

CINÉTICA DE ELIMINACIÓN DE LINDANO EN GRASA DE LECHE DE VACAS TRATADAS CON TRES DOSIS DE LINDANO

ELIMINATION KINETICS OF LINDANE AT THREE DOSES IN COW'S MILK FAT

Luís Ocampo-Camberos¹, Rene Rosiles-Martínez², Graciela Tapia-Pérez³, Héctor Sumano-López^{1*}

¹Departamento de Fisiología y Farmacología, (sumano@servidor.unam.mx), ²Departamento de Nutrición Animal y Bioquímica, ³Departamento de Genética y Bioestadística, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México, México D.F. 04510, México

RESUMEN

Existen evidencias de que el lindano se elimina por la leche y el riesgo de exposición por el consumo diario es mucho mayor que en otros tipos de alimentos, por lo que es básico conocer y respetar el tiempo de retiro de todo producto consumido por el hombre. El presente estudio se realizó con la finalidad de evaluar si la aplicación de lindano por aspersión a 75 y 300 $\mu\text{g kg}^{-1}$ de peso corporal (dosis recomendada y sobredosis), generaba concentraciones de lindano en leche menores al límite máximo permisible (0.01 mg kg^{-1}). Para ello se determinaron, mediante cromatografía de gases con detector de captura de electrones, las concentraciones de lindano en leche de vacas Holstein-Friesian en producción, después de un tratamiento tópico por aspersión a dosis de 75 (grupo A) y 300 $\mu\text{g kg}^{-1}$ (grupo B) y sin lindano (grupo C). Las variables de eliminación en leche fueron: coeficiente de eliminación (Kel), vida media ($T_{1/2\beta}$) y tiempo de retiro. Se usaron ocho vacas con un peso promedio de 525 ± 12.5 kg con producción de 19-23 L d^{-1} . Eliminando el despunte, se obtuvieron muestras de 75 mL de leche de la ordeña de la mañana en cada cuarto, para hacer una sola muestra por ordeño por 14 d, y se congeló a -20 °C hasta su análisis. Con el método analítico se logró recuperar de 90.37 ± 1.52 %, ($R^2=0.986$). La cantidad mínima detectable fue 0.001 mg L^{-1} (y la cantidad mínima cuantificable 0.008 mg L^{-1}). Para el grupo A se obtuvo una Kel de 0.382 h^{-1} y una $T_{1/2\beta} = 1.81$ d y el tiempo requerido para llegar a la cantidad de residuos inferiores a los máximos permitidos (MRL) por la WHO/FAO de 0.01 mg kg^{-1} fue 13 d. Para el grupo B se obtuvo Kel = 0.243 h^{-1} y $T_{1/2\beta} = 2.84$ d, y el tiempo requerido para llegar a la cantidad de residuos inferiores a los máximos permitidos (MRL) fue 29 d. El método implementado fue validado, la concentración de lindano en leche puede ser mayor al valor de MRL

ABSTRACT

There is evidence of lindane being eliminated through milk, and the risk of exposure by daily consumption is much greater than in other types of food; therefore, knowing and respecting the time of withdrawal of any product consumed by the human being is fundamental. The present study was carried out with the purpose to assess if lindane application using spray at 75 and 300 $\mu\text{g kg}^{-1}$ body weight (recommended dose and overdose) generated lower lindane concentrations in milk than the permissible maximum limit (0.01 mg kg^{-1}). Therefore, the lindane concentrations in milk of Holstein-Friesian cows were determined by gas chromatography with electron capture detector after a topical treatment by spraying a dose of 75 (group A) and 300 $\mu\text{g kg}^{-1}$ (group B), and without lindane (group C). The elimination variables in milk were: elimination coefficient (Kel), mean lifetime ($T_{1/2\beta}$) and withdrawal time. Eight cows with mean weight of 525 ± 12.5 kg producing 19 -23 L d^{-1} were utilized. Skimming milk, samples of 75 mL per quarter of the morning milking were obtained in order to make one single sample per milking for 14 d, freezing it at -20 °C until its analysis. Using the analytical method, a recovery of 90.37 ± 1.52 % ($R^2=0.986$) was achieved. The minimum detectable quantity was 0.001 mg L^{-1} (and the minimum quantifiable amount 0.008 mg L^{-1}). For group A, 0.382 h^{-1} Kel and $T_{1/2\beta} = 1.81$ d were obtained, and the time required to reach from the quantity of the least residues to the maximum residue limit (MRL) by WHO/FAO of 0.01 mg kg^{-1} , was 13 d. For group B, Kel = 0.243 h^{-1} and $T_{1/2\beta} = 2.84$ d were obtained, and the time the quantity of lowest residues needed to reach the maximum residue limit (MRL) was 29 d. The implemented method was validated; lindane concentrations in milk may be higher than the MRL value and seem to show accumulative kinetics of the zero order and dependent on the dose, which may negatively impact public health, especially because the detected concentrations were higher than the maximum permissible ones by OMS.

* Autor responsable ♦ Author for correspondence.

Recibido: Noviembre, 2008. Aprobado: Marzo, 2010.

Publicado como ARTÍCULO en *Agrociencia* 44: 461-469. 2010.

y parece mostrar una cinética de orden cero acumulativa y dependiente de la dosis, lo que puede impactar negativamente en la salud pública, sobre todo porque las concentraciones detectadas fueron superiores al máximo permitido por la OMS.

Palabras clave: cinética, cromatografía de gases, leche, lindano, vacas.

INTRODUCCIÓN

El lindano (γ HCH) es un plaguicida organoclorado lipofílico relacionado con problemas inmunológicos en el hombre (Vandana *et al.*, 2005) de toxicidad diversa (Alavanja *et al.*, 2003), asociado con cáncer de mama (Perocco *et al.*, 1995) y puede producir carcinogenicidad y genotoxicidad (Miller y Sharpe, 1998). Se le clasifica como clase 2B (posible carcinogénico) (Goldsmith, 2000). Está prohibido en Costa Rica, Colombia, Dinamarca, Finlandia, Gambia, Honduras, Hungría, Indonesia, Kuwait, Nueva Zelanda, Holanda, Santa Lucía, Eslovenia, Sudáfrica, Corea del sur, Suecia y Turquía. En Canadá y EE.UU. su uso está restringido desde 1994 y en México desde 2004. Sin embargo, en México y otros países en desarrollo se usa para la conservación de semillas en agricultura, como ectoparasiticida en ganadería y en lociones o jabones para tratamiento de sarnas y piojos en humanos; este último uso también se acepta en Canadá, EE.UU. y algunos países de Latinoamérica. En zonas tropicales se ha llegado a utilizar como ixodicida (Baker, 1979).

Por su liposolubilidad persiste en el medio y en productos agrícolas. Se le puede encontrar como residuo en leche, queso, crema, carne y huevo, en pescado y productos alimenticios. Aunque hay otros metabolitos, el lindano mismo es el principal (Burke *et al.*, 2005). Se ha detectado tanto γ HCH como otros isómeros en muestras diversas e incluso en el aire, en aguas superficiales y profundas, en sedimento, suelo y mantos acuíferos, por lo que se genera contaminación potencial para humanos y animales acuáticos y terrestres (Concha *et al.*, 2006). Si además de la contaminación ambiental hay lindano en la cadena alimenticia vía leche, su acumulación puede tener repercusiones importantes para la salud humana (Burke *et al.*, 2005).

Moore *et al.* (1952) analizaron residuos del lindano en productos de origen animal después de su aplicación

Key words: kinetics, gas chromatography, milk, lindane, cows.

INTRODUCTION

Lindane (γ HCH) is a lipophilic organochlorine pesticide related to immunological problems of diverse toxicity in man (Vandana *et al.*, 2005; Alavanja *et al.*, 2003), associated to breast cancer (Perocco *et al.*, 1995) being able to produce carcinogenicity and genotoxicity (Miller and Sharpe, 1998). It is classified as 2B class (possibly carcinogenic) (Goldsmith, 2000) and is forbidden in Costa Rica, Colombia, Denmark, Finland, Gambia, Honduras, Hungary, Indonesia, Kuwait, New Zealand, Holland, Saint Lucia, Slovenia, South Africa, South Korea, Sweden, and Turkey. In Canada and the United States its use has been restricted since 1994 and in México since 2004. Nevertheless, in Mexico and other developing countries, it is used for the conservation of seeds in agriculture as an ectoparasiticide in stockbreeding, and in lotions or soaps for the treatment of scabies and lice in human beings; the latter is also accepted in Canada, the United States and in some Latin American countries. In tropical regions it has been being used as ixodicide (Baker, 1979).

Because of its liposolubility it persists in the environment and in agricultural products. It may be found as residue in milk, cheese, cream, meat, and egg, in fish, and food products. Though there are other metabolites, lindane itself is the principal one (Burke *et al.*, 2005). The γ HCH as well as other isomers have been detected in various samples and even in the air, in surface and deep waters, in sediment, soil, and aquifers, for which it generates potential contamination human beings, and aquatic as well as land animals (Concha *et al.*, 2006). If lindane, besides causing environmental contamination, is present in the food chain through milk, its accumulation may have important repercussions for human health (Burke *et al.*, 2005).

Moore *et al.* (1952) analyzed lindane residues in products of animal origin after its oral application. Nevertheless, in the revision carried out, no studies on lindane elimination kinetics in milk of cows exposed to dermal application, were found, which is the mostly used. This has motivated its topical use and the belief that it does not achieve to become absorbed in sufficient quantities to get in milk.

oral. Sin embargo, en la revisión realizada no se encontraron estudios de la cinética de eliminación de lindano en leche de vacas expuestas a aplicación dérmica, que es la más usada. Esto ha motivado su uso tópico y la creencia de que no logra absorberse en cantidades suficientes como para llegar a la leche. Por tanto, el principal objetivo de este trabajo, el cual fue cuantificar la presencia de lindano en leche para el consumo humano y definir su cinética de eliminación en leche de vacas, cuando se aplica como aspersión tópica para control de ectoparásitos, en dos dosis, una recomendada por los fabricantes y otra por Bluethgen *et al.* (1977).

MATERIALES Y MÉTODOS

Los materiales estándares y reactivos fueron: lindano técnico al 99 % (Sigma-Aldrich Co. USA⁴), H₂SO₄ 96 % (Merck KGaA, Darmstadt, Germany), Na₂SO₄ (Merck KGaA, Darmstadt, Germany), y hexano (ACS, Baker. Mallinckrodt Baker S.A. de C.V. México). El material de laboratorio se lavó con agua caliente, se enjuagó con agua bidestilada y se secó a 100 °C en estufa; después se enjuagó con hexano y se volvió a secar con aire caliente.

El diseño experimental fue completamente aleatorizado con ocho repeticiones. Se usaron 24 vacas Holstein-Friesian en lactación con un peso medio 525 ± 12.5 kg y con producción de 19 a 23 L d⁻¹, de una granja familiar de 58 vacas en el municipio de Santa Rosa, estado de Querétaro, México; en producción y sin uso de lindano en los últimos 10 años. Se recolectaron muestras de leche antes del tratamiento con lindano, para conocer los posibles valores basales de lindano. Sólo se incluyeron vacas en producción cuyo nivel de lindano en la leche fuese inferior al límite de detección de la técnica analítica usada (0.008 mg L⁻¹ leche). Se formaron tres grupos con ocho vacas cada uno, elegidas aleatoriamente. Los tratamientos fueron: 1) Grupo A, se aplicó por aspersión una dosis de 75 µg kg⁻¹ peso por vaca, representativo de una dosis terapéutica del ectoparasiticida comercial (Lindano Agromundo S.A. de C.V.) diluido a 1 L 1000 L⁻¹ de agua y aplicando 250 mL por vaca; 2) Grupo B, se aplicó cuatro veces la dosis anterior por aspersión (300 µg kg⁻¹), representativa de una dosis alta del ectoparasiticida (10 L 1000 L⁻¹ de agua), en 250 mL vaca⁻¹; en el campo se pueden usar estas dosis por mal manejo de los encargados; 3) Grupo C testigo no tratado y monitor de otras fuentes potenciales u horizontales de acumulación de lindano en la granja. Toda la leche fue eliminada como no apta para consumo humano hasta lograr concentraciones menores que el nivel de detección ya señalado.

Therefore, the main objective of this study, was to quantify the presence of lindane in milk for human consumption and to define lindane elimination kinetics in cow's milk, when it is applied topically by spraying in order to control ectoparasites, using two doses, one, recommended by the manufacturers and another by Bluethgen *et al.* (1977).

MATERIALS AND METHODS

The standard and reactive materials were: technical lindane at 99 % (Sigma-Aldrich Co. USA⁴), H₂SO₄ with hot water 96 % (Merck KGaA, Darmstadt, Germany), Na₂SO₄ (Merck KGaA, Darmstadt, Germany), and hexane (ACS, Baker. Mallinckrodt Baker S.A. de C.V., México). The laboratory material was washed with hot water, rinsed with bidistilled water, and dried in a stove at 100 °C; afterwards it was rinsed with hexane and dried again with hot air.

The experimental design was completely randomized with eight repetitions. Twenty-four lactating Holstein-Friesian cows were used with a mean weight of 525 ± 12.5 kg and a production of 19-23 L d⁻¹, from a family farm of 58 cows, in the municipality of Santa Rosa, state of Querétaro, México; no lindane was used in these dairy cows during the last 10 years. Milk samples were taken before treatment with lindane in order to detect the possible lindane basal rate. Only dairy cows were included whose lindane level in milk was inferior to the detection limit of the analytical technique employed (0.008 mg L⁻¹ milk). Three groups were formed, each with eight cows, chosen at random. The treatments were: 1) Group A, a dose of 75 µg kg⁻¹ per cow was applied by spraying, which is dose representative for a therapeutic dose of the commercial ectoparasiticide (Lindano Agromundo S.A. de C.V.) 1 L 1000 L⁻¹, diluted in water, applying 250 mL per cow; 2) Group B, four times the aforementioned dose was applied by spraying (300 µg kg⁻¹), representative for a high dose of the ectoparasiticide (10 L 1000 L⁻¹ water) in 250 mL cow⁻¹; under field conditions these doses may be used due to foremen's bad management; 3) Group C, untreated control and monitor of other potential and horizontal sources of lindane accumulation on the farm. All the milk was eliminated as not fit for human consumption, until achieving concentrations lower than those of the detection level indicated above.

After lindane application the cows were milked daily during 14 d. At the morning milking, 75 mL of each quarter were recovered in sterile glass jars, after eliminating the same quantity at skimming. The samples of the four quarters, blended in one single volume of 250mL, were kept frozen at -20 °C until their analysis.

⁴ Sigma-Aldrich Co. Disponible en: http://www.sigmaaldrich.com/Area_of_Interest/The_Americas/Mexico.html

Después de aplicar el lindano se ordeñaron las vacas diariamente por 14 d. Se recuperaron 75 mL de cada cuarto en frascos de vidrio estériles después de eliminar una misma cantidad como despunte, en la ordeña de la mañana. Las muestras de los cuatro cuartos, mezcladas en un solo volumen de 250 mL, se mantuvieron congeladas a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su análisis.

Se implementó y validó el método analítico para lindano por cromatografía de gases descrito por Armendáriz *et al.* (2004). Para la extracción se desecó por ebullición y se secaron las muestras a $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 3 d en una estufa *turbo-dryer vap* II Zymark Model ZW 8006. El polvo obtenido se transfirió a una columna de vidrio empacada con fluorisil para eluir el lindano con 50 mL de hexano dos veces; se concentró el eluato a 1 mL evaporándolo a $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ con corriente de N, se restituyó el volumen a 10 mL con los líquidos de los lavados y alícuotas de hexano y se agitó hasta homogenizar. Se restituyó nuevamente a 10 mL y se tomaron 2 mL para determinar el porcentaje de grasa. Para purificar el extracto se agregó 3 mL de ácido sulfúrico concentrado a 8 mL de muestra y se agitó en Vortex-Genie (Daigger & Company, Inc. Lakeview Parkway, Vernon Hills, U.S.A.) enérgicamente por 1 min. Se dejó reposar 24 h para permitir la separación de las capas orgánica y acuosa y se transfirió 5 mL de la capa orgánica a un matraz con 1 g de cama de Na_2SO_4 . El residuo se lavó con dos alícuotas de 5 mL de hexano, se evaporó a $\leq 50\text{ }^{\circ}\text{C}$ con corriente de N; se recolectó el residuo con 1 mL de hexano y se inyectó 1 μL al cromatógrafo de gases.

Se usó un cromatógrafo de gases Perkin Elmer XL con detector de captura de electrones a una temperatura de inyección de $280\text{ }^{\circ}\text{C}$. El gas acarreador fue N a 20 *psi* y con un rango de flujo de 1 mL min^{-1} . La temperatura inicial del horno fue $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 3 min, con un gradiente de $30\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$ hasta $180\text{ }^{\circ}\text{C}$, estabilizando por 1 min y aumentando $4\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$ hasta $220\text{ }^{\circ}\text{C}$ en aproximadamente 10 min. Luego se elevó la temperatura a razón de $6\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$ hasta $250\text{ }^{\circ}\text{C}$ en 5 min, con la temperatura del detector de captura de electrones a $300\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Para validar dicho método se usaron muestras de leche comercial fortificada y se logró una recuperación de 89.6 a 92.3 % (90.37 ± 1.52 DE), con una variación intraensayo menor a 4 % y un $R^2 = 0.986$. El límite de detección fue 0.001 mg L^{-1} y el límite de cuantificación fue 0.008 mg L^{-1} .

Los valores obtenidos se integraron, para conocer parte de la cinética de eliminación, a la fórmula del logaritmo neperiano:

$$C_r = C_i e^{-\lambda t}$$

donde, C_r =concentración residual; C_i =concentración inicial; e = logaritmo neperiano base 2; λ = coeficiente de eliminación del lindano en la leche; t = tiempo(h).

The analytical method for lindane by gas chromatography described by Armendáriz *et al.* (2004) was implemented and validated. For extraction it was boiled to dry and the samples were dried at $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 3 d in a turbo-dryer vap oven, II Zymark Model ZW 8006. The powder obtained was transferred to a glass column wrapped with *fluorisil* in order to elute lindane two times with 50 mL of hexane; the eluate was concentrated to 1 mL by evaporation at $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ with Nitrogen flow, the volume was restored to 10 mL with the washing liquids and hexane and shaken until homogenizing. Again it was reinstated to 10 mL, and 2 mL were taken for determining fat percentage. In order to purify the extract 3 mL of sulfuric acid were added, concentrated to 8 mL of sample and shaken vigorously for 1 min in a Vortex-Genie (Daigger & Company, Inc. Lakeview Parkway, Vernon Hills, U.S.A.). It was left to stand for 24 h allowing the separation of organic and watery layers, and 5 mL of the organic layer was transferred to a flask with a bed of 1 g of Na_2SO_4 . The residue was washed with two proportions of 5 mL hexane and evaporated to $\leq 50\text{ }^{\circ}\text{C}$ with N current. The residue was gathered with 1 mL hexane, and 1 μL was injected to a gas chromatographer.

A Perkin Elmer XL chromatographer with electron capture detector was used at injection temperature of $280\text{ }^{\circ}\text{C}$. The carrying gas was N at 20 *psi* and with a flow rate of 1 mL min^{-1} . The initial oven temperature was $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 3 min, with a gradient of $30\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$ up to $180\text{ }^{\circ}\text{C}$, stabilizing by 1 min and increasing $4\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$ up to $220\text{ }^{\circ}\text{C}$ in approximately 10 min. Afterwards, the temperature rose at a rate of $6\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$ up to $250\text{ }^{\circ}\text{C}$ in 5 min, with a temperature of the electron capture detector at $300\text{ }^{\circ}\text{C}$.

In order to validate this method, samples of fortified commercial milk were used, and a recovery of 89.6-92.3 % (90.37 ± 1.52 DE) was achieved with an intra-assay variation, lower than 4 % and $R^2 = 0.986$. The detection limit was 0.001 mg L^{-1} and the quantification limit was 0.008 mg L^{-1} .

In order to recognize part of the elimination kinetics, the obtained values were integrated to the naperian logarithm formula:

$$C_r = C_i e^{-\lambda t}$$

where, C_r =residual concentration; C_i =initial concentration; e =base 2 naperian logarithm; λ =lindane elimination coefficient in milk; t = time (h).

The initial concentration (C_i) is considered the first point of comparison with the second point (C_r) of the area below the curve of the compound in its phase of elimination of the organism. The area below the curve of concentration-time of 1 to 9 d was calculated using the trapezoid linear method by means of the PK Analyst program (Micromath Scientific Software;

La concentración inicial (C_i) se considera el primer punto de comparación con el segundo punto (C_r) del área bajo la curva del compuesto en su fase de eliminación del organismo. El área bajo la curva de concentración-tiempo de 1 a 9 d se calculó usando el método trapezoidal lineal mediante el programa PKAnalyst (Micromath Scientific Software; Salt Lake City, Utah, USA, 1985.) y la mejor correlación se obtuvo con el modelo 13.

Análisis estadístico

El diseño estadístico fue completamente al azar de un solo factor con tres niveles y ocho repeticiones (unidad experimental: una vaca). Los valores obtenidos se analizaron con modelo polinomial de medidas repetidas con el programa *IBM SPSS Statistics*, versión 16 (SPSS Ibérica, IBM Company, Madrid, España) (Camacho, 2002). Se hizo el análisis polinomial de mediciones repetidas, el factor intra-sujeto fue la concentración (3 niveles) y el factor inter-sujetos fue el día de muestreo (14 niveles) y con la prueba de esfericidad de Mauchy se probaron los efectos intra-sujetos para concentración y día de muestreo lineal y cuadrático. Se usó la prueba de Games-Howell para diferencia entre medias con varianzas desiguales.

Se estableció el tiempo de retiro para esta vía y a las dosis señaladas cuando las concentraciones de lindano en leche fueron menores al valor aceptado de 0.01 mg L^{-1} (FAO-WHO, 2010) o por extrapolación de residuos máximos.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La metodología utilizada permitió tasas de recuperación superiores al 90 % y un límite de cuantificación inferior al valor de MRL aceptado por la FAO-WHO (2010), de 0.010 mg L^{-1} de lindano en leche entera. Los resultados y sus comparaciones estadísticas se presentan en el Cuadro 1 y en la Figura 1 las relaciones de concentración en leche de lindano vs. tiempo. Mediante la prueba estadística de mediciones repetidas se corroboró una aparente linealidad en el aumento en la concentración máxima al día 1 entre los dos grupos. Tanto el efecto lineal como el cuadrático resultaron significativos ($p=0.000$) en las pruebas dentro de sujetos para el efecto de concentración del lindano y su interacción con el día de muestreo. En el análisis inter-sujetos el día resultó significativo ($p=0.000$) La prueba de esfericidad resultó significativa ($p=0.000$) por lo que se ajustaron los grados de libertad con epsilon de Greenhouse-Geisser y se usó la prueba de Games-Howell para diferencia entre medias con varianzas desiguales.

Salt Lake City, Utah, USA, 1985), and the best correlation was obtained with model 13.

Statistical Analysis

The statistical design was completely randomized with one single factor with three levels and eight replicates (experimental unit: one cow). The values obtained were analyzed using polynomial model of repeated measurements with the IBM SPSS Statistics program, version 16 (SPSS Ibérica, IBM Company, Madrid, España) (Camacho, 2002). The polynomial analysis of repeated measurements was made, the intra-subject factor was concentration (3 levels), and the inter-subjects factor was the sampling day (14 levels), and with Mauchy's sphericity test the effects intra-subjects were tested for concentration and linear sampling day, as well as quadratic. The Games-Howell test was used to differentiate among means with unequal variances.

The time of withdrawal was established for this administration and at the doses indicated when lindane concentrations in milk were lower than the accepted value of 0.01 mg L^{-1} (FAO-WHO, 2010) or by extrapolation of the highest residues.

RESULTS AND DISCUSSION

The utilized methodology allowed recuperation rates higher than 90 % and a quantification limit lower than the MRL value accepted by FAO-WHO (2010) of 0.010 mg L^{-1} of lindane in whole milk. The results and their statistical comparisons are presented in Table 1, and the relations of lindane concentration vs. time in milk in Figure 1. By means of the repeated statistical measurement test an apparent linearity was corroborated in the increase in maximum concentration on day 1 between the two groups. The linear as well as the square effect turned out to be significant ($p=0.000$) in the tests within subjects for the lindane concentration effect and its interaction with the day of sampling. In the inter-subject analysis the day turned out significant ($p=0.000$). The sphericity test turned out to be significant ($p=0.000$); therefore the freedom degrees were fitted to Greenhouse-Geisser-epsilon and the Games-Howell test was used for the difference among means with unequal variances.

The lindane concentration is reduced with a relatively slow pattern since in Group A day 1, 0.025 mg L^{-1} of lindane were observed, superior to the maximum limits of residues (MRL) recommended by the FAO-WHO (2010), being 0.010 mg L^{-1} in whole

Cuadro 1. Concentraciones de lindano (mg L⁻¹) en leche de vacas tratadas vía dérmica y principales variables de su depuración en leche (n=8).

Table 1. Lindane concentrations (mg L⁻¹) in the milk of cows topically treated at two doses, and main variables regarding clearance in milk (n=8)

Dosis de lindano (µg kg ⁻¹)		Día		β			
		1	14	(ng h ⁻¹)	Kel (h ⁻¹)	T½β (d)	Tiempo de retiro (d)
75	X	25.06a	0.003a	0.02	0.382	1.81	13
	± DE	4.5	0.007	0.001	0.01	0.35	
300	X	218.0b	10.52b	0.01	0.243	2.84	29
	± DE	2.3	3.1	0.001	0.02	0.28	
0	N.D.		N.D.	-	-	-	

X: media; DE: desviación estándar; β: constante de eliminación (tangente del ángulo); Kel: constante de eliminación; T½β: vida media de depuración de leche ♦ X: means SD: standard deviation; β: elimination constant (angle tangent); Kel: elimination constant; T1/2β: mean half-life of the milk clearance.

a,b Letras diferentes en una columna denotan diferencias significativas (Lineal SC III F_{1,14} = 68.1; p=0.00) entre tratamientos por día (método polinomial de mediciones repetidas, SPSS versión 16) ♦ a,b Different letters in a column denote significant differences (Linear SC III F_{1,14} = 68.1; p = 0.00) among treatments per day (polynomial method of repeated measurements, SPSS version 16).

La concentración de lindano se reduce con un patrón relativamente lento ya que en el grupo A día 1 se observaron 0.025 mg L⁻¹ de lindano, superior a los límites máximos de residuos (MRL) recomendados por la FAO-WHO (2010) que son 0.010 mg L⁻¹ en leche entera con 0.12 mg kg⁻¹ base de contenidos de grasa; en el día 14 fue 0.003 mg L⁻¹. En el grupo B la concentración inicial promedio fue 0.218 mg L⁻¹ y al día 14 bajó a 0.015 mg L⁻¹ (Figura 1). No se detectaron concentraciones de lindano en el grupo C.

El análisis de los resultados sugiere que la mayor parte del lindano se detectó en la grasa de la leche, lo cual resulta predecible dado su elevado coeficiente de liposolubilidad. Es factible suponer que estas concentraciones se elevan en queso y disminuyen en leche procesada baja en grasa. En el presente estudio no se determinaron las concentraciones de isómeros α y βHCH dado que se eliminan en menores cantidades que el propio lindano y por ende muy por abajo de los MRL. Es decir, es seguro usar al γHCH como metabolito indicador de residualidad.

Se destaca la velocidad de paso del sitio de aplicación en la piel a su detección en la grasa de leche en 24 h. Las cantidades de lindano encontradas en la leche parecen ser directamente proporcionales a la dosis dérmica aplicada (Figura 1). El grupo tratado con 75 µg kg⁻¹ requirió 7 d para que la concentración fuera menor a 0.010 mg L⁻¹, mientras que el grupo B tratado con 300 µg kg⁻¹ no alcanzó dicho nivel durante el estudio, y por extrapolación sucede

milk with 0.12 mg kg⁻¹ base of fat contents; on day 14, it was 0.003 mg L⁻¹. In Group B, initial mean concentration was 0.218 mg L⁻¹, and on day 14 it decreased to 0.015 mg L⁻¹ (Figure 1). In Group C, not any lindane concentrations were detected.

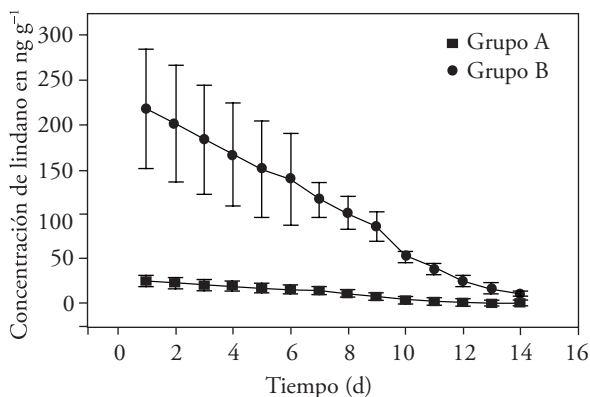


Figura 1. Concentración vs. tiempo de lindano, en leche entera de vacas tratadas con 75 µg kg⁻¹ (grupo A) y con 300 µg kg⁻¹ (grupo B) por vía dérmica (no se detectaron concentraciones de lindano en el grupo C). Las líneas verticales representan error estándar de la media marginal (corregida por el modelo de mediciones repetidas, IBM SPSS Statistics versión 16).

Figure 1. Lindane concentration vs. time, in whole milk of cows treated topically with 75 µg kg⁻¹ (Group A) and with 300 µg kg⁻¹ (Group B). In Group C lindane concentrations were not detected. The vertical lines represent standard error of the marginal mean (corrected by repeated measurements model IBM SPSS Statistics version 16).

aproximadamente el día 23 (Cuadro 1). La diferencia en los ángulos de eliminación para las dos dosis (β 0.02 mg L⁻¹ h⁻¹ para el grupo A y $\beta=0.004$ mg L⁻¹ h⁻¹ para el grupo B) se redujo significativamente ($p \leq 0.05$); consecuentemente la $T_{1/2\beta}$ también fue estadísticamente distinta (grupo A = 1.81 d; grupo B = 2.84 d) ($p \leq 0.05$). En contraste, Moore *et al.* (1952) mencionan una $T_{1/2\beta}$ en leche de 10 d y aunque estos autores no lo indican, usar esta vida media como valor predictivo resultaría en un periodo de retiro de ordeña cercano a tres meses. La diferencia en resultados entre el presente ensayo con el de Moore *et al.* (1952) es notable y se debería, al menos en parte, a que dichos autores administraron lindano vía oral y no por aspersión, usaron dosis de 70 $\mu\text{g kg}^{-1}$ a 6.22 mg $\text{kg}^{-1} \text{d}^{-1}$ y durante 70 a 110 d.

Las diferencias obtenidas en el valor de β (ángulo de eliminación) en este estudio indican una reducción inversamente proporcional y en aparente linealidad con la dosis de 75 $\mu\text{g kg}^{-1}$ (0.02 ng h⁻¹) y la mitad de dicho valor para la de 300 $\mu\text{g kg}^{-1}$ (Cuadro 1). Con ello aumenta su tiempo de eliminación como lo indica el incremento en la $T_{1/2\beta}$. Tomados estos datos en conjunto es factible postular que el lindano tiene una cinética de orden cero. Por tal razón y congruente con la tendencia acumulativa de este tipo de cinética, la persistencia de residuos será más prolongada al aumentar la dosis y cuando se persiste en la redosificación.

En otro estudio (Bluetghen *et al.*, 1977) se administró lindano en polvo vía oral, a dosis de 40 a 50 mg vaca⁻¹ (aproximadamente 80-100 $\mu\text{g kg}^{-1}$) y se obtuvieron concentraciones del fármaco superiores al MRL durante cinco semanas y de sus isómeros β y βHCH por nueve semanas. La comparación de estos resultados con los del presente estudio revela un patrón similar de eliminación de cinética de orden cero, pero en una escala de sobredosificación en el estudio de Bluetghen *et al.* (1977). En un estudio epidemiológico en carne, pescado y leche (Fontcuberta *et al.*, 2008) se encontraron concentraciones inferiores a los MRL y sólo en una muestra de lácteos resultó positiva, lo cual refleja las regulaciones actuales en España. Asimismo, en Ghana no se detectaron niveles de lindano en ninguna de las muestras analizadas con productos derivados de leche (Darko y Acquah, 2008).

El análisis de los resultados del presente estudio sugiere que aun con las dosis bajas de lindano aplicado tópicamente por aspersión, es económicamente

The analysis of the results suggests that the greatest part of lindane was found in milk fat, which turns out to be predictable, given its high liposolubility coefficient. It is feasible to suppose that these concentrations increase in cheese and decrease in processed low-fat milk. In the present study, isomer concentrations α and βHCH were not determined, since they are eliminated in lower quantities than lindane itself and hence much below the MRL. In other words, it is reliable to use γHCH as metabolite indicator of residues.

The speed rate of the step from the application site on the skin to its detection in milk fat in 24 h is outstanding. Lindane amounts found in milk seem to be directly proportional to the topical dose applied (Figure 1). The group treated with 75 $\mu\text{g kg}^{-1}$ required 7 d for the concentration to become lower than 0.010 mg L⁻¹, whereas Group B, treated with 300 $\mu\text{g kg}^{-1}$ did not reach that level during the study, and by extrapolation, it approximately occurs on day 23 (Table 1). The difference in the elimination angles for the two doses ($\beta=0.02$ mg L⁻¹h⁻¹ for Group A and $\beta=0.004$ mg L⁻¹h⁻¹ for Group B) was significantly reduced ($p \leq 0.05$); consequently $T_{1/2\beta}$ was also statistically different (Group A = 1.81 d; Group B = 2.48 d) ($p \leq 0.05$). Unlike this, Moore *et al.* (1952) mention $T_{1/2\beta}$ in 10 day's milk, and though these authors do not indicate it, using this half life as predictive value would result in a milking withdrawal period of approximately three months. The difference in results between the present trial and the one by Moore *et al.* (1952) is remarkable and would be at least partly due to the fact that those authors administered lindane orally and not by spraying, using doses of 70 $\mu\text{g kg}^{-1}$ at 6.22 mg $\text{kg}^{-1} \text{d}^{-1}$ and during 70-110 d.

The differences obtained in β value (elimination angle) in this study indicate a reversely proportional reduction and in apparent linearity with the dose of 75 $\mu\text{g kg}^{-1}$ (0.02 ng h⁻¹) and half of that value for the one of 300 $\mu\text{g kg}^{-1}$ (Table 1). With this its elimination time increases, as the increment in $T_{1/2\beta}$ indicates. These data taken together, it is feasible to hypothesize that lindane will have kinetics of the order of zero. Therefore, and consistent with the accumulative tendency of this type of kinetics, the persistence of residues will be prolonged at increasing the dose and when persisting in repeating the dosage.

inviabile justificar los tiempos de retiro encontrados y, por tanto, no se recomienda su uso para el control de ectoparásitos en vacas productoras de leche. Además, dada su capacidad de penetración a través de la piel (Kasareli, 2002), deberá tenerse cuidado extremo y evitar su uso en paredes y cercas porque puede generar una bioacumulación del principio activo en los usuarios y consumidores finales.

Finalmente, la ausencia de lindano en las muestras de leche del grupo testigo (no tratados) indica que, si no hay ningún otro ingreso de lindano a las vacas a través de productos agrícolas o de otra índole, la transmisión de residuos en forma horizontal es poco probable con los esquemas de dosificación usados en el presente ensayo. De cualquier manera es poco lógico pensar en tratamientos selectivos con lindano para el control de ectoparásitos.

CONCLUSIONES

Las cantidades de lindano encontradas en las muestras de leche de vacas son directamente proporcionales a las dosis administradas por aspersión. El grupo tratado con $75 \mu\text{g kg}^{-1}$ requirió 7 d para mostrar una concentración menor a 0.010 mg L^{-1} , mientras que en el grupo tratado con $300 \mu\text{g kg}^{-1}$, requirió 23 d. Se concluye que el lindano tiene una cinética de eliminación en leche de orden cero dependiente de la dosis y acumulativa, como lo indica la reducción en el valor del ángulo de eliminación β en la dosis mayor. De cualquier manera, resulta económicamente inviable el justificar los tiempos de retiro aquí señalados como para usar lindano en vacas productoras de leche.

LITERATURA CITADA

- Alavanja M., C., M. Semanic, J. Dpsemeci, M. Luvín, C. Tarone, C. Lynch, K. Knott, J. Thomas, J. Hoppin, J. Barker, D. Coble, A. Sndler. and A. Blair. 2003. Use of pesticides and prostate cancer risk in the agricultural health study cohort. *Am. J. Epidemiol.* 57: 800-814.
- Armendáriz, C., J. Pérez de Ciriza, and R. Farráo. 2004. Gas chromatographic determination of organochlorine pesticides in cow milk. *Int. J. Food. Sci. Nutr.* 55:215-21.
- Baker, J. A., J. Jordaan, and D. W. Robertson. 1979. Ixodidical resistance in *Boophilus microplus* (Canestrini) in the Republic of South Africa and Transkei. *J. S. Afr. Vet. Assoc.* 50:296-301.
- Bluethgen, A., W. Heesschen, A. Tolle, and J. Hammann. 1977. Experimental studies on the carryover of BHC isomers in milk after a topical application to lactating cows. *Milchwisenschaft* 32: 127-131.

In another study (Bluethgen *et al.*, 1977) lindane was administered orally in powder, in doses of $40\text{-}50 \text{ mg cow}^{-1}$ ($80\text{-}100 \mu\text{g kg}^{-1}$) and concentrations of the drug, higher than MRL, were obtained during five weeks and of its β isomers and βHCH for nine weeks. The comparison of these results with those of the present study reveals a similar pattern of elimination kinetics of the order of zero, but on a scale of overdose in the study by Bluethgen *et al.* (1977). In an epidemiological study on meat, fish, and milk (Fontcuberta *et al.*, 2008), concentrations lower than MRL were found, and only in one sample of dairy products they turned out to be positive, which reflects the current regulations in Spain. Likewise, in Ghana lindane levels were not detected in any of the analyzed samples of dairy products (Darko and Acquah, 2008).

The analysis of results of the present study suggests that even with low lindane doses, topically applied by spraying, it is economically not viable to justify the existing times of withdrawal, and therefore their use for the control of ectoparasites in milk producing cows is not recommended. Furthermore, given its capacity of penetration through the skin (Kasareli, 2002), extreme care should be taken and its use on walls and fences must be avoided because it may generate bioaccumulation from the active principles in final users and consumers.

Finally, the absence of lindane in milk samples of the control group (untreated) indicates that, if there is no other entry of lindane to cows through agricultural products or such of any other kind, the horizontal residue transmission is not highly probable with the dosage schemes used in the present assay. Anyway, it is not very logic to think of selective treatments with lindane for ectoparasite control.

CONCLUSIONS

Lindane amounts detected in samples of cows' milk are directly proportional to the doses supplied by spraying. The group treated with $75 \mu\text{g kg}^{-1}$ required 7 d for showing a concentration lower than 0.010 mg L^{-1} , whereas the group treated with $300 \mu\text{g kg}^{-1}$ required 23 d. It is concluded that lindane has elimination kinetics in milk to the order of zero, depending on the dose and accumulative, as the reduction of the value of the elimination angle β at the highest dose indicates. Nevertheless, it is economically not viable to justify the withdrawal

- Burke, E., A. Holden, and I. Shaw. 2005. A method to determine residue levels of persistent organochlorine pesticides in human milk from Indonesian women. *Chemosphere* 50: 529-535.
- Camacho R, J. 2001. Estadística con SPSS para Windows. Rama, Madrid, España. pp: 195-229.
- Concha, G. E., C. Turnes, L. Muniategui, M. López, R. Prada, and F. Fernández. 2006. Evaluation of HCH isomers and metabolites in soils, leachates, river water and sediments of a highly contaminated area. *Chemosphere* 64:588-95.
- Darko, G., and S. Acquah. 2008. Levels of organochlorine pesticides residues in dairy products in Kumasi, Ghana. *Chemosphere* 71:294-298.
- FAO-WHO. (2010). Codex alimentarius. Official Standards On Line <http://www.codexalimentarius.net>
- Fontcuberta, M., J. F. Arqués, V. M. Martínez, F. C. Sarrahima, M. Pineda and J. D. Casas. 2008. Chlorinated organic pesticides in marketed food: Barcelona, 2001-06. *Sci. Total Environ.* 339:52-57
- Goldsmith, D. F. 2000. Linking environmental cancer with occupational epidemiology research: the role of the International Agency for Research on Cancer (IARC). *J. Environ. Pathol. Toxicol. Oncol.* 19:171-5.
- times for using lindane in dairy cows, indicated above.
- End of the English version—
- *—
- Kasarali, H., A. Hourdakis, H. Anagnostopoulos, and H. Doulia. 2002. Pesticide residue in thermal mineral water in Greece. *J. Environ. Sci. Health.* 37:465-472.
- Miller, W. R., and R. M. Sharpe. 1998. Environmental estrogens and human reproductive cancers. *Endocr. Relat. Cancer* 5:69-96.
- Moore, E., L. Mann, and R. Carter. 1952. The effect of various dosage levels of crystalline lindane on the concentration of lindane in cow's milk. *J. Dairy Sci.* 35: 733-737.
- Perocco, P., A. Collacci, E. Pnina and M. Ron. 1995. Cytotoxic and cell transforming effects of the insecticide lindane (gamma hexachlorocyclohexano) on BALB/c3T3 cells. *Res. Commun. Mol. Pathol. Pharmacol.* 89:329-339.
- Vandana, S., S. Rafat, G. Sanvidhan, T. Sayed, B. Abhijit, and D. Basu. 2005. Lindane induced immunological alterations in human poisoning cases. *Clin. Biochem.* 38:678-680.