo por encima del LMR. Estos resultados objetables pueden ocurrir cuando no se respetan los periodos de retiro o si se usan dosis mayores a las

recomendadas. Es importante resaltar que el valor promedio (n= 24) de estas sulfonamidas en la leche B, no sobrepasa el límite máximo permitido, lo que es una ventaja desde el punto de vista de salud pública.

La presencia de niveles objetables de residuos de sulfonamidas en leches comerciales, que son leches mezcladas de diferentes productores y por lo mismo, donde los residuos se diluyen, debe tomarse en consideración. Es bien sabido que grandes volúmenes de leche de alta calidad puede ser contaminada con la leche de un productor descuidado. Sería deseable que los industriales establecieran medidas de control más rigurosas para evitar la aceptación de leches con niveles objetables de estos residuos.

La alta frecuencia de muestras positivas a la presencia de estos antimicrobianos y la detección de algunos casos que exceden el LMR en las leches estudiadas, muestra la necesidad de establecer en México programas regulares de vigilancia por parte de las autoridades. De acuerdo a Honkanen y Reybroeck (1997) la incidencia de residuos de antimicrobianos en leche ha disminuido considerablemente (1-5 casos en 1000) en las últimas décadas en los países donde la vigilancia de residuos se desarrolla regularmente.

No se detectaron residuos de nitrofuranos en ninguna muestra de leche. En México, de acuerdo al Directorio de Medicina Veterinaria, Nutrición y Zootecnia (1997), estas sustancias se recomiendan principalmente para tratar mastitis en vacas secas.

Los resultados obtenidos pueden reflejar que estos antimicrobianos se usan correctamente, sólo en vacas que no están en producción. También pudiera ser posible que los niveles de residuos, si hubieran, fueran inferiores al límite de detección (4-13 µg/kg) de la técnica utilizada.

En la literatura internacional no se encontraron reportes de la presencia de residuos de nitrofuranos en leche y los resultados obtenidos en el presente trabajo parecen coincidir con la situación mundial.

3.4 Determinación de la presencia de residuos de plaguicidas organofosforados empleados para uso pecuario y en pastos, en leche comercializada en el Distrito Federal

Los niveles de residuos de plaguicidas organofosforados detectados por cromatografía gas-líquido en cada una de las marcas de leche analizadas se muestran en las Tablas 3.6 a 3.10:

Tabla 3.6 LECHE A. Límites máximos de residuos permitidos, % de muestras positivas con residuos de plaguicidas organofosforados, % de muestras que sobrepasan los LMR, valores promedio de los residuos encontrados y la relación de este promedio con respecto al LMR (X/LMR) para los 24 muestreos.

Plaguicida	LMR ^a (mg/Kg)	%Muestras positivas	% Muestras > LMR	Valor promedio X (mg/Kg)	Relación X/LMR ^b
Diclorvos	0.020	8.33	4.17	0.003	0.15
Mevinfos		0	0		
Forato	0.050	8.33	0	0.0005	0.01
Dimetoato		0	0		
Diazinón	0.020	12.50	0	0.0002	0.01
Disulfotón	0.020	0	0		
Metil-paratión		8.33	0	0.002	
Malatión		4.17	0	0.001	
Fentión	0.050	12.50	0	0.0007	0.001
Clorpirifos	0.010	0	0		
Clorfenvinfos	0.008	4.17	0	0.0002	0.02
Etión	0.020	12.50	0	0.0008	0.04
Residuos múltiples		20.83	0		

^a Algunos plaguicidas no tienen LMR establecidos en leche

^b Cuando esta relación es mayor de 1 significa que el nivel promedio de residuos rebasa el máximo permitido. Para algunos plaguicidas no es posible calcularla porque no tienen LMR establecidos en leche.

Tabla 3.7 LECHE B. Límites máximos de residuos permitidos, % de muestras positivas con residuos de plaguicidas organofosforados, % de muestras que sobrepasan los LMR, valores promedio de los residuos encontrados y la relación de este promedio con respecto al LMR (X/LMR) para los 24 muestreos.

Plaguicida	LMR ^a (mg/Kg)	%Muestras positivas	% Muestras > LMR	Valor promedio X (mg/Kg)	Relación X/LMR ^b
Diclorvos	0.020	12.50	8.33	0.0096	0.48
Mevinfos		4.17	0	0.00001	
Forato	0.050	12.50	4.17	0.0081	0.16
Dimetoato		0	0		
Diazinón	0.020	12.50	0	0.0002	0.01
Disulfotón	0.020	0	0		
Metil-paratión		8.33	0	0.0018	
Malatión		0	0		
Fentión	0.050	12.50	0	0.0002	0.004
Clorpirifos	0.010	4.17	4.17	0.0006	0.06
Clorfenvinfos	0.008	8.33	4.17	0.0086	1.07
Etión	0.020	4.17	0	0.0002	0.01
Residuos múltiples		20.83	0		

^a Algunos plaguicidas no tienen LMR establecidos en leche

^b Cuando esta relación es mayor de 1 significa que el nivel promedio de residuos rebasa el máximo permitido. Para algunos plaguicidas no es posible calcularla porque no tienen LMR establecidos en leche.

Tabla 3.8 LECHE C. Límites máximos de residuos permitidos, % de muestras positivas con residuos de plaguicidas organofosforados, % de muestras que sobrepasan los LMR, valores promedio de los residuos encontrados y la relación de este promedio con respecto al LMR (X/LMR) para 24 muestreos.

Plaguicida	LMR ^a (mg/Kg)	%Muestras positivas	% Muestras > LMR	Valor promedio X (mg/Kg)	Relación X/LMR ^b
Diclorvos	0.020	8.33	4.17	0.0041	0.20
Mevinfos		4.17	0	0.00003	
Forato	0.050	8.33	0	0.0006	0.01
Dimetoato		4.17	0	0.0007	
Diazinón	0.020	8.33	0	0.0002	0.01
Disulfotón	0.020	0	0		
Metil-paratión		4.17	0	0.00008	
Malatión		8.33	0	0.0011	
Fentión	0.050	4.17	0	0.000004	0.00008
Clorpirifos	0.010	0	0		
Clorfenvinfos	0.008	4.17	4.17	0.0010	0.12
Etión	0.020	4.17	0	0.0002	0.01
Residuos múltiples		8.33	0		

^a Algunos plaguicidas no tienen LMR establecidos en leche

^b Cuando esta relación es mayor de 1 significa que el nivel promedio de residuos rebasa el máximo permitido. Para algunos plaguicidas no es posible calcularla porque no tienen LMR establecidos en leche.

Tabla 3.9 LECHE D. Límites máximos de residuos permitidos, % de muestras positivas con residuos de plaguicidas organofosforados, % de muestras que sobrepasan los LMR, valores promedio de los residuos encontrados y la relación de este promedio con respecto al LMR (X/LMR) para 24 muestreos.

Plaguicida	LMR ^a (mg/Kg)	%Muestras positivas	% Muestras > LMR	Valor promedio X (mg/Kg)	Relación X/LMR ^b
Diclorvos	0.020	12.50	4.17	0.0132	0.66
Mevinfos		16.67	0	0.0024	
Forato	0.050	12.50	0	0.0026	0.05
Dimetoato		0	0		
Diazinón	0.020	8.33	0	0.0005	0.002
Disulfotón		4.17	0	0.0004	
Metil-paratión		16.67	0	0.0005	
Malatión		4.17	0	0.00009	
Fentión	0.050	4.17	0	0.0005	0.01
Clorpirifos	0.010	4.17	0	0.00007	0.007
Clorfenvinfos	0.008	8.33	4.17	0.0006	0.08
Etión	0.020	4.17	0	0.0003	0.02
Residuos múltiples		12.50	0		

^a Algunos plaguicidas no tienen LMR establecidos en leche

^b Cuando esta relación es mayor de 1 significa que el nivel promedio de residuos rebasa el máximo permitido. Para algunos plaguicidas no es posible calcularla porque no tienen LMR establecidos en leche.

Tabla 3.10 Número de muestras positivas a la presencia de plaguicidas organofosforados de cuatro marcas de leche estudiadas (n = 96).

Plaguicida	Leche A	Leche B	Leche C	Leche D	% positivas	% positivas > LMR
Diclorvos	2	3	2	3	10.42	5.21
Mevinfos	0	1	1	4	6.25	0
Forato	2	3	2	3	10.42	1.04
Dimetoato	0	0	1	0	1.04	0
Diazinón	3	3	2	2	10.42	0
Disulfotón	0	0	0	1	1.04	0
Metil-paratión	2	2	1	4	9.38	0
Malatión	1	0	2	1	4.17	0
Fentión	3	3	1	1	8.33	0
Clorpirifos	0	1	0	1	2.08	1.04
Clorfenvinfos	1	2	1	2	6.25	3.12
Etión	3	1	1	1	6.25	0
Residuos múltiples	5	5	2	3	15.62	0

Se encontraron residuos de POF en las 4 marcas de leche analizadas. De los 13 plaguicidas estudiados sólo el coumafós no apareció en ninguna de ellas. Los porcentajes de muestras positivas a residuos de POF fueron: 29.2% (leche A), 44.7% (leche B), 37.5% (leche C) y 50% (leche D). En cada una de las marcas hubo algunas muestras con uno o varios residuos de plaguicidas por encima de los LMR establecidos. Los plaguicidas en niveles objetables fueron: diclorvos, clorfenvinfos, forato y clorpirifos. La leche A sólo presentó una muestra con niveles por arriba del LMR; las leches C y D, 2 y la leche B, 5 (Tablas 3.6-3.9).

Los niveles promedio de los residuos de plaguicidas en las 4 marcas de leche estuvieron muy por abajo (de 1 a 3 órdenes de magnitud) de los LMR permitidos (Tablas 3.6-3.9). También los percentiles (95%) de los plaguicidas presentes con los niveles violatorios más altos: diclorvos (0.019, para la leche B; 0.012, para la leche D), forato

(0.012, para la leche B) y clorfenvinfos (0.001, para la leche B) estuvieron por debajo de sus LMR.

El porcentaje total de muestras positivas a residuos de POF en leche comercializada en el Distrito Federal (4 marcas x 24 muestreos, n = 96) fue de 39.6%, valor similar (30%) al informado por Noa y col. (1992) para leches cubanas.

Los POF que aparecieron con mayor frecuencia fueron diclorvos, forato y diazinón. Este último está dentro de los más utilizados en México (INE, 2000). El 8.3% del total de muestras de leche analizadas (n = 96) presentaron niveles de POF que sobrepasan los límites aceptables. Este valor estuvo por encima de los informados para Estados Unidos (Yess y col., 1991) y Alemania (Hapke, 1997) donde las muestras con niveles violatorios fueron sólo del 1%.

En las 96 muestras de leche pasteurizadas analizadas se determinaron los percentiles 90, para los plaguicidas detectados, obteniéndose valores de cero en la mayoría de los casos, excepto para diclorvos y diazinón, con valores de 0.0008 y 0.0001 mg/kg respectivamente, muy por debajo de sus LMR. Aún los percentiles 95 estuvieron en niveles muy inferiores a los límites permisibles (Tabla 3.11).

Tabla 3.11 Valores del percentil al 95 de los plaguicidas organofosforados presentes en el total (n=96) de muestras de leche pasteurizada analizadas y sus LMR.

Plaguicida	Porcentil al 95% (n=96)(mg/kg)	LMR^a en leche (mg/kg)
Malatión	0.0000	
Clorpirifos	0.0000	0.010
Dimetoato	0.0000	
Disulfotón	0.0000	0.020
Mevinfos	0.0004	
Fentión	0.0008	0.010
Diazinón	0.0011	0.020
Clorfenvinfos	0.0016	0.008
Metil-paratión	0.0018	
Etión	0.0028	0.020
Forato	0.0048	0.050
Diclorvos	0.0163	0.020

^a No todos los plaguicidas tienen LMR en leche

Los residuos de los plaguicidas diclorvos y clorfenvinfos en leche pasteurizada pueden explicarse por su uso pecuario como garrapaticidas en bovinos. Además el diclorvos se utiliza para el control de insectos en graneros y silos vacíos. Kituyi y col. (1997) encontraron también residuos de clorfenvinfos en leche, pero no se encontraron informes en la literatura mundial sobre la presencia de residuos de diclorvos en ella. Aunque estos POF se señalan como poco persistentes, sus intervalos de seguridad están entre 5 a 12 horas; Repetto y col. (1996) han señalado que algunas veces se admite con demasiada confianza la poca estabilidad de los POF, y que en algunos experimentos realizados por ellos han observado una persistencia de 20 días para residuos de diclorvos (como producto de hidrólisis del triclorfón) en tejidos de rata (sangre, tejido adiposo, hígado y músculo).

Como en el Directorio de Especialidades Veterinarias (1997) no se indican los tiempos de espera entre la aplicación del garrapaticida y la recuperación de la leche, la falta de información adecuada en el manejo de estas sustancias también puede generar la presencia de estos residuos. La Comisión del Codex para residuos de medicamentos veterinarios (CODEX, 1995) señala la necesidad de suministrar información suficiente y exacta a los usuarios de estas sustancias, mediante las etiquetas y prospectos para lograr la aplicación de Buenas Prácticas Veterinarias.

Los residuos de los plaguicidas forato y clorpirifos, de uso agrícola, podrían generarse a partir del consumo de piensos contaminados con estos residuos. El-Hoshy y col. (1997) detectaron la presencia de residuos de clorpirifos en leche, pero no se encontraron referencias en la literatura mundial de la presencia de forato en ella. Estos plaguicidas están autorizados por CICOPLAFEST(1997) para proteger cultivos como alfalfa, maíz, sorgo, y soya, que se emplean en la alimentación del ganado lechero. Existe el problema de que en el Catálogo Oficial de Plaguicidas no se indican tiempos de seguridad para el forato, lo que podría favorecer la presencia de sus residuos, ya que de acuerdo a Hassall (1990), la persistencia del forato puede ser hasta de 6 semanas. El clorpirifos, se encuentra dentro de los plaguicidas de mayor uso en México (INE, 2000) y sí tiene establecido un tiempo de seguridad de 21 días en los cultivos de alfalfa, maíz, sorgo y soya (CICOPLAFEST, 1997). La presencia de residuos de clorpirifos en la leche parece indicar una deficiente aplicación de buenas prácticas agrícolas en la obtención de alimentos que pueden ser destinados a la alimentación del ganado lechero.

La detección de los plaguicidas forato y clorpirifos en leche contrasta con la opinión de Blüthgen y Heeschen (1997) quienes señalaron que la transformación metabólica de los plaguicidas organofosforados es lo bastante rápida como para que sus residuos aparezcan

en la leche cuando la vaca ingiere alimentos que contienen estas sustancias. Los resultados del presente trabajo confirman la necesidad de realizar nuevos estudios sobre la estabilidad y transferencia de los residuos de plaguicidas organofosforados de los piensos a la leche.

Para determinar el efecto tóxico de cualquier residuo en los alimentos se establecen, a través de ensayos en animales, la concentración de la sustancia donde no se pueda observar un efecto tóxico medible (NOEL) y se expresa en mg/kg de peso corporal del animal. A partir de este valor se calcula la Ingesta Diaria Admisible para el humano (IDA), considerada la ingesta diaria de una sustancia, expresada sobre la base de peso corporal, que durante toda la vida de una persona puede ser ingerida sin riesgo apreciable para la salud. Está dada en miligramos de sustancia por kilogramo de peso corporal por día. El valor de la IDA es de 100 a 1000 veces menor que el NOEL, esto para dar un factor de seguridad adicional (Heeschen, 1997).

Con base en lo anterior, para evaluar el riesgo para la salud que podrían representar las muestras de leche que sobrepasaron los límites máximos de residuos permitidos, se calcularon las ingestas diarias suministradas por estas leches y se compararon con las Ingestas Diarias Admisibles (IDA) señaladas en el CICOPPLAFEST (1997) para estos plaguicidas. Para lo cual se asumió un peso de 10 kg para un niño y un peso de 60 kg para un adulto, así como un consumo de 500 ml de leche al día en ambos casos.

De las muestras de leche con niveles de residuos violatorios, 5 sobrepasaron los valores de IDA para un caso hipotético de un niño. Los residuos de los plaguicidas diclorvos (3 muestras), clorfenvinfos (1 muestra) y forato (1 muestra), estuvieron 1.18, 2.45, 3.75; 5.5 y 17.28 veces, respectivamente, por encima de la IDA. En el caso calculado para el adulto, sólo 1 muestra con residuos de forato sobrepasó 2.88 veces la IDA.

Para los plaguicidas de uso agrícola dimetoato, mevinfos, malatión y paratión metílico, para los cuáles no hay LMR establecidos en leche, también se determinó si los niveles de residuos encontrados rebasaban las IDA. En ningún caso las IDA calculadas fueron superiores a las establecidas para cada plaguicida.

La presencia de algunas muestras con niveles de plaguicidas por encima de los límites máximos de residuos permitidos y de las ingestas diarias aceptables podrían resultar un riesgo para la salud, especialmente en niños, si estos residuos violatorios se presentaran con mayor frecuencia. Pero como el valor promedio anual de los residuos de estos plaguicidas estuvo muy por debajo de los LMR establecidos, el riesgo potencial a la salud de los consumidores se minimiza. No obstante, es preocupante que las leches comerciales presenten residuos con niveles objetables, considerando que es leche de acopio mezclada de diferentes productores, donde los niveles de residuos tienden a reducirse, aunado a que el proceso de pasteurización favorece la destrucción de los plaguicidas fosforados (El Hoshy, 1997). Sería deseable que en nuestro país se hiciera efectivo, como en los países industrializados, el programa de control de residuos tóxicos en los alimentos, ya que sólo a través de éste, será posible reducir la frecuencia de muestras de leche con niveles de residuos violatorios.

3.5 Efecto de la adición de conservadores en la estabilidad de los residuos de sulfonamidas y nitrofuranos en las muestras de leche cruda

El uso de algunos preservantes como el dicromato de potasio y el bicloruro de mercurio está permitido en las muestras de leche para conservarlas durante más tiempo

(FIL, 1988; AOAC, 1995). Estas sustancias son de gran utilidad cuando el lugar donde se toma la muestra está lejos del laboratorio y no hay posibilidades de mantenerlas refrigeradas o cuando los análisis no pueden realizarse de inmediato en el laboratorio.

Se ha demostrado que la adición de estos conservadores no interfiere en la determinación de proteínas y grasa de la leche. Sin embargo, sí interfiere en determinaciones como: lactosa (Pinto y col., 1996; Karmakar y Ghatak, 1997), urea adicionada a la leche (Bector y col., 1988), antimicrobianos con la prueba enzimática Penzym R (Molina y col., 1999) y en los análisis microbiológicos.

La adición de estos conservadores a muestras de leche destinadas al análisis multiresiduo por HPLC de sulfonamidas y nitrofuranos, utilizado en este trabajo, mostró los siguientes resultados:

Adición de dicromato de potasio (0.1%)

El análisis estadístico de los resultados obtenidos para sulfonamidas en muestras de leche cruda conservada con dicromato de potasio señaló que no hay diferencias significativas ($p > 0.05$) en los porcentajes de recuperación de los días 1 hasta el 5 en todas las sulfonamidas estudiadas. En el séptimo día el nivel de recuperación del sulfatiazol, sulfamerazina y sulfamonometoxina empieza a disminuir. Sin embargo la sulfametazina, sulfacloropiridazina y sulfametoxazol se mantuvieron estables 7 días después de iniciado el experimento (Figura 3.4). Los rangos promedio de recuperación de las sulfas fluctuaron entre 68.4% (sulfatiazol) a 96.8% para sulfametazina (Tabla 3.12).

En el caso de los nitrofuranos no hubo diferencias significativas ($p > 0.05$) en los resultados obtenidos durante los siete días (Figura 3.5). Los rangos de recuperación

promedio estuvieron entre 75.1% para la furaltadona y 101.6% para la furazolidona (Tabla 3.12).

Tabla 3.12 Porcentajes de recuperación promedio, mínimos y máximos de residuos de sulfonamidas y nitrofuranos en leche conservada con dicromato de potasio (0.1%) en refrigeración, durante un periodo de 7 días y las pérdidas en los porcentajes de recuperación alcanzadas para el día 7.

Antimicrobiano	Porcentajes de recuperación promedio	Porcentajes de recuperación mínimos y máximos	Pérdida (%) en los porcentajes de recuperación al día 7
Sulfatiazol	68.4	54.7 - 77.9	23.2
Sulfamerazina	76.8	65.5 - 87.9	17.2
Sulfametazina	96.8	89.2 - 102.1	ns
Sulfamonometoxina	84.6	72.3 - 89.8	17.0
Sulfacloropiridazina	77.7	67.9 - 89.8	ns
Sulfametoxazol	89.4	77.2 - 96.3	ns
Nitrofurazona	92.1	88.2 - 100.4	ns
Furazolidona	101.6	98.8 - 106.9	ns
Furaltadona	75.1	62.1 - 79.8	ns

ns: no significativo ($p > 0.05$)

Figura 3.4 Estabilidad de residuos de sulfonamidas en muestras de leche cruda conservadas con dicromato de potasio (0.1%) y bicloruro de mercurio (0.05%) durante 7 días en refrigeración.

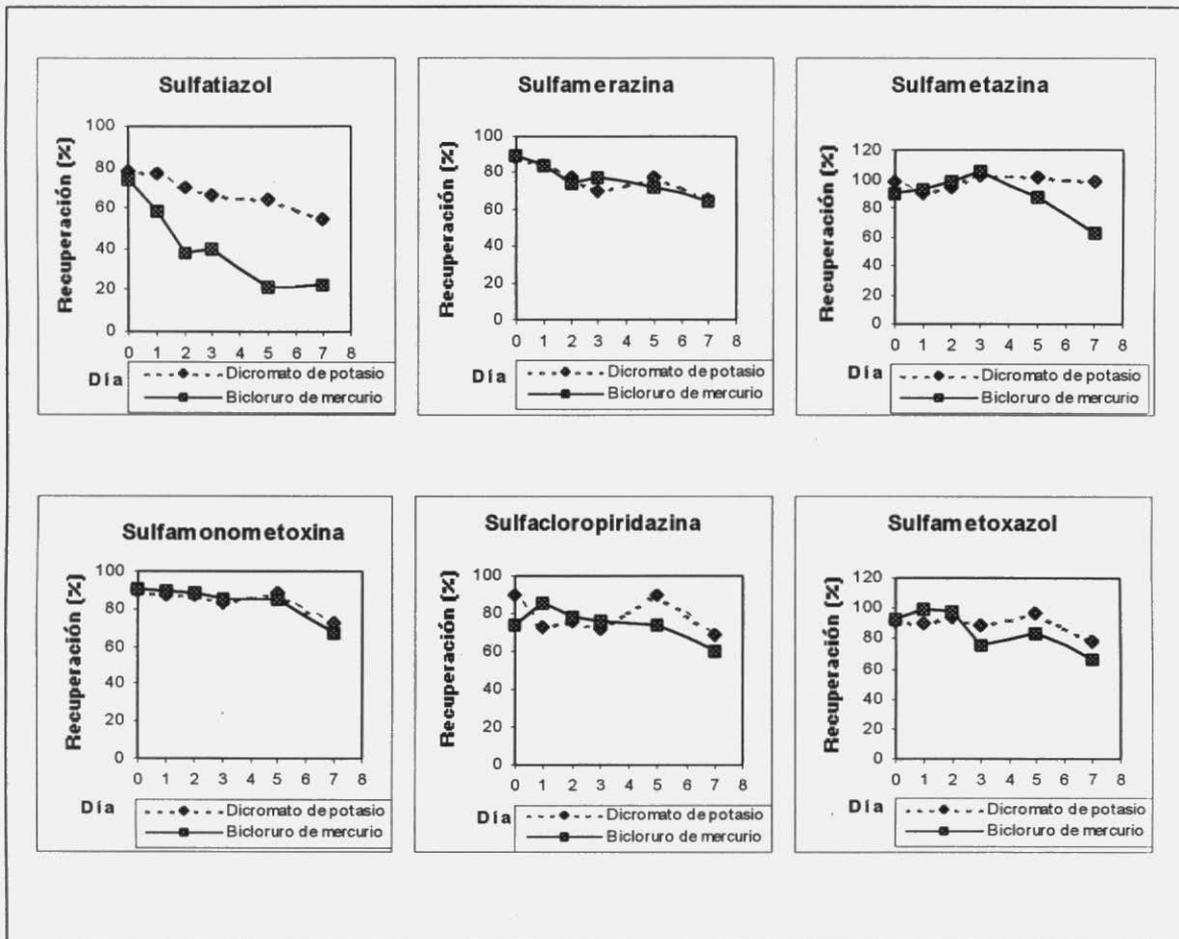
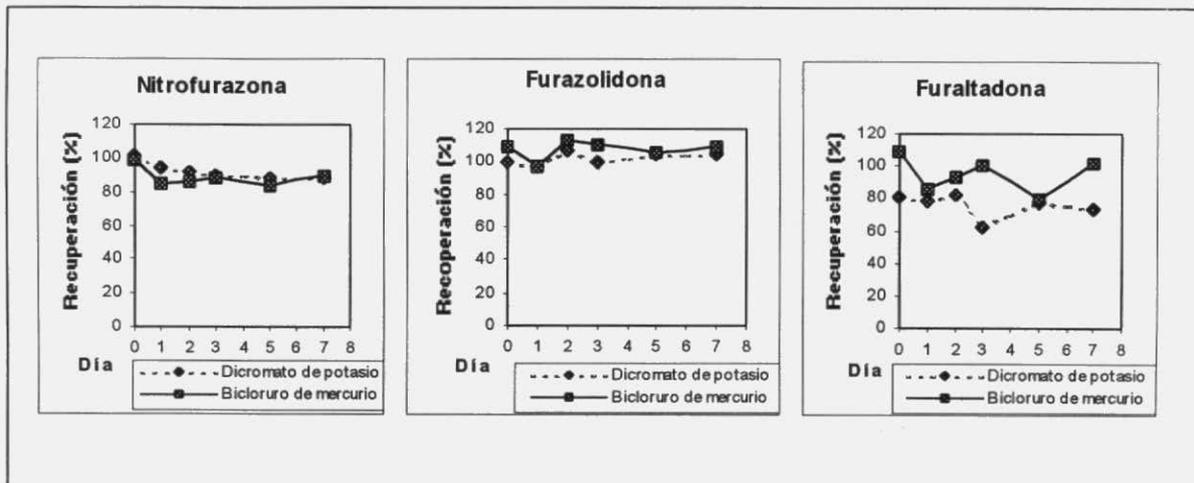


Figura 3.5 Estabilidad de residuos de nitrofuranos en muestras de leche cruda conservadas con dicromato de potasio (0.1%) y bicloruro de mercurio (0.05%) durante 7 días en refrigeración.



Adición de bicloruro de mercurio (0.05%)

En el caso de la conservación de la leche con bicloruro de mercurio, se observó una pérdida importante de la concentración de sulfatiazol al día siguiente de iniciado el experimento (Figura 3.4); para el tercer día los niveles de recuperación disminuyeron casi un 50%. Las recuperaciones de la sulfamerazina, sulfamonometoxina, sulfametazina se mantuvieron sin diferencias significativas cinco días después de iniciado el experimento. El porcentaje de recuperación de la sulfacloropiridazina se mantuvo estable durante los 7 días del experimento. Los niveles promedio de recuperación estuvieron entre 74.32% (sulfacloropiridazina) y 89.18% (sulfametazina), ver Tabla 3.13.

Para verificar la aparente descomposición del sulfatiazol (STZ) en presencia del HgCl_2 , se realizó una prueba de estabilidad (por triplicado) utilizando únicamente solventes. El STZ se disolvió en agua y en metanol a una concentración de $0.05\mu\text{g/ml}$, en ambos casos. Además el STZ se disolvió ($0.05\mu\text{g/ml}$) en soluciones de bicloruro de mercurio (0.05%) acuosas y metanólicas. Todas las soluciones se conservaron a 4°C y se analizaron por HPLC en los días 0,1,2 y 7. El sulfatiazol se mantuvo estable durante los 7 días de almacenamiento en el metanol y en la solución metanólica de HgCl_2 . En cambio, en solución acuosa se observó una pérdida del 5.8% en los porcentajes de recuperación del STZ para el día 7. En la solución acuosa de bicloruro de mercurio el STZ presentó una pérdida importante del 73.5% en los porcentajes de recuperación desde el primer día de almacenamiento. Estos resultados confirmaron la influencia del bicloruro de mercurio en la estabilidad de los residuos de STZ en un medio acuoso, tal como se observó en las muestras de leche. Se ha determinado que el Hg puede reaccionar con algunos derivados que presentan el anillo tiazol ocasionando su rompimiento (Acheson,1960) o pueden formar

derivados mercúricos en el anillo tiazol (Borton y Ollis, 1979). Esto podría explicar las pérdidas de STZ observadas.

En el caso de los nitrofuranos no hubo diferencias significativas en los resultados obtenidos durante los 7 días (figura 3.5). Los rangos de recuperación promedio estuvieron entre 88.27% para la nitrofurazona y 107.17% para la furazolidona (Tabla 3.13).

Tabla 3.13 Porcentajes de recuperación promedio, mínimos y máximos de residuos de sulfonamidas y nitrofuranos en leche conservada con bicloruro de mercurio (0.05%) en refrigeración, durante un periodo de 7 días y las pérdidas en los porcentajes de recuperación alcanzadas para el día 7.

Antimicrobiano	Porcentajes de recuperación promedio	Porcentajes de recuperación mínimos y máximos	Pérdida (%) en los porcentajes de recuperación al día 7
Sulfatiazol	42.2	21.2 – 73.6	48.0
Sulfamerazina	76.8	64.3 – 89.3	20.7
Sulfametazina	89.2	62.1 – 104.4	ns
Sulfamonometoxina	84.2	67.2 – 90.0	23.3
Sulfacloropiridazina	74.3	60.2 – 84.8	ns
Sulfametoxazol	85.3	65.8 – 98.4	26.2
Nitrofurazona	88.3	83.4 – 98,9	ns
Furazolidona	107.2	96.7 – 112.7	ns
Furaltadona	94.7	79.2 – 108.7	ns

ns: no significativa ($p>0.05$)

A través de los resultados anteriores se puede señalar que el uso del dicromato de potasio como conservador, en un nivel del 0.1%, no interfiere en la determinación por HPLC de residuos de sulfonamidas y nitrofuranos en un lapso de 6 a 7 días, por lo que se puede recomendar su uso, cuando sea necesario prolongar el tiempo de conservación de las

muestras. El bicloruro de mercurio en un nivel del 0.05% también puede usarse en esta determinación por HPLC, salvo para medir residuos de sulfatiazol.

3.6 Efecto de la adición de agentes conservadores en la estabilidad de los residuos de plaguicidas organofosforados en muestras de leche cruda

Adición dicromato de potasio (0.1%)

De los 11 plaguicidas estudiados sólo 8 (diclorvos, mevinfos, forato, dimetoato, diazinon, fention, clorpirifos y clorfenvinfos) presentaron porcentajes de recuperación aceptables desde un punto de vista analítico, superiores al 60% (Quattrocchi,1992). Los niveles de recuperación de los otros plaguicidas fueron objetables desde el primer día de iniciado el experimento (Tabla 3.14).

El análisis estadístico para determinar si hubo diferencias entre días, únicamente se realizó en los residuos de plaguicidas con niveles de recuperación aceptables ($\geq 60\%$) en el día cero. Sólo el mevinfos presentó una pérdida significativa ($p < 0.05$) del 32.2% en el día 7. No se encontraron diferencias significativas entre días (0 al 7) en ninguno de los otros 6 plaguicidas analizados (Tabla 3.16), por lo que se considera que el dicromato de potasio (0.1%) puede utilizarse como conservador en la leche sin afectar la estabilidad de los residuos de forato, dimetoato, diazinón, fentiión, clorpirifos y clorfenvinfos.

Tabla 3.14 Porcentajes de recuperación promedio, mínimos y máximos de residuos de plaguicidas organofosforados en muestras de leche conservada con dicromato de potasio (0.1%) en refrigeración, durante un periodo de 7 días.

Plaguicida	Porcentajes de recuperación promedio (X)	Porcentajes de recuperación (X) mínimos y máximos
Diclorvos	58.2	52.6 - 68.3
Mevinfos	54.5	41.9 - 62.7
Forato	77.6	70.1 - 82.6
Dimetoato	73.1	51.8 - 81.2
Diazinon	74.5	62.0 - 88.2
Disulfotón	27.6	24.2 - 30.1
Metil paration	32.4	29.3 - 42.0
Fentión	79.7	67.7 - 88.5
Clorpirifos	95.2	92.5 - 97.2
Clorfenvinfos	105.0	82.4 - 115.0
Etión	27.9	19.7 - 39.4

Adición de bicloruro de mercurio

Cuando las muestras de leche se conservaron con bicloruro de mercurio (0.05%) se observó una pérdida importante en los porcentajes de recuperación desde el primer día del experimento en siete de ellos. El mevinfos y el dimetoato no fueron detectables y en los otros 5, los porcentajes de recuperación obtenidos desde el inicio del experimento no fueron aceptables ya que estuvieron por debajo del 60% recomendado en el análisis de residuos en niveles de 50 ppb. Los niveles de recuperación de diazinón, fentión y clorfenvinfos permanecieron con niveles de recuperación adecuados (Tabla 3.15).

El análisis estadístico para determinar si hubo diferencias entre días, únicamente se realizó en los residuos de plaguicidas con niveles de recuperación aceptables ($\geq 60\%$) en el día cero. El porcentaje de recuperación del plaguicida diclorvos (65.5%) tuvo una pérdida significativa ($p < 0.05$) del 33.2% al día siguiente de iniciado el experimento, que llegó a

37.79% en el día 7 (Tabla 3.16). Los niveles de recuperación de diazinón, fentión y clorfenvinfos permanecieron sin diferencias significativas durante los 7 días del experimento (Tabla 3.16).

Tabla 3.15 Porcentajes de recuperación promedio, mínimos y máximos de residuos de plaguicidas organofosforados en muestras de leche conservada con bicloruro de mercurio (0.05%) en refrigeración, durante un periodo de 7 días.

Plaguicida	Porcentajes de recuperación promedio (X)	Porcentajes de recuperación (X) mínimos y máximos
Diclorvos	47.4	38.8-65.5
Mevinfos	No detectable	-
Forato	38.4	33.3-48.9
Dimetoato	No detectable	-
Diazinón	58.2	52.3-64.1
Disulfotón	16.8	12.8-19.9
Metil paratión	42.1	30.1-55.5
Fentión	71.4	64.0-76.8
Clorpirifos	39.1	32.3-47.8
Clorfenvinfos	93.5	62.5-116.4
Etión	13.9	8.5-23.8

El tipo de conservador utilizado en la leche tuvo influencia en los plaguicidas: mevinfos, dimetoato, clorpirifos y forato. En los 2 primeros el bicloruro de mercurio parece haberlos degradado, ya que no fueron detectables desde el inicio del experimento, lo que no ocurrió con el dicromato de potasio (Figura 3.6). Los niveles de recuperación de clorpirifos (39.13%) y forato (38.4%), cuando se utilizó bicloruro de mercurio como conservador, son significativamente menores ($p < 0.05$) que los obtenidos con dicromato de potasio 77.6% y 95.23%, respectivamente. Aún más, cuando se usa bicloruro los porcentajes de recuperación se vuelven inadecuados analíticamente ya que están por debajo del 60% recomendable.

Las bajas recuperaciones (<30%) en los plaguicidas disulfotón y etión, tanto en bicloruro como en dicromato, están dentro de las limitaciones de la técnica multiresiduos utilizada; ya que en los resultados obtenidos en la estandarización de la técnica los niveles de recuperación de estos dos plaguicidas fueron inferiores al 43%.

Tabla 3.16 Estabilidad de residuos de plaguicidas organofosforados en muestras de leche con conservador almacenada en refrigeración durante siete días, medida a través de la pérdida en los porcentajes de recuperación.

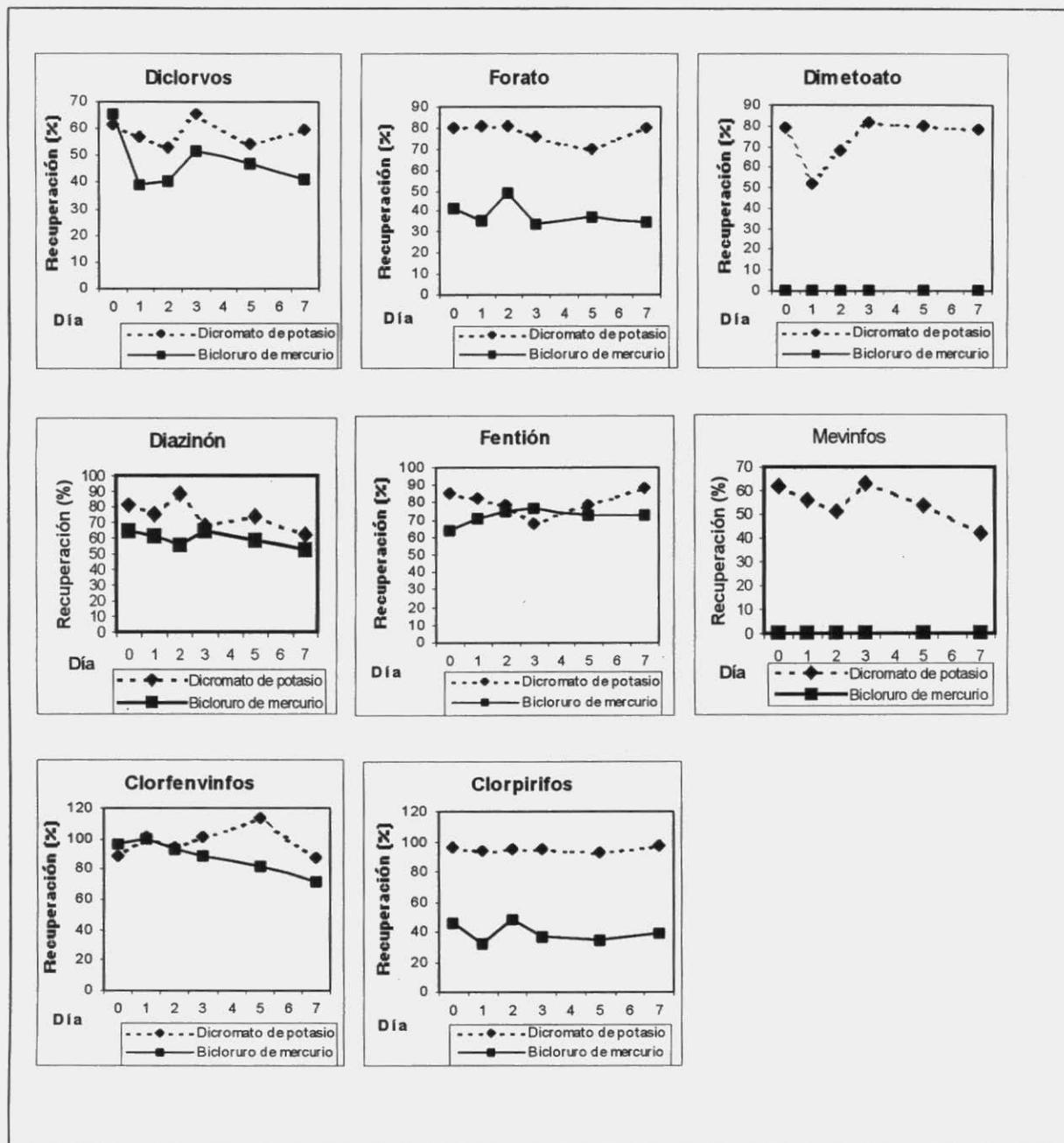
Plaguicida	Pérdidas (al día 7) en los porcentajes de recuperación promedio con dicromato de potasio	Pérdidas (al día 7) en los porcentajes de recuperación promedio con bicloruro de mercurio
Clorfenvinfos	NS	NS
Diazinón	NS	NS
Fentión	NS	NS
Diclorvos	NS	37.79%
Clorpirifos	NS	BR
Forato	NS	BR
Dimetoato	NS	No detectable
Mevinfos	32.2%	No detectable
Metil paration	BR	BR
Disulfotón	BRT	BRT
Etión	BRT	BRT

NS: no significativa ($p>0.05$)

BR: baja recuperación (<60%) desde día cero (no se hizo análisis estadístico)

BRT: baja recuperación de la técnica (no se hizo análisis estadístico)

Figura 3.6. Estabilidad de residuos de plaguicidas organofosforados en muestras de leche cruda conservadas con dicromato de potasio (0.1%) y bicloruro de mercurio (0.05%) durante 7 días en refrigeración.



De acuerdo al comité mixto FAO/OMS de expertos en residuos de plaguicidas en alimentos se consideran inaceptables las pérdidas superiores al 30% durante el almacenaje de las muestras destinadas al análisis de residuos de plaguicidas (FAO/WHO, 1992). Por lo que la utilización de dicromato de potasio (0.1%) como conservador en muestras de leche cruda sólo es adecuado cuando se quieren analizar residuos de los plaguicidas organofosforados clorfenvinfos, diazinón, fentión, diclorvos, clorpirifos, forato y dimetoato. El uso del cloruro de mercurio (0.05%) es aceptable para el análisis de residuos de clorfenvinfos, diazinón y fentión.

4. CONCLUSIONES

Se detectaron residuos de sulfonamidas en las cuatro marcas de leche pasteurizada comercializadas en el Distrito Federal. El valor promedio de sus residuos no sobrepasó los límites máximos permitidos por el CODEX. Sólomente la leche C presentó algunas muestras con niveles de residuos por encima de los límites máximos permitidos.

No se encontraron residuos de nitrofuranos en ninguna de las 4 marcas de leche analizada, por lo que los residuos de estos medicamentos no representan un problema de salud pública en el Distrito Federal.

Se detectaron residuos de plaguicidas organofosforados en las cuatro marcas de leche pasteurizada analizadas. El valor promedio de los residuos detectados no sobrepasó los límites máximos permitidos. El 8.3% del total de las muestras estudiadas presentaron algunos residuos en niveles objetables.

La adición de dicromato de potasio como conservador en muestras de leche cruda, en un nivel del 0.1%, no interfiere en la determinación por HPLC de residuos de sulfonamidas y nitrofuranos en un lapso de 6 a 7 días en refrigeración. El bicloruro de mercurio en un nivel del 0.05% también puede usarse en esta determinación por HPLC, salvo para medir residuos de sulfatiazol, ya que aparentemente puede descomponer a este antibacteriano.

El dicromato de potasio (0.1%) puede utilizarse como conservador en la leche cruda sin afectar la estabilidad de los residuos de los plaguicidas organofosforados: forato,

dimetoato, diazinón, fentión, clorpirifos y clorfenvinfos, cuando se analizan por cromatografía de gases. Sin embargo, los plaguicidas mevinfos y paratión metílico presentaron pérdidas significativas en presencia de este conservador.

La conservación de muestras de leche cruda con bicloruro de mercurio (0.05%) no interfirió en la estabilidad de los plaguicidas organofosforados clorfenvinfos, diazinón y fentión. Sin embargo, se presentaron pérdidas significativas en los plaguicidas: diclorvos, clorpirifos, forato, dimetoato, mevinfos y paratión metílico.

5. RECOMENDACIONES

1. Establecer programas permanentes de vigilancia de residuos tóxicos en leche y en los alimentos en general para disminuir los riesgos para el consumidor.
2. Establecer límites máximos de residuos de sulfonamidas en leche en México.
3. Presentar los resultados del presente trabajo en foros donde coincidan productores lecheros, industriales y autoridades sanitarias a fin de divulgar la problemática y diseñar estrategias para minimizar la presencia de residuos tóxicos en la leche.
4. Continuar estudiando el paso a la leche de los diferentes compuestos químicos que se utilizan en la terapéutica del ganado lechero y en el control de plagas y enfermedades en los piensos destinados a su alimentación.
5. Ensayar el posible uso de otros agentes conservadores en las muestras de leche para determinar si no interfieren con el análisis de residuos de sulfonamidas, nitrofuranos y plaguicidas organofosforados.

6. BIBLIOGRAFIA

Abd-Alla, E.A.M.; Sayed, A.F. y Ahmed, N.S. (1991) Incidence of some organophosphorous pesticide residues in buffalo milk in Giza Governorate. Egyptian Journal of Dairy Science. 19 (2): 243-248.

Abo-El-Nor, S.A.H.; Kholif, A.M.; Abou-Arab, A.A.K y El-Ashry, M.A. (1994) Effect of diazinon spraying to control the external parasites on the productive performance of dairy animals.2. Some blood serum parameters of lactating buffaloes and Fresian cows. Egyptian Journal of Dairy Science. 22 (2): 275-285.

Acheson, R.M. (1960) An introduction to the chemistry of heterocyclic compounds. 2nd Ed. Wiley Int., New York, N.Y., p. 322.

Agarwal, V.K. (1993) Application of solid phase extraction for the analysis of sulfonamides in milk by high performance liquid chromatography. Journal of Liquid Chromatography. 16 (17): 3793 - 3799.

Albert, L. (1997) La legislación mexicana sobre el control sanitario del uso de sustancias tóxicas. Evaluación y propuestas de modificaciones. Memorias Simposium: Significado sanitario de los residuos químicos potencialmente tóxicos en alimentos. Guadalajara, Jal. Diciembre.

Analytical Methods for Pesticides (1996) 6th Edition, edited by Ministry of Welfare, Health and Cultural Affairs. Leidschendam-Netherlands. p. II-60.

AOAC (1995) Official Methods 993.32. Multiple sulfonamide residues in raw bovine milk. Handbook of Official Analytical Methods of Analysis. Association of Official Analytical Chemists. 16th Edition. Vol. I Chapter 23. p. 13.

Bautista, J.A.; Eslava, P.E.; Rosiles, R. y Horta, J.M. (1995) Niveles de nitrofurazona y furazolidona en alimento especial para pollo de engorda determinado por espectrofotometría visible. Veterinaria-México. 26 (3): 219-223.

Baynes, R.E. y Bowen, J.M. (1995 a) Toxicokinetics of methyl parathion in lactating goats. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 43 (6): 1598-1604.

Baynes, R.E. y Bowen, J.M. (1995 b) Rapid determination of methyl parathion and methyl paraoxon in milk by gas chromatography with solid phase extraction and flame photometric detection. Journal of AOAC International. 78(3): 812-815.

Bector, B.S.; Mori, R. y Singhal, O.P. (1988) Rapid platform test for the detection/determination of added urea in milk. Indian-Dairyman. 50(4): 59-62.

Bellomonte, G.; Filesi, C.; Macri, A.; Mosca, M. y Sanzini, E. (1993) High performance liquid chromatography determination of nitrofurans and free chloramphenicol in poultry muscle, liver and eggs. Italian Journal of Food Science. 3: 247-254.

Blüthgen, A. y Heeschen, W.H. (1997) Paracitides en: Monograph on residues and contaminants in milk and milk products: IDF. Brussels, Belgium. p. 41.

Bolles, H.G.; Dixon, W.H.E.; Peterson, R.K.; Tomerlin, J.R.; Day, Jr.E.W. y Oliver, G.R. (1999) U.S. market basket study to determine residues of the insecticide chlorpyrifos. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 47(5): 1817-1822.

Borton, D. y Ollis, D. (1979) *Comprehensive Organic Chemistry*, Vol 4, Pergamon Press, p. 991.

Brathen, G. (1990) Very low levels of pesticides in Norwegian butter. *Meieriposten*. 79(8): 238.

Cannon, J.M.; Vijaypal, R. y Murrill, E. (1996) Characterization of malathion residues in dairy goats and poultry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 44 (10): 3365-3373.

Carlsson, A. y Björck, L. (1991) Charm test II for confirmation of inhibitory substances detected by different microbial assays in herd milk. *Journal of Food Protection*. 54 (1) 32 – 36.

CEE. Comunidad Económica Europea (1992) Reglamento de la CEE N° 675/92 de la Comisión de 18 de Marzo de 1992. *Noticias de Regulación Médica Veterinaria*. 6 (1): 8-13.

CENAM (1997) Monitoreo ambiental de sustancias tóxicas prioritarias a través de un padrón de laboratorios con capacidad confiable. Anexo 7. Centro Nacional de Metrología. División de Metrología de Materiales. México. pp. 24 y 25.

CICOPLAFEST (1992) Catálogo Oficial de Plaguicidas. Ed. Secretaría de Agricultura, Ganadería y Desarrollo Rural, Secretaría del Medio Ambiente, Recursos Naturales y Pesca, Secretaría de Salud y Secretaría de Comercio y Fomento Industrial. México D.F.

CICOPLAFEST (1997) Catálogo Oficial de Plaguicidas. Ed. Secretaría de Agricultura, Ganadería y Desarrollo Rural, Secretaría del Medio Ambiente, Recursos Naturales y Pesca, Secretaría de Salud y Secretaría de Comercio y Fomento Industrial. México D.F.

CICOPLAFEST (1999) Catálogo Oficial de Plaguicidas. Ed. Secretaría de Agricultura, Ganadería y Desarrollo Rural, Secretaría del Medio Ambiente, Recursos Naturales y Pesca, Secretaría de Salud y Secretaría de Comercio y Fomento Industrial. México D.F.

CODEX Alimentarius (1993) CODEX Committee on Pesticide Residues in Foods, 25th Session, Havana, Cuba, 19-26 April, 1993: Status of CODEX Maximum Residue Limits for Pesticides in food and animal feed.

CODEX (1995) Consideraciones generales sobre los métodos de análisis para el control de residuos. En: Residuos de medicamentos veterinarios en los alimentos. Volumen 3, Sección 3. FAO/OMS.

CODEX (1997) ALINORM 97/31A: Comisión del CODEX Alimentarius. Programa Conjunto FAO/ OMS sobre Normas Alimentarias. Comisión del CODEX Alimentarius. 22º Período de sesiones, Ginebra.

Combs, M.T.; Ashraf, K.M. y Taylor, L.T. (1996) Comparison of supercritical CHF₃ and CO₂ for extraction of sulfonamides from various food matrices. *Analytical Chemistry*. 69 (24): 4507-4511.

Cortinas, de N.C. (2001) Hacia un México sin basura. Bases e implicaciones de las legislaciones sobre residuos. Gpo. Parlamentario del PVEM. Talleres Gráficos de la Cámara de Diputados del H. Congreso de la Unión. México D.F. pp. 185-197.

Charm, S.E. y Ruth, G.P. (1991) Advances in Charm Technology for Antimicrobial Residues in milk. Symposium in Lund, Sweden. Sep 17.

Degroodt, J.M.; Wyhowski, de B.B.; De Groof, J.; Beernaert, H. y Srebrnik, H. (1992) Chloramphenicol and nitrofurantoin residue analysis by HPLC and photodiode array detection in meat and fish. *Journal of Liquid Chromatography*. 15(13): 2355- 2371.

Directorio de Medicina Veterinaria, Nutrición y Zootecnia (1997) 1ª Edición. Mercadeo Estadístico S.C. México.

El-Hoshy, S.M. (1997) Insecticide residues in milk and influence of heat treatments and bacterial fermentation as safeguard against these pollutants. *Journal of Assiut Medical Veterinary*. 37 (73): 141-155.

Etcherhoff, A.M. y Petz, M. (1994) Quantitative HPTLC analyse von Nitrofurantol-Rückständen in Ei und Milch nach prä-chromatographischer Derivatisierung. *Deutsche Lebensmittel-Rundschau*. 90 (11): 341-344.

FAO/WHO (1992) Pesticides residues in food. Report of the 1992 Joint FAO/WHO Meeting of Experts. pp. 8-9.

Ferrini, A.M.; Filesi, C.; Mannovi, V.; Sanzini, E.; Aureli, P. y Bellomonte, G. (1994) Indagine sulla presenza di residui di sulfamidici in latti dell' Agro Pontino. *L. Industria del latte*. XXX (1):3: 31-39.

FIL/IDF (1988). International IDF Standard 141.1988. International Dairy Federation. Brussels, Belgium.

Galeano, D.T.; López, M.C.; Martínez, G.M. y Salinas, S. (1994) Rapid determination of nitrofurantoin, furazolidone and furaltadone in formulations, feed and milk by high performance liquid chromatography. *Journal of Liquid Chromatography*. 17 (2): 457-475.

Gacnik, K.S.; Kirbis, A. y Cerkenik, V. (2000) Residues of veterinary drugs in Slovenian milk 1995-1998. *Mljekarstvo*. 50 (3): 191-198.

Grether, A.; Hammer, P. y Heeschen, W. (1994) Zum immunochemischen Nachweis ausgewählter sulfonamide in milch: Kieler Milchwirtschaftliche Forschungsberichte. 46: 101-126.

Hapke, H.J. (1997) Presencia de compuestos indeseables en alimentos de origen animal. Memorias Simposium: Significado sanitario de los residuos químicos potencialmente tóxicos en alimentos. Guadalajara, Jal. Diciembre.

Hapke, H.J. y Grahwit, G. (1987) Residues of Veterinary Drugs, Feed Additives and Environmental Chemicals, in Animal Production and Environmental Health, World Animal Science, B6, edited by Strauch, D. Elsevier Science Publishers B.V. p. 231.

Hassall, K.A. (1990) The biochemistry and uses of pesticides. 2nd Ed. MacMillan Press LTD. London.

Heeschen, W.H. (1993) Residues of antibiotics and sulphonamides in milk: Significance and toxicological evaluation, legal situation within the European Community (EEC) and method related activities of the International Dairy Federation. Bulletin of the International Dairy Federation. 283 (2): 3 - 12.

Heeschen, W.H.; Burt, R. y Blüthgen, A. (1997) Introduction and background information en: Monograph on Residues and Contaminants in Milk and Milk Products. IDF. Brussels, Belgium. p. 2.

Heeschen, W.H. (1997) Principles for the toxicological evaluation of the residues, en Monograph on Residues and Contaminants in Milk and Milk Products. IDF. Brussels, Belgium. pp. 12-15.

Hoffmeister, A.; Suhren, G. y Heeschen, W. (1991) High performance liquid chromatographic determination of sulfadimidine residues in milk. Incidence in consumer milk from various european countries. *Milchwissenschaft*. 46 (12): 770-774.

Honkanen, B.T. y Reybroeck, W. (1997) Antimicrobials, en Monograph on Residues and Contaminants in Milk and Milk Products. IDF. Brussels, Belgium. pp. 26-33.

Horne, E.; Cadogan, A.; O'Keefe, M. y Hoogenboom, L.A.P. (1996) Analysis of protein-bound metabolites of furazolidone and furaltadone in pig liver by high performance liquid chromatography and liquid chromatography-mass spectrometry. *Analyst*. 121: 1463-1468.

INE (2000) Características de peligrosidad ambiental de plaguicidas. Manual de Trabajo. Instituto Nacional de Ecología. Secretaría del Medio Ambiente, Recursos Naturales y Pesca (SEMARNAP). México D.F. pp. 172-184.

Johnson, J.C.; Bowmann, M.C.; Leuck, D.B. y Knox, F.E. (1971) Persistence of Phosvel in corn silage and effect of feeding dairy cows the treated silage. *Journal of Dairy Science*. 54(12): 1840-1947.

Karmakar, B. y Ghatak, P.K. (1997) Effect of chemical preservatives on different constituents of cow milk during storage under refrigerated conditions. *Cheiron*. 26 (5-6): 89-93.

Kituyi, E.N.; Wandiga, S.O. y Jumba, I.O. (1997) Occurrence of chlorfenvinphos residues in cow's milk sampled at a range of sites in western Kenya. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. 58 (6): 969-975.

Knupp, G.; Pollmann, H. y Jonas, D. (1986) An improved HPTLC method for the rapid identification and quantification of sulfonamides. *Chromatographia*. 22: 21-24.

Kumar, L.; Toothill, J.R. y Ho, K.B. (1994) Determination of nitrofurans residues in poultry muscle tissues and eggs by liquid chromatography. *Journal of AOAC International*. 77 (3): 591-595.

Larrondo, M. E. (1997) Organizaciones de Productores. En: II seminario internacional sobre los sistemas nacionales lecheros de América del Norte. UNAM-UAM. México D.F. Enero 22-24.

Lopez-Avila, V. y Benedicto, J. (1998) Stability of organochlorine and organophosphorus pesticides when extracted from solid matrixes with microwave energy. *Journal of AOAC International*. 81 (6): 1224-1232.

Mahedero, M.C.; Salinas, F.; Jimenez, A. y Aaron, J.J. (1994a) A new first derivative

photochemically induced fluorescence spectrometric method for the determination of sulfapyridine in milk. *Analytical Letters*. 27 (8):1543-1555.

Mahedero, M.C.; Salinas, F. y Aaron, J.J. (1994b) Determination of sulphanilamide in milk by first derivative and second derivative spectrofluorometry. *Journal of Pharmacy and Biomedical Analysis*. 12(9): 1097-1101.

Magdic, S.; Boyd-Boland, A.; Jinno, K. y Pawliszyn, J.B. (1996) Analysis of organophosphorus insecticides from environmental samples using solid-phase microextraction. *Journal of Chromatography A*. 736: 219-228.

Mellgren, C.; Sternesjo, A.; Hammer, P.; Suhren, G.; Bjorck, L. y Heeschen, W. (1996) comparison of biosensor, microbiological, immunochemical and physical methods for detection of sulfamethazine residues in raw milk. *Journal of Food Protection*. 59 (11): 1223-1226.

Mitchell, J.M.; Yee, A.J.; McNab, W.B.; Griffiths, M.W. y McEwen, S.A. (1999) Validation of the LakTek test applied to spiked extracts of tissue samples: determination of performance characteristics. *Journal of AOAC International*. 82 (1): 79-84.

Molina, M.P.; Altahus, R.L.; Fernández, N.; Peris, C. y Rodríguez, M. (1999) Aplicación del método enzimático Penzym R en la determinación de inhibidores en la leche de oveja. *Producción animal*. 20 (1): 158-160.

Monge, R.; Arias, M. L. y Ellner, R. (1993) Contamination of bovine milk with residues of inhibitory substances in Costa Rica: *Revista de Biología Tropical*. 41(3): 855-856.

Moses, M. (1992) Cosecha dolorosa. Campesinos y plaguicidas Parte II. Pesticide Education Center. San Francisco, E.U.A.

Noa, M.; Hernández, J. y Alfonso, H. A. (1992) Monitoreo de plaguicidas en algunas cuencas lecheras de Cuba. Parte 2. Plaguicidas organofosforados. *Revista de Salud Animal*. 14(3): 165- 170.

NOM-091-SSA1-1994 Norma Oficial Mexicana: Leche pasteurizada. Disposiciones y especificaciones sanitarias. SSA.

Nouws, J.F.M.; Egmond, H. Van; Loeffen, G.; Schouten, J.; Keukens, H.; Smulders, I. y Stegeman, H. (1999) Suitability of the Charm HVS and a microbiological multiplate system for detection of residues in raw milk at EU maximum residue levels. *Veterinary Quarterly*. 21 (1): 21-27.

Ortega, C. J.; Espinosa, T.F. y López, C.L. (1994) El control de los riesgos para la salud generados por los plaguicidas organofosforados en México: Retos ante el Tratado de Libre Comercio. *Revista Salud Pública de México*. 36 (6): 624-632.

Osuna, J. I.; Frías, M.; Zazueta, H. y López, G. (1998) Plaguicidas organofosforados en sedimentos superficiales del Pacífico Subtropical Mexicano. Reporte de investigación del

Proyecto CONACyT 0185P-T: Parte 3.3: 193-201.

Palacios, N.M.E.; Paz, R.P.; Hernández, R.S. y Mendoza, A.L. (1999) Sintomatología persistente en trabajadores industrialmente expuestos a plaguicidas organofosforados. *Revista de Salud Pública de México*. 41 (1): 55-61.

Paulson, G.D.; Feil, V.J.; Zaylskie, R.G.; Giddings, J.M. y Slinger, W.D. (1994) Depletion of residues from milk and blood of cows dosed orally and intravenously with sulfamethazine. *Journal of AOAC International*. 77 (4): 895-900.

Petz, A.C. (1990) Trends and perspectives in analytical methodology in residues of veterinary drugs in food. *Proceedings of the EuroResidue Conference*. The Netherlands.

Pinto, M.; Vega, S. y Pérez, N. (1996) Métodos de análisis de la leche y derivados. UAM-X/UACH. Valdivia, Chile. pp. 53-54.

Quattrocchi, O.A.; de Andrizi, S.I.A. y Laba, R.F. (1992) Introducción a la HPLC: Aplicación y Práctica. Artes Gráficas Farro, Buenos Aires, Argentina. pp. 316-318.

Repetto, M.; Martínez, D. y Sanz, P. (1996) Actualización de la toxicología de los plaguicidas en: *Toxicología Avanzada*. Repetto M. (Editor). Ediciones Díaz de Santos S. A. España.

Romero, S.I. (1997) Programa nacional de control de residuos tóxicos. *Memorias*

Simposium: Significado sanitario de los residuos químicos potencialmente tóxicos en alimentos. Guadalajara, Jal. Diciembre.

Schwartz, D.P. y Lightfield, A.R. (1995) Practical screening procedures for sulfamethazine and N4-acetylsulfamethazine in milk at low parts per billion levels. *Journal of AOAC International*. 78 (4): 967-970.

Sheleih, M.A.; Abdel, H.E.H. y Salama, I.M. (1997) Study of withdrawal period of some antibiotics and sulfa drugs in milk of treated dairy buffaloes. *Journal of Assiut Medical Veterinary*. 36 (71): 74-87.

Sherma, J. y Duncan, M. (1986) Determination of sulfanilamide and sulfisoxazole in drug preparations by quantitative high performance TLC. *Journal of Liquid Chromatography*. 9: 1861 - 1868.

Spradbery, J.P. y Tozer, R.S. (1996) The efficacy of diazinon impregnated ear tags against buffalo fly and resulting weight gains and diazinon residues in meat and milk. *Australian Veterinary Journal*. 73 (1): 6-10.

Suhren, G. y Heeschen, W. (1996) Detection of inhibitors in milk by microbial test. A review. *Nahrung*. 40 (1): 1-7.

Sumano, H.S. y Ocampo, L. (1997) *Farmacología Veterinaria*. Segunda Edición. McGraw-Hill Interamericana, Healthcare Group, México, D.F.

Takeda, N. y Akiyama, Y. (1992) Rapid determination of sulphonamides in milk using liquid chromatographic separation and fluorescamine derivatization. *Journal of Chromatography*. 607: 31-35.

Vázquez, M.L.; Languré, A.; Orantes, C.; Flores, M.E. y Bermúdez, M.C. (1999) Incidence of pesticide residues in adipose tissue of beef, pork and poultry from plants located in the northwest region of Mexico. *Journal of Muscle Foods*. 10 (4): 295-303.

Venant, A.; Borrel, S.; Mallet, J. y Gillon, E. (1989) Changes in the contamination of food stuffs of animal origin by pesticide and polychlorinated biphenyl residues. Statutory provisions. *Sciences-des-Aliments*. 9 (3): 473-489.

Vincentini, O.; De Angekis, I.; Stamatii, A. y Zucco, F. (1993) Functional alterations induced by the food contaminant furazolidone on the human tumoral intestinal cell line Caco-2. *Proceedings of the 7th International Workshop on in vitro Toxicology*: 7(4): 403-406.

Wu, D.; Zhang, Y. y Yao, R. (1999) Enzyme linked immunosorbent assay for detecting sulfamethyldiazine content in milk. *Chinese Journal of Veterinary Science*. 19 (2): 175-177.

Yess, N. J.; Houston, M. G. y Gunderson, E. L. (1991) Food and Drug administration Pesticide Residue Monitoring of Foods: 1978- 1982. *Journal of AOAC International*. 74(2): 265-272.

Zomer, E.; Saul, S. y Charm S.E. (1992) HPLC receptogram: a method for confirmation and identification of antimicrobial drugs by using liquid chromatography with microbial receptor assay.I. Sulfonamides in milk. *Journal of AOAC International*. 75 (6): 987-993.

Liquid Chromatographic Determination of Multiple Sulfonamides, Nitrofurans, and Chloramphenicol Residues in Pasteurized Milk

NORMA PEREZ and REY GUTIERREZ

Universidad Autónoma Metropolitana, Departamento de Producción Agrícola y Animal, México, D.F. (SPELL OUT D.F. ON ALL ADDRESSES)

MARIO NOA

Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria, La Habana, Cuba

GILBERTO DIAZ

Universidad Autónoma Metropolitana, Departamento de Producción Agrícola y Animal, México, D.F.

HECTOR LUNA¹

Universidad Autónoma Metropolitana, Departamento de Sistemas Biológicos, México, D.F.

IRMA ESCOBAR and ZENAIDA MUNIVE

Universidad Autónoma Metropolitana, Departamento de Producción Agrícola y Animal, México, D.F.

A rapid and selective liquid chromatographic method was developed to detect 6 sulfonamides, 3 nitrofurans, and chloramphenicol residues in pasteurized milk. The 10 drugs were extracted with chloroform–acetone and the organic phase was evaporated; the residues were dissolved in an aqueous sodium acetate buffer solution 0.02M (pH = 4.8), and the fat was removed by washing with hexane. The aqueous layer was collected, filtered, and injected. The 6 sulfonamides and chloramphenicol were detected at 275 nm ultraviolet (UV) using a gradient system starting with sodium acetate buffer solution–acetonitrile (95 + 5) and finishing with sodium acetate buffer solution–acetonitrile (80 + 20). Nitrofurans were detected at 375 nm (UV) isocratically with sodium acetate buffer solution–acetonitrile (80 + 20). For 50 ppb fortified milk, the average recoveries were (sulfathiazole) 65.52%; (sulfamerazine) 75.36%; (sulfamethazine) 93.94%; (sulfachlorpyridazine) 75.94%; (sulfamethoxazole) 85.18%; (sulfamonomethoxine) 83.45%; (chloramphenicol) 104.17%; (nitrofurazone) 91.81%; (furazolidone) 100.76%; and (furaltadone) 72.38%. Method detection limits ranged from 4 ppb (nitrofurazone) to 16 ppb (sulfamethazine). Some matrix interferences (3–7 ppb) were observed only with sulfonamides.

Modern farming practices, involving intensive rearing of animals in restricted accommodations, inevitably increases the incidence and spread of disease. The therapeutic use of medicinal substances is essential to cure and control disease outbreaks. Sulfonamides, nitrofurans, and antibiotics are powerful antimicrobials which are widely used in veterinary medicine (1). Residues of these drugs can persist in the animal and enter the human food chain. Several reports (2–5) have indicated the presence of some of these compounds in milk. It has also been stated that sulfamethazine and nitrofurazone are carcinogenic (6) and that chloramphenicol can cause neoplastic anemia. As the number of drugs being used on animals is increasing, efforts are directed toward multiresidue methods to determine them below or at the allowed tolerance levels. Liquid chromatography (LC) is one of the most widely used techniques for determining antibiotics in edible animal tissues (7).

The present study describes a method for the simultaneous determination of 6 sulfonamides, 3 nitrofurans, and chloramphenicol residues in pasteurized milk. Antimicrobials under study (except chloramphenicol) are approved in México for use with dairy cows. The method described was designed to monitor the residues levels of these authorized drugs and illegal chloramphenicol residues. It is based on the AOAC Official Method 993.32 for multiple sulfonamide residues in raw bovine milk (8, 9) with modifications in the chromatographic conditions.

Experimental

Apparatus

(a) LC system.—Merck Hitachi (CITY & STATE?); variable UV detector, 250 × 4.6 mm reversed-phase C₁₈ column, 5 μm particle size (LiChroCART 250-4, Merck 1.50838; Darmstadt, Germany); 2 cm guard column. Operating conditions: flow rate, 1.0 mL/min (sulfonamides), 1.2

Received January 16, 2001. Accepted by JM May 28, 2001.
Corresponding author's e-mail: normaaperez@hotmail.com.

Table 1. Gradient system program

Time (min)	Linear					
	0	5	20	30	35	45
% B	0	0	100	100	0	0

mL/min (nitrofurans); standard injection, 5 μ L; sample injection, 20 μ L. Run time, 45 min for sulfonamides and chloramphenicol, and 15 min for nitrofurans; chart speed, 0.5 cm/min; detector set at 275 nm for sulfonamides and chloramphenicol and 370 nm for nitrofurans.

(b) Rotary evaporator.

(c) Pipettors.

(d) Filter paper.—12.5 cm diameter, fast speed (coarse precipitates).

(e) Nylon filters.—0.45 μ m porosity, 47 mm; and 0.45 μ m, 13 mm.

(f) Vortex mixer.

(g) Volumetric pipets.—1, 5, and 10 mL.

(h) Volumetric flasks.—10 and 25 mL.

(i) Funnels.—Short stem, 75 mm id.

(j) Separatory funnels.—125 mL.

(k) Round bottom flasks for rotoevaporator.—100 mL.

(l) Conical tubes.—15 mL.

(m) Disposable syringes.—3 mL.

(n) Pasteur pipets.

Reagents

(a) Anhydrous sodium acetate, glacial acetic acid.—ACS, reagent.

(b) Water, acetonitrile, hexane, methanol.—LC grade.

(c) Acetone, chloroform.—Residue grade.

(d) 0.02M sodium acetate solution in water.—Filter through 0.45 μ m nylon filter.

(e) 0.02M acetic acid solution in water.—Filter through 0.45 μ m nylon filter.

(f) 0.02M sodium acetate buffer solution, pH 4.8.—Adjust sodium acetate solution (d) pH to 4.8 with acetic acid solution (e).

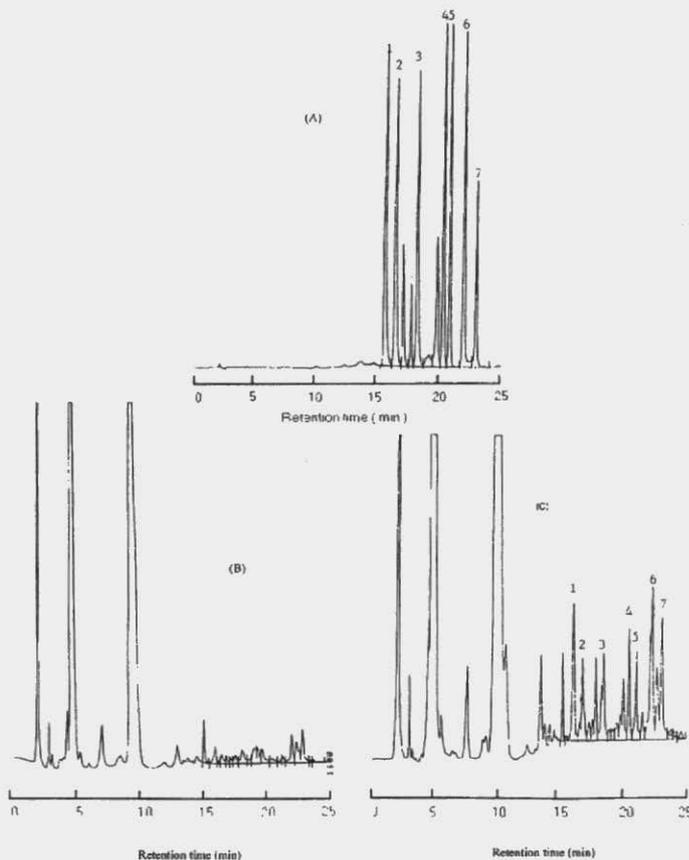


Figure 1. Chromatograms of (A) standard mixture (50 ng/mL each): (1) sulfathiazole, (2) sulfamerazine, (3) sulfamethazine, (4) sulfamonomethoxine, (5) sulfachloropyridazine, (6) sulfamethoxazole, (7) chloramphenicol; (B) control milk; (C) milk fortified at 50 ppb.

Table 2. Method performance for determination of 6 sulfonamides, 3 nitrofurans, and chloramphenicol in pasteurized milk by LC (n = 10)

Drug	Interferences, average ppb	Mean recovery, %	SD ^a , %	RSD ^b , %	MDL ^c , ppb
Sulfathiazole ^d	5	65.52	10.63	16.22	15
Sulfamerazine ^d	7	75.36	9.42	12.50	13
Sulfamethazine ^d	6	93.94	11.32	12.05	16
Sulfachloropyridazine ^d	3	75.94	10.15	13.37	15
Sulfamethoxazole ^d	7	85.18	10.67	12.52	15
Sulfamonomethoxine ^d	3	83.45	9.12	10.93	13
Chloramphenicol ^d	—	104.17	8.80	8.44	15
Nitrofurazone ^e	—	91.81	2.65	2.89	4
Furazolidone ^e	—	100.76	5.57	5.53	8
Furaltadone ^e	—	72.38	9.48	13.10	13

^a Standard deviation.

^b Relative standard deviation.

^c Method detection limit.

^d Gradient system (275 nm).

^e Isocratic system (375 nm).

(g) *Mobile phases*.—Sodium acetate buffer solution 0.02M–acetonitrile (95 + 5, v/v); sodium acetate buffer solution 0.02M–acetonitrile (80 + 20, v/v).

(h) *Extraction solution*.—Chloroform–acetone (2 + 1, v/v). Prepare daily, 100 mL/sample. Measure chloroform and acetone in separate graduated cylinders, add acetone to chloroform, and mix thoroughly. Let mixture equilibrate ca 10–15 min, to room temperature before using.

(i) *Sulfonamide standards*.—Sulfathiazole (STZ; Aldrich Chemical Co., Milwaukee, WI); sulfamerazine (SMR); sulfamethazine (SMT); sulfachloropyridazine (SCP); sulfamonomethoxine (SMM; Sigma Chemical Co., St. Louis, MO); sulfamethoxazole (SMX; Mexican Pharmaceutical Standard).

(j) *Nitrofurans standards*.—Nitrofurazone (NF); furaltadone (FD; Sigma); furazolidone (FZ; Mexican Pharmaceutical Standard).

(k) *Chloramphenicol (CAP) standard*.—Mexican Pharmaceutical Standard.

Preparation of Standard Solutions

(a) *Stock solutions*.—Accurately weigh 25 mg, to nearest 0.1 mg, STZ, SMR, SMT, SCP, SMX, SMM, NF, FZ, FD, and CAP standards into separate weighing vessels. Transfer to separate 25 mL volumetric flasks (1 mg/mL). Dissolve in methanol.

(b) *Fortification solution (10 µg/mL of each substance under study)*.—Transfer 250 µL of each standard solution (1 mg/mL) into single 25 mL volumetric flask, dilute to volume with methanol, and mix thoroughly. Prepare daily.

(c) *Sulfonamides, nitrofurans, and CAP working standards*.—Because loop capacity (20 µL) was 5 times smaller than that (100 µL) recommended in AOAC Official Method 993.32, standard solutions were prepared at higher concentra-

tions (25, 50, and 100 ppb, milk equivalent) to achieve good analytical parameters.

(1) *250 ng/mL (25 ppb, milk equivalent)*.—Dilute 250 µL fortification solution to 10 mL with methanol in 10 mL volumetric flask and mix thoroughly.

(2) *500 ng/mL (50 ppb, milk equivalent)*.—Dilute 500 µL fortification solution to 10 mL with methanol in 10 mL volumetric flask and mix thoroughly.

(3) *1000 ng/mL (100 ppb, milk equivalent)*.—Dilute 1 mL fortification solution to 10 mL with methanol in 10 mL volumetric flask and mix thoroughly.

Sample Extraction

Place 10 mL milk sample (pasteurized bovine milk free from residues) in 125 mL separatory funnel and fortify at 50 ppb by adding 50 µL fortification solution. Add 50 mL extraction solution, and stopper. Shake vigorously 1 min; carefully vent through stopper. (Do not vent through stopcock because milk solids clogging it may result in sample loss.) Shake for 1 additional min, vent, and let phases separate 1 min. Repeat shaking sequence and let phases separate 5 min. Draw off extraction solution, filtering through washed (with extraction solution) filter paper, and collect in a 100 mL round bottom flask (take extreme care to prevent milk from entering stopcock). Add 25 mL extraction solution to separatory funnel and repeat exactly as before. Add this extract to the other. Rinse filter with extraction solution (2 × 5 mL) and add to the other extracts.

A nonfortified milk sample is treated in the same way for negative control (control milk).

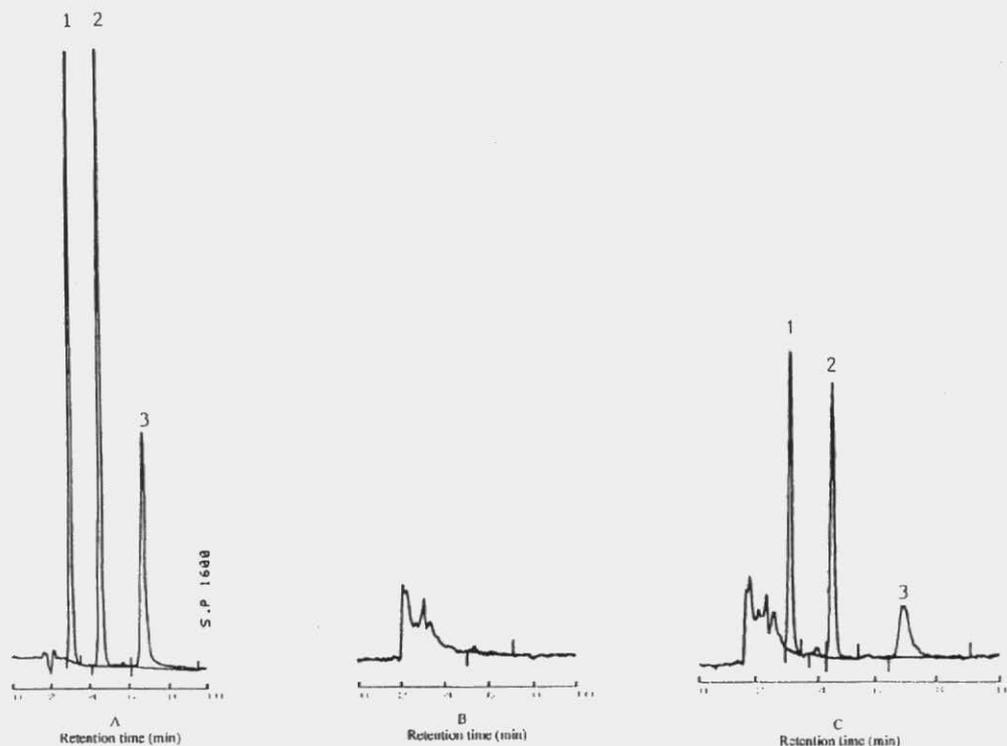


Figure 2. Chromatograms of (A) standard mixture (50 ng/mL of each one): (1) nitrofurazone, (2) furazolidone, (3) furaltadone; (B) control milk; (C) milk fortified at 50 ppb.

Sample Preparation

Carefully evaporate extracts collected in 100 mL round bottom flask, just to dryness on rotary evaporator at 32°C. Dissolve residue in 1 mL 0.02M sodium acetate buffer solution, agitating 1 min on vortex mixer. Add 5 mL hexane, and vortex 1 min. Using a Pasteur pipet, transfer phases to 15 mL conical tubes; let phases separate 2 min, and immediately vortex 1 more min. Let phases separate more than 15 min. Remove aqueous layer with Pasteur pipet and place in 2 mL vial. (Note: Aqueous layer will be homogeneous; therefore, it is not necessary to remove 100% of layer; 50–75% aqueous layer is adequate for 2 injections.) Using 3 mL syringe, filter aqueous layer through 0.45 μ m, 13 mm nylon filter. Store in sealed vials.

Standard Curve

Three standard curves containing 6 sulfonamides, 3 nitrofurans, and chloramphenicol were prepared at 25, 50, and 100 ng/mL levels (milk equivalent).

Chromatographic Systems

Two chromatographic systems were used:

(1) A gradient system for determination of 6 sulfonamides and chloramphenicol. Detection at 275 nm, run time 45 min. Mobile phases: (A) 0.02M sodium acetate buffer solution–acetonitrile (95 + 5, v/v); (B) 0.02M sodium acetate buffer solution–acetonitrile (80 + 20, v/v). (see Table 1):

(2) An isocratic system for nitrofurans determination. Detection at 370 nm, run time 15 min. Mobile phase (B). Program

Samples were first analyzed with isocratic system and then with gradient system, after equilibration time of 1 h.

Method Detection Limit (MDL)

MDL was estimated on the basis of results for 10 replicates of milk sample spiked at 50 ppb level and was calculated with the following formula:

$$MDL = t(0.99) \times SD$$

where $t(0.99)$ is the Student's 1-tailed t -value at 99% confidence level and with $(n - 1)$ degrees of freedom, and SD is the standard deviation of replicate analysis.

Peak areas of standards and extracts of spiked samples, run under identical conditions, were compared to determine percentage recoveries. Precision was determined by calculating relative standard deviations (RSDs) of each drug recovery for 10 replicates.

Results and Discussion

The extraction mixture chloroform–acetone proposed in AOAC Method 993.32 (8) for sulfonamide multiresidue in raw milk enabled 6 sulfonamides, 3 nitrofurans, and

chloramphenicol to be extracted simultaneously from pasteurized milk samples with good average recovery (84.85%). At 275 nm, all sulfonamides and chloramphenicol were well resolved in the gradient system used (Figure 1). There were small matrix interference peaks, ranging from 3 ppb for SMM to 7 ppb for SMR (Table 1). The gradient system used reduced analysis time in comparison with Method 993.32 (8), in which, detection of STZ, SMZ, SMT, and SCP requires 80 min (2 isocratic runs of 40 min each). The gradient system required only 45 min.

fig1, tb14

Nitrofurazone and furazolidone can also be resolved with the gradient system, but furaltadone cannot be resolved and may interfere with sulfamethoxazole. Changing the detection wavelength to 370 nm and using an isocratic system with mobile phase B enhanced the retention-elution behavior of furaltadone and allowed good resolution of the 3 nitrofurans. At this wavelength, the sulfonamides and CAP were not detected, and there were no interferences from the matrix (Figure 2). This system was chosen for quantitation of the 3 nitrofurans.

fig2

Because LC system has no column temperature control, retention time changes occurred during the day as the room temperature fluctuated. This made interpretation of chromatograms difficult; however, relative retention times were helpful. Changes in retention times ranged from 0.09 min for SMT to 0.29 min for SMZ.

The detector response was linear over the range of 25–100 ng/mL for all drugs under study. The standard calibration curves had correlation coefficients in excess of 0.99. In most cases, MDLs were not as low as 5 ppb established in AOAC Method 993.32 (8). They ranged from 4 ppb for NF to 16 ppb for SMT (Table 2). In the present study, the sample volume injected, 20 μ L (loop capacity), was 5 times lower than that reported in AOAC 993.32 (100 μ L). Therefore, fortification levels of 50 ppb were used instead of 20 ppb (Method 993.32) to achieve good analytical parameters. Considering the maximum residue levels (MRLs) of sulfonamides in milk (25 μ g/kg for SMT and 100 μ g/kg for total sulfonamides) recommended by Codex Alimentarius and the European Union (1), the

MDLs obtained in this work could be useful for detecting residue violations in milk samples.

Average recoveries of 10 replicate analyses, SDs, and RSDs are shown in Table 2. The average recoveries for sulfonamides ranged from 65.52% for STZ to 93.94% for SMT. They were higher for STZ, SMT, and SCP than those reported in AOAC 993.32 (56.14 to 82.87%). Average recoveries for nitrofurans were 72.38% for FD to 100.76% for FZ. CAP recovery was 104.17%. RSDs obtained were 1.63–2.66 times higher than those established in Method 993.32, probably due to manual injection in our case, as well as the chromatographic system used. Nevertheless, they were acceptable for residue detection methods at the 50 ppb concentration level (10).

These results showed that the method is suitable for the adequate simultaneous detection of 10 drugs. Developing microanalytical techniques which permit antimicrobial residues in milk to be detected at ppb ranges is very important in order to protect consumer health.

References

- (1) International Dairy Federation (1997) *Monograph on Residues and Contaminants in Milk and Milk Products*, FIL/IDF, (CITY & STATE?)
- (2) Hoffmeister, A., Suhren, G., & Heeschen, W. (1991) *Milchwissenschaft* **46**, 770–774
- (3) Grether, A., Hammer, P., & Heeschen, W. (1994) *Kiel. Milchwirtschaft. Forschungsber.* **46**, 101–126
- (4) Ferrini, A.M., Filesi, C., Mannovi, V., Sanzini, E., Aureli, P., & Bellamonte, G. (1994) *L. Ind. Latte XXX (PLEASE GIVE VOLUME NUMBER)*, 31–39
- (5) Monge, R., Arias, M.L., & Ellner, R. (1993) *Rev. Biol. Trop.* **41**, 855–856
- (6) Takeda, N., & Akiyama, Y. (1992) *J. Chromatogr.* **607**, 31–38
- (7) Agarwall, V.K. (1993) *J. Liq. Chromatogr.* **16**, 3793–3799
- (8) *Official Methods of Analysis* (1995) 15th Ed., AOAC INTERNATIONAL, Gaithersburg, MD, Method 993.32
- (9) Smedley, M.D. (1994) *J. AOAC Int.* **77**, 1112–1122
- (10) Codex Alimentarius (1989) ALINORM 89/31, Appendix VI, Geneva, Switzerland