



REDVET. Revista Electrónica de Veterinaria

E-ISSN: 1695-7504

redvet@veterinaria.org

Veterinaria Organización

España

Morales Vallecilla, Carlos; Rodríguez Osorio, Nélida; Restrepo Betancur, Luis Fernando; López Córdoba, Carlos

Relación entre residuos de clorpirifos en leche y sangre de vacas Holstein y niveles séricos de estradiol y tiroxina

REDVET. Revista Electrónica de Veterinaria, vol. 11, núm. 1, enero, 2010, pp. 1-22

Veterinaria Organización

Málaga, España

Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=63613103006>

- Cómo citar el artículo
- Número completo
- Más información del artículo
- Página de la revista en redalyc.org

redalyc.org

Sistema de Información Científica

Red de Revistas Científicas de América Latina, el Caribe, España y Portugal

Proyecto académico sin fines de lucro, desarrollado bajo la iniciativa de acceso abierto

Relación entre residuos de clorpirifos en leche y sangre de vacas Holstein y niveles séricos de estradiol y tiroxina - Chlorpyrifos residues in milk and blood in Holstein cows and their relation to estradiol and thyroxin serum levels

Morales Vallecilla, Carlos: Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad de Antioquia Colombia | **Rodríguez Osorio Nélide:** Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad de Antioquia Colombia | **Luis Fernando Restrepo Betancur:** Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad de Antioquia Colombia | **López Córdoba, Carlos:** Facultad de Ciencias Exactas y Naturales Universidad de Antioquia Colombia.

Contacto: nerodriguez@yahoo.com

Resumen

Los disruptores endocrinos son sustancias que interfieren con la síntesis, secreción, transporte, acción o eliminación hormonal. Algunos pesticidas son considerados disruptores endocrinos y su uso indiscriminado ha sido asociado con afecciones metabólicas y reproductivas. El insecticida organofosforado clorpirifos, ampliamente utilizado para el control de plagas de los pastos en zonas lecheras de Antioquia, Colombia, ha sido asociado con alteraciones en los niveles de hormonas tiroideas y estrógenos. La presente investigación usó la cromatografía de gases para detectar la presencia de residuos de clorpirifos en sangre y leche de vacas Holstein alimentadas con pasto tratado con clorpirifos, además se determinaron por radioinmunoanálisis, los valores sanguíneos de tiroxina y 17 β estradiol en los animales el día previo a la entrada en las pasturas tratadas y durante los siguientes 30 días. Aunque la cromatografía gaseosa fue efectiva para detectar clorpirifos en leche y suero durante la estandarización, en ninguna de las muestras de leche y suero sanguíneo de los animales del estudio se detectaron residuos de Clorpirifos. No se halló además diferencia significativa en las concentraciones de tiroxina y estradiol a lo largo del tratamiento. Los hallazgos indican que el tratar pastos con clorpirifos según las indicaciones del fabricante, no ocasionó residuos detectables del insecticida en la sangre y la leche de vacas que lo consumen. Los resultados además podrían indicar que en las concentraciones y condiciones recomendadas por el fabricante, el clorpirifos no es un disruptor endocrino para el ganado bovino en pastoreo.

Palabras clave: Clorpirifos | tiroxina | 17 β estradiol | disrupción endocrina | residuos de pesticidas | organofosforados | cromatografía gaseosa.

Abstract

Endocrine disruptors are compounds that affect synthesis, secretion, transport, action or elimination of hormones. Some pesticides are considered endocrine disruptors and their use has been associated with metabolic and reproductive disorders. The organophosphate insecticide chlorpyrifos, widely used to control grass insect pests in the dairy regions of Antioquia, Colombia, has been linked to thyroid hormone and estradiol alterations. This study used gas chromatography to detect chlorpyrifos residues in the milk and blood of Holstein cows, fed with chlorpyrifos treated grass. Additionally, it measured, by radioimmunoanalysis, the blood levels of thyroid hormone and estradiol in the cows the day before their entrance in the treated pastures and through-out the following 30 days. Although gas chromatography was effective in detecting chlorpyrifos in milk and serum during standardization, it did not detect any chlorpyrifos residues in the serum and milk samples from the studied animals. No significant difference was found in thyroid hormone and estradiol levels through-out the treatment. These findings indicate that treating grass with chlorpyrifos according to manufacturer's instructions does not generate detectable residues of the insecticide in the blood and milk of the cows feeding on the grass. The results could also indicate that under the manufacturer's recommendations, chlorpyrifos is not an endocrine disruptor for dairy cows.

Keywords: Chlorpyrifos | thyroid hormone | 17 β estradiol | endocrine disruption | pesticide residues | organophosphates | gas chromatography

Introducción

El término "disruptor endocrino" (DE) fue propuesto por primera vez en 1991, en una conferencia del World Wildlife Fund, por Soto AM, Sonnenschein C, 2002 para referirse a sustancias que interfieren con la síntesis, secreción, transporte, unión, acción o eliminación de las hormonas responsables del metabolismo, la reproducción, el desarrollo y el comportamiento (Lyons, 1999). Desde la segunda mitad del siglo XX, cuando se descubrió que el pesticida DDT (diclorodifeniltricloroetano) tenía actividad estrogénica (Kupfer, Bulger, 1980), la preocupación por este tema ha venido creciendo, al punto que hoy se han identificado cientos de compuestos químicos como DE's (Morales, Rodríguez, 2004), entre ellos un gran número de pesticidas usados en labores agropecuarias. Desde 1970, un amplio número de trabajos demuestra el impacto disruptor de los pesticidas en diferentes animales, inicialmente en especies acuáticas y silvestres. El número de estudios sobre la influencia de los DE's en animales de granja y particularmente en bovinos, es aún escaso en Colombia y en el mundo.

Actualmente, gracias a las directrices legislativas de muchos países, la utilización de pesticidas organoclorados ha desaparecido prácticamente, lugar que ha sido ocupado por otros compuestos químicos con menor capacidad de bioacumulación y por lo tanto menos persistentes, pero que requieren una mayor frecuencia de aplicación. En Colombia los plaguicidas más utilizados en la producción agropecuaria, son los organofosforados, los carbamatos y los piretroides (Boletín Técnico. MADR, 2002). Según la División de Insumos Agrícolas del Instituto Colombiano Agropecuario el grupo de los organofosforados es el más vendido entre todos los insecticidas de uso en Colombia, y dentro de estos, el Clorpirifos es el de mayor participación porcentual, con un volumen aproximado de 372 toneladas y 243.000 litros (Boletín Técnico. MADR, 2002). Un estudio realizado en Antioquia, Colombia, por el Instituto Colombiano Agropecuario, ICA, durante un período de tres años, estableció que el clorpirifos es el insecticida más usado en las zonas lecheras para el control de los insectos depredadores del pasto, especialmente *Collaria spp*, (Loaiza *et al*, 2000). Este mismo estudio encontró que la principal problemática en cuanto al uso de pesticidas en esta zona, es la mala utilización de estas sustancias, cuando los ganaderos no respetan las dosis recomendadas, los tiempos de retiro, ni el descanso de los potreros. Es frecuente la utilización de pesticidas en mezclas indiscriminadas, práctica que potencia la acción de estas sustancias como disruptores endocrinos, y sobre la cual aún no existen estudios disponibles (Loaiza *et al*, 2000).

El Clorpirifos se clasifica entre los productos de Clase II (moderadamente peligroso). Es un sólido cristalino de color ámbar a blanco, con muy baja solubilidad en agua (2 mg/L a 25°C), punto de fusión entre 41.5 y 43.5 °C y temperatura de descomposición superior a 160 °C. Su coeficiente de partición (Koctanol/agua) es de 4.6990, lo cual le confiere una mayor solubilidad en lípidos (BCPC, 2006; Base de Datos NIST, 2005). Su nombre según la nomenclatura IUPAC es 0,0-dietil 0- (3,5,6-tricloro-2- piridil fosforotioato) y su fórmula empírica es C₉H₁₁Cl₃NO₃PS. La Figura 1 es una representación de su fórmula estructural (BCPC, 2006; Base de Datos NIST, 2005).

El Clorpirifos es un inhibidor débil de la acetilcolinesterasa lo cual produce acumulación del neurotransmisor acetilcolina en las sinapsis mediadas por éste, tanto en los insectos como en los mamíferos (Córdoba, 2001). Es usado en forma de fosforotioato (P=S) el cual es convertido *in vivo* a un éster fosfato activo u oxón (P=O), que posee una fuerte acción sobre la colinesterasa (Córdoba, 2001). En el humano adulto esta transformación ocurre en el hígado, mediada especialmente por la enzima CYP3A4, la principal isoforma del citocromo P450 (CYP) (Dai *et al*, 2001).

La Dosis Letal 50 (LD50) oral del clorpirifos en ratas está entre 69 y 276 mg/kg (Gaines, 1995) y su toxicidad oral crónica tiene un nivel de efectos no observados (no-observed-effect level - NOEL) para la depresión de la actividad

de la colinesterasa en el cerebro de 1 mg/kg./día, en glóbulos rojos de fue de 0.03 mg/kg./día a 0.1 mg/kg./día y en plasma de 0.01 mg/kg./día a 0.05 mg/kg./día en ratas y en perros (Cochran *et al*, 1995). El Clorpirifos suministrado por vía oral no ha mostrado efectos oncogénicos en ratas ni en ratones y los estudios de mutagenicidad en bacterias y células ováricas de hámster han sido negativos (Cochran *et al*, 1995).

El Clorpirifos es rápidamente convertido a 3,5,6 tricloro 2-piridinol en humanos, ratas y cabras. Las concentraciones más altas en los tejidos son halladas en hígado y riñón, aunque el Clorpirifos no se acumula en los tejidos. Menos de 0.1 % de la dosis administrada a cabras fue encontrada en la leche (Cochran *et al*, 1995). La principal ruta de excreción en humanos, ratas y cabras es la orina (Nolan *et al*, 1984; Rigas, 2001). Los humanos excretan aproximadamente el 70% de una dosis oral de Clorpirifos por esta vía (Nolan *et al*, 1984) y las ratas un 90% (Smith *et al*, 1967). En humanos se ha encontrado una vida media de eliminación del Clorpirifos de 26.9 horas (Cochran *et al*, 1995).

La persistencia ambiental del clorpirifos varía dependiendo del tipo de suelo y de las condiciones medioambientales. La baja temperatura ambiental y los bajos valores del pH de los suelos retardan los procesos de transformación y degradación de este insecticida, favoreciendo su biodisponibilidad (Tinsley, 1998). La vida media, bajo metabolismo aeróbico en el suelo, está en el rango de 11 a 180 días, con un promedio de 28.9 días, (Smegal, 2000). El Clorpirifos adsorbido a los suelos está sujeto a degradación fotolítica ultravioleta y a hidrólisis química y biológica por microorganismos (Tinsley, 1998). Está bien establecido que la principal vía de degradación hidrolítica en suelos, incluye la formación de 3,5,6-tricloro-2-piridinol (TCP), proceso que puede ser acelerado bajo condiciones de alcalinidad (Racke *et al*, 1996). Subsecuentemente el TCP es degradado a compuestos organoclorados y a dióxido de carbono (Tinsley, 1998).

(Márquez, 2001), en el municipio de Bello, Colombia, halló una persistencia de Clorpirifos en el suelo y en el pasto superior a 60 días, cuando se aplicó a la dosis recomendada de 400 cm³/Ha, para el control de *Collaria spp*. A esta dosis, dicho estudio encontró que 35 días después de la fumigación de pasto kikuyo (*pennisetum clandestinum*) con el insecticida, la concentración en base seca, fue de 0.1928 µg/g, en un suelo con pH de 5.16 y temperatura ambiente promedio de 16°C.

El Clorpirifos ha sido asociado en varios trabajos de investigación a una disminución de hormonas tiroideas. Un estudio realizado por Zaidi *et al*, publicado en el año 2000, encontró aumentos en los niveles de TSH y disminución en los niveles de T3 en operarios encargados de la aplicación de pesticidas, expuestos a presentaciones en polvo y líquidas de Endosulfán, Quinalfos, Clorpirifos, Monocrotofós, Lindano, Parathión, Forato y Fenvalerato.

Rawlings *et al*, 1998, en un trabajo realizado en ovejas, hallaron una disminución marcada de los niveles de tiroxina (T4) consecuente al suministro oral de Clorpirifos, posiblemente debida a la competencia que ejercen algunos pesticidas por las proteínas de unión que circulan en el plasma sanguíneo y que transportan algunas hormonas, entre ellas las tiroideas. Cui Y *et al*, 2006, en un estudio llevado a cabo con los insecticidas Clorpirifos y Cipermetrina, determinaron que ambas moléculas se unieron a albúmina de suero bovino (BSA) y hemoglobina bovina (BHb), siendo más fuerte dicha unión a la primera. De lo anterior concluyeron, que la unión a estas proteínas puede afectar de forma importante la distribución, metabolismo y excreción de insecticidas.

Las hormonas tiroideas están estrechamente ligadas con las hormonas de la reproducción. Channing *et al*, 1976, fueron los primeros en informar acerca de los efectos directos de la tiroxina en células ováricas de cerdos. Maruo *et al*, 1992, detectaron receptores de tiroxina en células de la granulosa porcina, mientras que Wakim, 1993 y Zhang *et al*, 1997, lo hicieron en las mismas células pero en humanos. Hayashi *et al*, 2001, y Maruo *et al*, 1987, hallaron que T4 estimula la producción de estradiol inducida por FSH, en células de la granulosa porcina, y Wakim *et al*, 1995, demostraron que T4 estimulaba la producción de estradiol por las células de la granulosa humana. Spicer *et al*, 2001, en un estudio *in vitro* realizado en folículos bovinos, hallaron que la tiroxina puede ejercer un impacto positivo leve sobre la producción de progesterona, inducida por FSH en células de la granulosa, mientras que T3 y T4 pueden ejercer un mayor impacto positivo sobre la producción de androstenediona en las células de la teca, lo cual podría resultar en un incremento neto de la producción de estrógenos por los folículos. Este conjunto de evidencias sobre el papel que tienen las hormonas tiroideas en la regulación de la esteroidogénesis en los folículos bovinos, no descarta una posible disminución de los niveles de 17 β estradiol por vía de una disminución de las mismas.

Con el propósito de dilucidar posibles efectos disruptivos sobre el 17 β estradiol, Andersen *et al*, 2002, evaluaron 24 pesticidas en la interacción con los receptores de estrógeno (ER) y andrógeno (AR) en ensayos de transactivación. Asimismo, estudiaron los efectos estrogénicos sobre la proliferación de células MCF-7 y sobre la actividad aromatasa CYP-19, en microsomas de placenta humana. Dentro de los pesticidas evaluados se hallaba el Clorpirifos. Los pesticidas Dieldrín, Endosulfán, Metiocarb y Fenamirol actuaron como agonistas estrogénicos y antagonistas androgénicos, mientras que Clorpirifos, Deltametrina, Metil-tolclofos y Metil-tribenurón, indujeron débil respuesta en los ensayos de estrogenicidad.

En el presente trabajo, se validaron dos técnicas analíticas utilizando cromatografía gaseosa, para la determinación del organofosforado Clorpirifos,

en leche y suero sanguíneo de vacas Holstein con el propósito de determinar posibles acciones disruptivas, mediante el análisis de la relación entre los niveles del pesticida y los niveles de las hormonas tiroxina y 17 β estradiol.

Materiales y Métodos

Lugar del estudio: El experimento se realizó en la hacienda la Montaña, propiedad de la Universidad de Antioquia, municipio de San Pedro de Los Milagros, Antioquia, Colombia, ubicada a 2350 msnm, con topografía ondulada, temperatura promedio de 16° C y precipitación de 2500 mm.

Animales de experimentación: Vacas Holstein en primera mitad de gestación (rango: 50-120 días) y en producción, con edades aproximadas entre 2 y ½, y 9 y ½ años. Se excluyeron vacas secas, enfermas o que hubieran padecido alguna enfermedad o hubieran recibido algún tratamiento farmacológico u hormonal durante los últimos 2 meses previos al estudio.

Procedimiento de campo y toma de muestras: Se escogieron 8 animales que cumplieran los criterios arriba descritos y se dividieron de manera aleatoria en dos grupos de 4 animales cada uno, así:

Grupo 1: Se ubicó en una pradera de pasto Kikuyo (*pennisetum clandestinum*) fumigado por aspersión. La entrada a la pradera se hizo 30 días después de la última fumigación con Lorsban 4 EC® (Dow AgroSciences de Colombia), principio activo Clorpirifos, a la dosis recomendada por el productor, de 2 cm³/L; equivalente a 400 cm³/Ha.

Grupo 2: Se ubicó en una pradera no fumigada.

Ambos grupos permanecieron en las respectivas praderas durante un mes y sus condiciones de manejo fueron similares: pastoreo con cerca eléctrica, topografía de las praderas ondulada, tiempo máximo de ocupación por potrero de 7 días y fertilización después de cada pastoreo. Previo al inicio del experimento, ambos grupos de animales fueron ubicados durante 30 días en praderas que no habían sido fumigadas durante 18 meses con ningún pesticida, con el propósito de asegurar la ausencia total de residuos.

Las muestras de sangre, tomadas por venopunción yugular y sin anticoagulante; y las de leche, tomadas por ordeño manual, fueron colectadas en ambos grupos, el día previo a la entrada a los potreros (día 0) y los días: 2, 5, 10, 20 y 30 después del ingreso a los mismos. Las muestras de sangre fueron transportadas a temperatura ambiente y las de leche bajo refrigeración. Una vez en los laboratorios respectivos, se procedió a la determinación de los residuos de Clorpirifos en leche y sangre, por cromatografía gaseosa, y de los niveles séricos de tiroxina y estradiol por radioinmunoanálisis (RIA). Para el

análisis cromatográfico tanto en leche como en suero sanguíneo, todos los extractos fueron obtenidos durante los dos a tres días posteriores a la toma de las muestras y después congelados a -20 °C para su análisis. Para la determinación de las hormonas, también por condiciones logísticas y metodológicas, las muestras se congelaron a -20 °C, hasta completar el total de las mismas, antes de ser analizadas en una misma fecha por duplicado.

Las praderas en las cuales se llevó a cabo el experimento estaban establecidas en terreno ondulado, y entre la del grupo tratado y del grupo control, mediaba una distancia de aproximadamente 300 metros, lo cual garantizó la ausencia de contaminación cruzada con el insecticida Clorpirifos. Los suelos de la pradera fumigada presentaban un pH de 5.7 y los de la pradera no fumigada un pH de 6.0.

Estandarización del método analítico cromatográfico para la determinación de Clorpirifos en leche: Para la cuantificación del Clorpirifos en leche se utilizó el método de DiMuccio *et al*, 1996 al cual se le introdujeron algunas modificaciones. Utilizando Clorpirifos (Dr. Ehrenstorfer GmbH®, Augsburg, Alemania) como sustancia a cuantificar y Sulprofós (Dr. Ehrenstorfer GmbH®, Augsburg, Alemania) como estándar interno, se prepararon estándares a concentración de 1 ppm para identificar los tiempos de retención de ambos compuestos. Los análisis se realizaron en un cromatógrafo de gases Hewlett Packard 5890 plus® series II, con controlador electrónico de presión (EPC) y detector de nitrógeno fósforo (NPD), acoplado a un computador con el software ChemStation® de Agilent Technologies. El análisis estadístico de los datos se efectuó con el programa estadístico SAS, versión 9.6. Las soluciones patrón se prepararon en acetona grado analítico, Mallinckrodt®. Para las eluciones se utilizaron etanol absoluto Carlo Erba®, acetonitrilo Em Science®, y éter de petróleo grado analítico Mallinckrodt®. Adicionalmente, fueron usados: homogenizador marca Polytron®, agitador Touch Mixer Fisher Brand®, rotoevaporador Heidolph WB 2000®, bomba de vacío Gast® IDEX Corporation, equipo de procesamiento SPE para 12 cartuchos marca J.T.Baker® y cartuchos Chem Elut 1005® Varian (catálogo 1219-8006).

Método cromatográfico: Se utilizó una columna para cromatografía Rtx-1®, Crossbond®, 100% dimetil polisiloxano de 30 metros de longitud por 0,5 mm de diámetro interno y 1,0 micra de espesor de película, bajo las siguientes condiciones:

Gas portador: Helio, V=40 cm/s.

Gas auxiliar: Helio.

Flujo total a la salida del detector: 125 mL/min.

Flujo por columna: 1 mL/min.

Temperatura del detector: 270 °C.

Temperatura del inyector: 250 °C.

Programación de temperaturas del horno:
Temperatura inicial: 150 °C.
Rampa de calentamiento:
150-240 15 °C /min (3 minutos)
240-260 10 °C/min (7 minutos)
Modo de inyección de la muestra: Splitless.
Volumen de inyección: 2 µL.

Proceso de extracción en leche: Para la preparación de las muestras de leche fortificada se colocaron en un balón 10 mL de leche con Clorpirifos a las siguientes concentraciones: 0.008, 0.02, 0.04, 0.06 y 0.1 ppm. A cada una de las muestras de leche fortificada se le agregó 5 mL de acetonitrilo y 1 mL de etanol, luego de lo cual se homogenizaron a 7.000 rpm por tres minutos. Un volumen de 4 mL de ésta mezcla se depositó en un cartucho de matriz sólida (Cartuchos Chem Elut 1005® Varian), se dejó drenar por 10 minutos permitiendo obtener una distribución homogénea, para lo cual se utilizó un equipo de procesamiento SPE. Un volumen de 5 mL de la fase superior de la mezcla de elución, la cual se preparó mezclando éter de petróleo, acetonitrilo y etanol, en una relación de 20/5/1, respectivamente, se adicionó al cartucho. Luego de 10 minutos la columna se eluyó 5 veces más con 5 mL de la fase superior antes mencionada. Los eluidos recuperados desde la primera adición del solvente se concentraron a un pequeño volumen por rotoevaporación a 40 °C y presión reducida inducida con una bomba de vacío. Posteriormente se dejó secar a temperatura ambiente. El residuo resultante se disolvió en 1 mL de una solución de Sulprofós en acetona, a una concentración de 0.12 ppm y se cuantificó inyectando 2.0 µL al cromatógrafo GC-NPD bajo las condiciones descritas anteriormente.

Estandarización del método analítico cromatográfico para la determinación de Clorpirifos en suero sanguíneo: Para la cuantificación del Clorpirifos en suero sanguíneo se utilizó el método de Lacassie et al, 2001 al cual se le introdujo una modificación respecto del tipo de detector, por cuanto ellos utilizaron cromatografía de gases con detector selectivo de masas, y en el presente estudio se utilizó un detector de nitrógeno fósforo (NPD).

Utilizando Clorpirifos (Dr. Ehrenstorfer GmbH®, Augsburg, Alemania) como sustancia a cuantificar y Sulprofós (Dr. Ehrenstorfer GmbH®, Augsburg, Alemania) como estándar interno, se prepararon estándares a concentración de 1 ppm, con acetato de etilo como solvente, para identificar los tiempos de retención de ambos compuestos. El equipo de cromatografía y el programa estadístico, fueron los mismos del método aplicado en leche. Se utilizaron como reactivos: acetato de etilo, Merk®; alcohol metílico anhidro grado cromatográfico, Mallinckrodt® y agua desionizada, grado HPLC. El equipo adicional incluyó: agitador Touch Mixer Fisher Brand®, bomba de vacío Gast®.

IDEX Corporation, equipo de procesamiento SPE para 12 cartuchos marca J.T.Baker® y cartuchos de extracción HLB de 3 ml (60 mg) marca Waters OASIS®. El método cromatográfico fue el descrito en leche.

Proceso de extracción en suero: Para la preparación de las muestras de suero sanguíneo fortificado se depositaron 2 ml de éste, con Clorpirifos a las siguientes concentraciones: 0.008, 0.02, 0.04, 0.06, 0.1 y 0.15 ppm, en cartuchos de extracción HLB de 3 ml (60 mg) marca Waters OASIS®, previamente acondicionados con 2 ml de alcohol metílico anhidro grado cromatográfico y agua desionizada. La elución se llevó a cabo con 2 ml de acetato de etilo, Merk®, utilizando un equipo de procesamiento SPE, J.T.Baker®. El eluido fue evaporado con flujo de nitrógeno y el residuo final se disolvió en 500 µL de una solución de Sulprofós en acetato de etilo, a una concentración de 0.12 ppm y se cuantificó inyectando 2.0 µL al cromatógrafo GC-NPD bajo las condiciones descritas anteriormente.

Análisis de laboratorio para las hormonas: La cuantificación sérica de las hormonas tiroxina (T4) y 17β estradiol se realizó por radioinmunoanálisis (RIA). Para T4 se utilizó un kit comercial Coat -A- Count Total T4 de DPC® (Diagnostic Products Corporation), Los Angeles, CA, USA, con calibradores para una curva referencial con concentraciones de 0 a 15 µg/dl, con una sensibilidad analítica de 0.22 µg/dl (2.8 nmol/L) y un coeficiente de variación intraensayo de 3.1-9.3 %. El rango esperado para bovinos, según el proveedor, es de 4-6 µg/dl (95%). Adicionalmente se hizo control con un kit Canine Control (Bi-level) producido por la misma casa, el cual utiliza para el nivel I un rango de 1.10-1.82 µg/dl y para el nivel II un rango de 3.2 – 4.8 µg/dl, ambos con dos desviaciones estándar.

Para la cuantificación de 17β estradiol se utilizó un kit comercial de BP BIOMEDICALS®, USA, con calibradores para una curva referencial con concentraciones de 0 a 3000 pg/ml, una sensibilidad analítica de 8.0 pg/ml y un coeficiente de variación intraensayo de 0.35-11.98 %. Ambas hormonas se midieron por duplicado.

Método estadístico: En el método cromatográfico, para la estandarización de las curvas utilizadas en la cuantificación del clorpirifos (precisión), tanto en leche como en suero sanguíneo, se empleó el modelo lineal general, mediante una regresión simple donde se estableció el análisis de la varianza, el coeficiente de determinación (R^2) y el coeficiente de correlación (r), validándose los supuestos asociados con este modelo. Se empleó el paquete estadístico SAS versión 9.2. La exactitud en el proceso de extracción, concentración y análisis cromatográfico de las muestras de leche y de suero sanguíneo fortificadas, se realizó a diferentes concentraciones y se midió como el porcentaje de recuperación, al cual se le aplicó un análisis descriptivo para la

determinación de las desviaciones estándar (DS), desviaciones estándar relativas (DER) y coeficientes de variación (CV).

En el análisis estadístico de los resultados experimentales de campo, se aplicó un diseño de clasificación experimental completamente aleatorizado, efecto fijo, balanceado, en el cual se convalidaron los supuestos asociados con las variables tiroxina (T4) y 17 β estradiol: normalidad, independencia y aleatoriedad de los errores experimentales, homogeneidad de varianzas y no relación de media y varianzas:

$$y_{ij} = \mu + \tau_i + \varepsilon_{j(i)}$$

Para la variable estradiol se aplicó la familia de transformación Box Cox, con el fin de obtener, por el método de la máxima verosimilitud, el λ óptimo que hizo el ajuste a fin de convalidar los supuestos asociados con el modelo de clasificación experimental, dado que hubo heterogeneidad de varianzas. Se complementó con análisis descriptivo exploratorio unidimensional para hallar: media aritmética, desviación típica y coeficiente de variación para ambas hormonas.

RESULTADOS

Clorpirifos en leche y suero sanguíneo: La separación cromatográfica del analito de interés, Clorpirifos, y el estándar interno, Sulprofós, se logró bajo las condiciones cromatográficas descritas. Las figuras 2 y 3 muestran los cromatogramas de Sulprofós y Clorpirifos en acetona para la detección en leche y en suero sanguíneo. Los tiempos de retención fueron 5.78 y 8.02 minutos, para Sulprofós y Clorpirifos en leche y 6.69 y 9.47 minutos en suero sanguíneo.

Mediante inyección de acetona grado cromatográfico se verificó que en los tiempos de retención de los analitos no ocurría coelución de ninguna otra sustancia. Adicionalmente, se descartó la coelución de alguno o varios, de los componentes de los reactivos utilizados para la extracción química inyectando blancos de leche y suero sanguíneo con reactivos (acetona, acetonitrilo, etanol y éter de petróleo).

La exactitud en el proceso de extracción, concentración y análisis cromatográfico de las muestras de leche fortificadas se realizó a diferentes concentraciones y se midió como el porcentaje de recuperación con sus respectivas desviaciones estándar, desviaciones estándar relativas y coeficientes de variación (tabla 1). Los niveles se evaluaron por triplicado. Los promedios de los porcentajes de recuperación en leche estuvieron entre el 80.96 y el 115.97% con coeficientes de variación entre el 2.75 y el 4.82%. Los promedios de los porcentajes de recuperación en suero sanguíneo estuvieron entre el 71.01 y el 101.11% con coeficientes de variación entre 2.54 y 12.28%. Estos resultados permiten considerar que la exactitud del proceso de

extracción, concentración y análisis cromatográfico es buena para leche y aceptable para suero.

La evaluación de la precisión (repetibilidad) del método cromatográfico se realizó a las condiciones cromatográficas anteriormente descritas, utilizando los niveles de Clorpirifos 0.008, 0.02, 0.04, 0.06 y 0.1 ppm para leche y una concentración adicional para suero de 0.15 ppm. La concentración del estándar interno Sulprofós fue de 0.12 ppm. Cada nivel se inyectó tres veces en el cromatógrafo de gases. La respuesta se midió como el promedio del cociente de la altura del Clorpirifos sobre la altura del Sulprofós, desviaciones estándar (DE), desviaciones estándares relativas (DER) y coeficientes de variación (CV). Los valores de precisión se presentan para las medidas de altura (Tabla 1) y área (Tabla 2).

Tabla 1. Precisión del método cromatográfico. Promedio del cociente de la altura del Clorpirifos sobre la altura del Sulprofós, desviaciones estándar (DE), desviaciones estándares relativas (DER) y los coeficientes de variación (CV) a diferentes concentraciones del Clorpirifos. Sulprofós a una concentración de 0.12 ppm. n=15.

Clorpirifos (ppm)	0.008	0.02	0.04	0.06	0.1
\bar{X} AltClor./AltSulp	0.0926	0.2167	0.4097	0.6235	1.0350
DE	0.0021	0.0029	0.0124	0.011	0.0121
DER	0.0012	0.0017	0.0072	0.0055	0.0070
CV	2.24	1.33	3.03	1.77	1.17

Tabla 2. Precisión del método cromatográfico. Promedio del cociente del área del Clorpirifos sobre el área del Sulprofós, desviaciones estándar (DE), desviaciones estándares relativas (DER) y coeficientes de variación (CV) a diferentes concentraciones del Clorpirifos. Sulprofós a una concentración de 0.12 ppm. n=18.

Clorpirifos (ppm)	0.008	0.02	0.04	0.06	0.1	0.015
\bar{X} área Clorp./área sulp	0.021	0.061	0.138	0.227	0.444	0.632
DE	0.00073	0.0029	0.0064	0.0032	0.012	0.012
DER	0.00042	0.0016	0.0037	0.0018	0.0071	0.0072
CV	3.38	4.75	4.69	1.42	2.79	1.99

La linealidad se determinó mediante la inyección de muestras preparadas a partir de soluciones patrón de Clorpirifos a las concentraciones de 0.008, 0.02, 0.04, 0.06 y 0.1 ppm para leche y una concentración adicional para suero de 0.15 ppm. Se efectuó un análisis de regresión lineal, determinando la funcionalidad entre el cociente de la concentración del Clorpirifos/ la

concentración del Sulprofós (concentración de 0,12 ppm) vs el cociente de la altura del Clorpirifos/ Sulprofós.

Análisis de regresión: Modelo lineal: $Y_i = \beta_0 + \beta_1 X_i + E_i$

Variable dependiente (Y_i): Altura del Clorpirifos/ Altura del Sulprofós.

Variable independiente (X_i): Concentración del Clorpirifos/ Concentración del Sulprofós.

El análisis de regresión lineal para la relación entre el cociente altura del Clorpirifos/altura del Sulprofós, variable dependiente, y el cociente concentración Clorpirifos/concentración Sulprofós, variable independiente, dio como resultado un coeficiente de correlación de 0.9814 ($p < 0.0001$) y R^2 de 99.92 para leche y 0.9875 ($p < 0.0001$) y R^2 de 99.46 para suero. Esto indica que el 99.92% de las variaciones en el cociente altura del Clorpirifos/ altura del Sulprofós en leche y el 99.46% en suero, se deben a cambios en el cociente concentración del Clorpirifos/concentración del Sulprofós, dados por las variaciones en la concentración del Clorpirifos en la muestra. Las ecuaciones lineales que describen estas relaciones en leche y suero sanguíneo se observan en la Figura 4 A y B.

El límite de detección se halló con base en una relación señal a ruido igual a tres, en el tiempo de retención del Clorpirifos, obteniéndose un valor de 0,001 ppm. El límite de cuantificación fue de 0.008 ppm, calculado en el tiempo de retención del Clorpirifos, con base en una relación señal a ruido igual a 10.

La estabilidad de los estándares de Clorpirifos a las concentraciones utilizadas, en extractos de leche y suero sanguíneo se determinaron en corridos seriados en el cromatógrafo. Esta observación se realizó hasta el día 94 para leche y 32 para suero con un coeficiente de determinación (R^2) de 99.62 para ambos.

Resultados de cuantificación de las hormonas tiroxina (T4) y 17 β estradiol: No se halló diferencia estadísticamente significativa para las concentraciones de las hormonas tiroidea (T4) y 17 β estradiol, al comparar los días de tratamiento ($p > 0.05$). El análisis general para los distintos muestreos, no mostró diferencia estadísticamente significativa, en el efecto promedio del tratamiento ($p > 0.05$) (tablas 3 y 4).

Tabla 3. Valores de Tiroxina - T4 ($\mu\text{g/dl}$). Para cada muestreo, en cada tratamiento, $n=4$. Valores con igual literal indican ausencia de diferencia estadísticamente significativa. ($p > 0.05$). F: fumigado; SF: sin fumigación.

Tratamiento

Muestreo

$\bar{X} \pm \text{STD}$

CV

SF	1	3.48±0.52 ^a	15.14
F	1	3.37±0.56 ^a	16.69
SF	2	4.01±0.27 ^a	6.92
F	2	4.12±0.71 ^a	17.21
SF	3	3.80±0.33 ^a	8.85
F	3	4.18±0.47 ^a	11.34
SF	4	3.60±0.47 ^a	13.20
F	4	3.71±0.77 ^a	20.75
SF	5	3.67±0.44 ^a	12.19
F	5	4.15±0.70 ^a	16.92
SF	6	3.33± 0.68 ^a	20.59
F	6	4.00± 0.56 ^a	14.03

Tabla 4. Valores de 17β estradiol (pg/ml). Para cada muestreo, en cada tratamiento, n=4. Valores con igual literal indican ausencia de diferencia estadísticamente significativa. (p>0.05). F: fumigado; SF: sin fumigación.

Tratamiento	Muestreo	$\bar{X} \pm \text{STD}$	CV
SF	1	41.95 ± 4.51 ^a	10.76
F	1	37.8 ± 3.8 ^a	10.27
SF	2	42.38± 9.54 ^a	22.51
F	2	38.13 ± 5.83 ^a	15.30
SF	3	38.33 ± 8.10 ^a	21.15
F	3	33.24 ± 5.59 ^a	16.81
SF	4	40.71 ± 6.33 ^a	15.56
F	4	33.35 ± 6.12 ^a	10.35
SF	5	49.28 ± 14.09 ^a	28.60
F	5	35.14 ± 8.37 ^a	23.82
SF	6	50.83 ± 15.57 ^a	30.63
F	6	35.93 ± 9.27 ^a	27.76

Discusión

Clorpirifos en leche: El método utilizado demostró ser efectivo para la detección de Clorpirifos en leche cruda y entera de bovinos Holstein. La respuesta del detector fue lineal en el rango escogido (0.008-0.1 ppm) (tabla 1), en el cual estaba incluido el Límite Máximo de Residuos (LMR) para este insecticida, aceptado por la legislación colombiana, con base en los lineamientos del *Codex Alimentarius*, 2003, el cual es de 0.01 ppm. Los resultados del proceso de recuperación en leche, mostraron una buena exactitud en la extracción química y en la concentración de las muestras, previo a la medición cromatográfica (tabla 1).

No obstante haberse utilizado en el rango de cuantificación un valor del límite inferior muy bajo (0.008 ppm), la presente investigación no detectó residuos de Clorpirifos en ninguna de las 48 muestras de leche estudiadas. Estos resultados coinciden con la opinión de Bluthgen y Heeschen, 1997 quienes consideran que la degradación metabólica de los pesticidas organofosforados es muy eficaz y rápida, por lo cual rara vez se observan sus residuos en leche, y con Bolles *et al*, 1999 quienes afirman que los residuos de Clorpirifos son escasamente detectados en leches de marca.

Corroborando lo anterior, Salas *et al*, 2003, en una investigación llevada a cabo para determinar y cuantificar 13 pesticidas organofosforados ampliamente utilizados en México, estudiaron 4 marcas comerciales de leche homogenizada y pasteurizada, durante 12 meses y un total de 96 muestras, hallando la presencia de Clorpirifos tan sólo en una de ellas, con un nivel residual de 0.013 ppm, un porcentaje de recuperación del 94.4% (CV:6.6) y un límite de detección de 0.009 ppm, utilizando cromatografía de gases con un detector fotométrico de llama adicionado de un filtro de fósforo. Sin embargo, Salas *et al*, 2003, afirman que tal situación es una realidad en los países desarrollados, pero que en los países en desarrollo la situación puede estar afectada por la falta o deficiente aplicación de buenas prácticas agrícolas y veterinarias, con la consecuente transferencia de residuos desde los alimentos que se utilizan para los animales, hacia la leche.

Hincapié MM, 1998, analizó por cromatografía gaseosa, los niveles residuales de algunos de los pesticidas más frecuentemente utilizados en hatos lecheros en el norte del departamento de Antioquia, Colombia, entre los cuales se hallaba el Clorpirifos, sin hallar residuos de ninguno de ellos. Para el Clorpirifos el límite de cuantificación fue de 0.05 ppm, utilizando un detector NPD, y las muestras fueron tomadas en 5 fincas en las cuales, según encuesta, se fumigaba con alguno o varios de estos pesticidas. El estudio además, utilizó una metodología en la cual las muestras fueron tomadas de recipientes en los que previamente se habían mezclado las producciones de los animales y en donde no se precisó la dosis exacta de fumigación. No obstante lo anterior, y dado que en la zona de realización del trabajo se evidenciaba, según la investigación, un manejo inadecuado en términos de sobredosificaciones y de incumplimiento de los tiempos de entrada de los animales a los potreros, es posible que aunque los niveles ingeridos fueran altos, la eficiencia de los procesos de biodegradación, tanto medioambiental como ruminal de estos pesticidas, causara la ausencia de residuos en las muestras de leche estudiadas. Adicionalmente, el nivel de cuantificación fue más alto que el del presente trabajo.

Como se menciona en la introducción, según Cochran, 1995, menos de 0.1 % de la dosis oral de Clorpirifos administrada a cabras, aparece en la leche, consideración importante en los resultados del presente estudio, desde el punto

de vista comparativo, por tratarse también de un rumiante, en el cual la microbiota del sistema digestivo, al igual que en los bovinos, contribuye a la detoxificación de los pesticidas.

Clorpirifos en suero sanguíneo: El método utilizado demostró ser bueno para la detección de Clorpirifos en suero sanguíneo de bovinos Holstein. La respuesta del detector fue lineal en el rango escogido (0.008-0.15 ppm) y los resultados del proceso de recuperación, mostraron una exactitud aceptable en la extracción química y en la concentración de las muestras, previas a la medición cromatográfica.

Igual que en leche, la presente investigación no detectó residuos de Clorpirifos en ninguna de las 48 muestras de suero sanguíneo estudiadas. Hasta la fecha no hay en la literatura reportes recientes sobre la determinación de Clorpirifos en suero sanguíneo de bovinos, en ensayos de campo, que permitan una contrastación de los resultados aquí obtenidos. Al igual que para los residuos en leche, se deduce que los procesos de degradación medioambiental del Clorpirifos en el suelo y en el pasto, lo mismo que a nivel ruminal, aunados al tiempo de entrada de los animales a los potreros fumigados a la dosis utilizada, pueden ser la explicación a la ausencia de residuos.

Hormonas: El presente trabajo no halló diferencias estadísticamente significativas en los niveles séricos de tiroxina (T4) y 17β estradiol, al comparar los animales tratados con los controles (tablas 3 y 4).

Para el caso de T4 lo anterior contrasta con el trabajo de Rawlings *et al*, 1998, realizado en ovejas, en el cual el insecticida clorpirifos y los pesticidas dimetoato, lindano, trialato, ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) y pentaclorofenol, produjeron una disminución marcada de dicha hormona en los grupos tratados. Según el mismo autor, aunque algunas proteínas ávidas de unión a la tiroxina encontradas en humanos no están presentes en otras especies, la competencia por las proteínas de unión puede proveer una explicación parcial de las bajas concentraciones séricas de T4 causadas por los pesticidas antes referidos. De hecho, en un estudio sobre la unión de la hormona tiroidea en suero humano, Van den Berg *et al*, 1991, 60-65% de químicos industriales demostraron tener alguna capacidad de desplazar T4 y reducir sus concentraciones séricas. El Clorpirifos es una sustancia hidrofóbica que debe ser transportada en la sangre unida a proteínas transportadoras, (Cui Y *et al*, 2006). La albúmina es la proteína más abundante en plasma (Ma G y Yang, 1990), representando 52-60% del total de proteínas (Silva *et al*, 2004). Es un importante transportador que puede unirse de forma reversible a muchos agentes endógenos y exógenos como ácidos grasos, bilirrubina (Yang y Yang, 1992), herbicidas (Jaiswal, 2002) e insecticidas (Silva *et al*, 2004). Como fue comentado en la introducción, Cui Y *et al*, 2006, en un estudio llevado a cabo con los insecticidas Clorpirifos y Cipermetrina, determinaron que ambas

moléculas se unieron a albúmina de suero bovino (BSA) y hemoglobina bovina (BHb), siendo más fuerte dicha unión a la primera, de lo cual concluyeron, que la unión a estas proteínas puede afectar de forma importante la distribución, metabolismo y excreción de insecticidas.

La no afectación de los niveles séricos de T4 y 17 β estradiol en este trabajo, puede tener su explicación, posiblemente, en las bajos niveles de Clorpirifos que se alcanzaron a nivel sistémico en los animales tratados, a la dosis de fumigación de 400 cm³/Ha y al tiempo de entrada de los animales después de la fumigación (30 días), dada la rápida y eficiente degradación de este insecticida en el suelo, el pasto y el tracto digestivo del rumiante, antes de su llegada al sistema microsomal que ejerce la acción final de depuración del tóxico, convirtiéndolo rápidamente a 3,5,6 tricloro 2-piridinol (Dai *et al*, 2001). En contraste, el trabajo de Rawlings *et al*, 1998, empleó dosis semanales efectivas más altas, de 12.5 mg/kg de peso vivo, durante 2 semanas, y las cuales fueron suministradas directamente en el rumen en cápsulas de gelatina.

Conclusiones y perspectivas

- El uso de Clorpirifos para fumigar pastos que serán consumidos por vacas de leche puede ser recomendado siempre y cuando se cumplan las recomendaciones del fabricante en cuanto a las dosis y a los tiempos de entrada de los animales a los potreros fumigados.
- El Clorpirifos, usado según las recomendaciones del fabricante para la fumigación de pastos que serán consumidos por vacas de leche no produce alteraciones en los niveles séricos de las hormonas tiroxina y 17 β estradiol, lo cual se puede considerar como un indicador de ausencia de efectos disruptivos sobre estas hormonas bajo las condiciones adecuadas de fumigación y retiro de los potreros.
- Se sugiere en trabajos futuros determinar la relación existente entre diferentes niveles de dosificación de Clorpirifos y la posible alteración de los niveles hormonales. Igualmente, incursionar en modelos *in vitro*, con líneas celulares de bovinos, para dilucidar posibles mecanismos moleculares de disrupción en esta especie.

Agradecimientos

Los autores agradecen al Comité para el Desarrollo de la Investigación (CODI) de la Universidad de Antioquia, Colombia, por la financiación para el desarrollo del presente trabajo, al Laboratorio Agrolab S.A por su colaboración en la realización de las pruebas de detección de hormonas tiroideas. Igualmente agradecemos al departamento de Haciendas de la Facultad de Ciencias Agrarias

de la Universidad de Antioquia y a su personal por la disponibilidad de espacios y los animales usados en el proyecto.

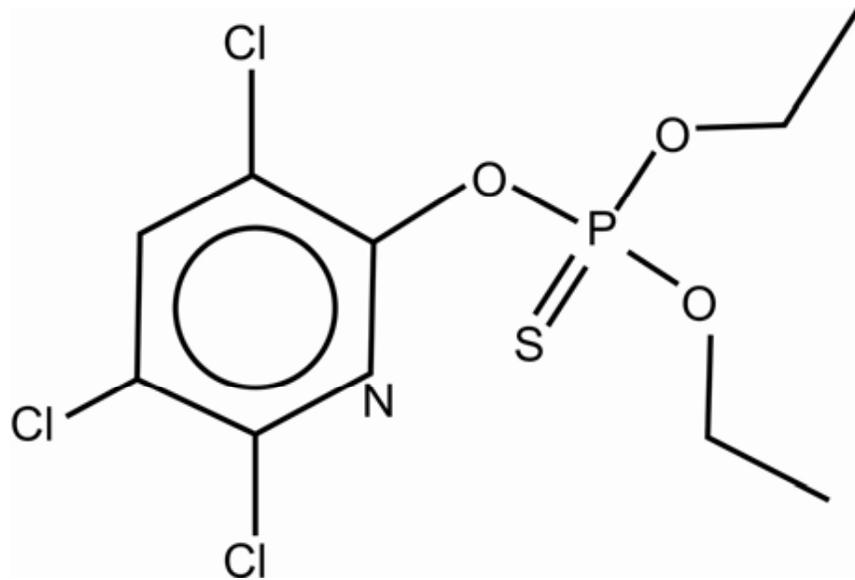


Figura 1. Fórmula estructural del pesticida organofosforado 0,0-dietil 0-(3,5,6-tricloro-2- piridil fosforotioato) clorpirifos

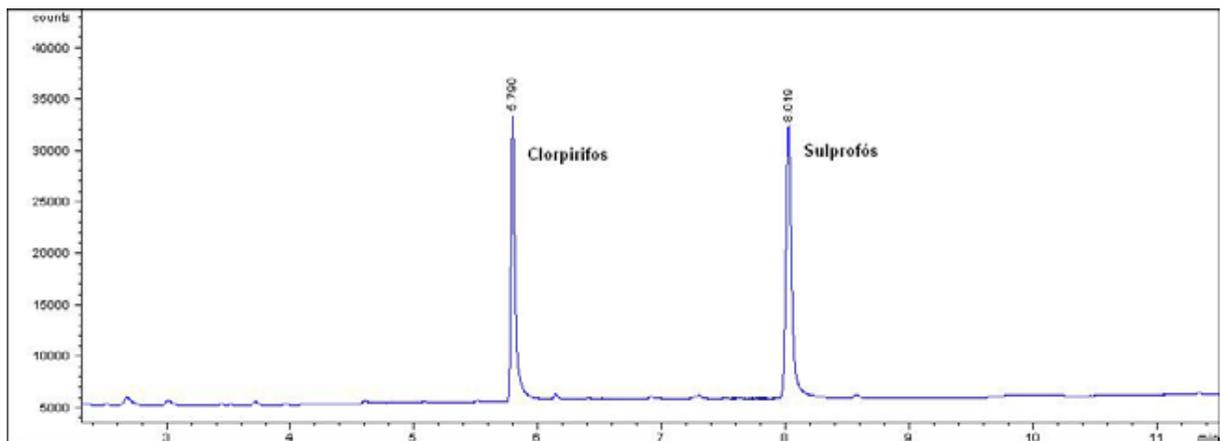


Figura 2. Tiempos de retención de Clorpirifos (analito) y de Sulprofós (estándar interno) en leche.

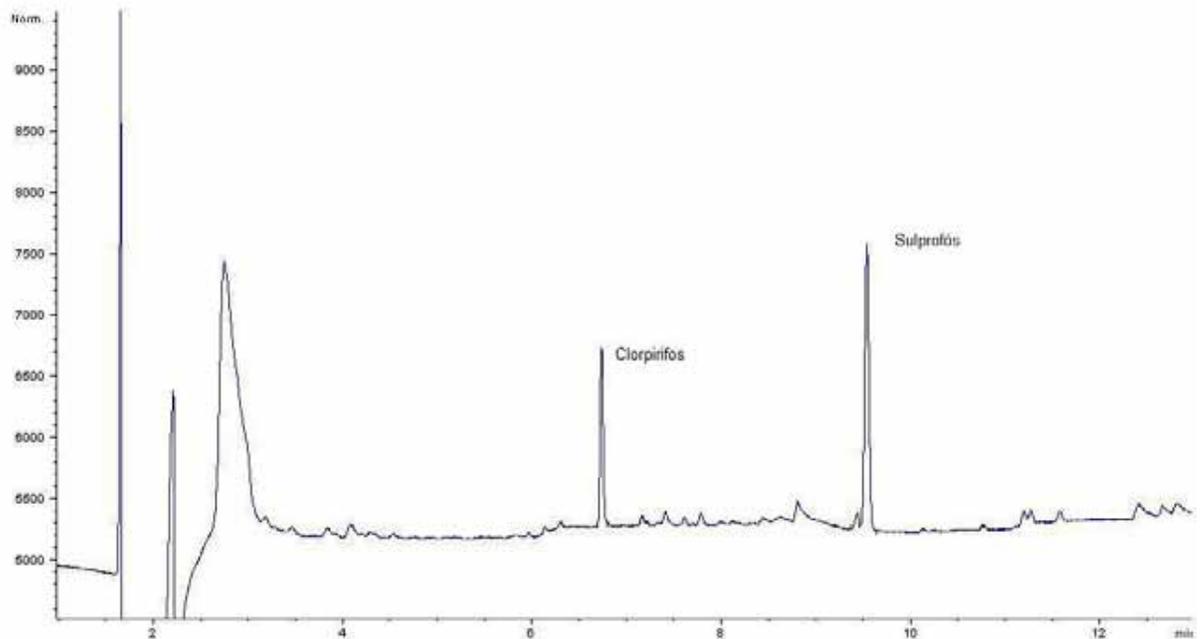


Figura 3. Tiempos de retención de Clorpirifos (analito) y de Sulprofós (estándar interno) en suero sanguíneo.

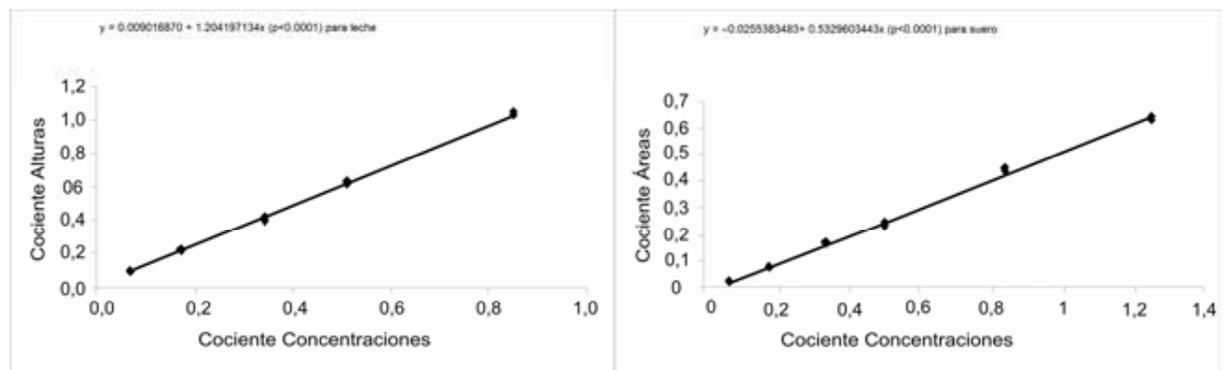


Figura 4. Análisis de regresión lineal para el cociente de alturas (altura Clorpirifos/altura Sulprofós) versus el cociente de concentraciones (concentración Clorpirifos/concentración Sulprofós), para los substratos leche A y suero sanguíneo B

Referencias

1. Andersen HR, Vinggaard AM, Rasmussen TH, Gjermanndsen IM, Bonfeld-Jorgensen EC. Effects of currently used pesticides in assay for estrogenicity, androgenicity, and aromatase activity in vitro. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2002; 179: 1-12.

2. A World Compendium The Pesticide Manual. Fourteenth Edition. British Crop Production Council (BCPC), UK; 2006. 1347 p.
3. Bluthgen A, Heesch WH. Principles for the toxicological evaluation of the residues. In monograph on residues and contaminants in milk and milk products. International Dairy Federation. Brussels, Belgium, 1997.
4. Bolles HG, Dixon WHE, Peterson RK, Tomerlin JR, Day Jr EW et al. Market basket study to determine residues of the insecticide chlorpyrifos. J Agric Food Chem. 1999; 47:1817-1822.
5. Channing CP, Tsai V, Sachs D. Role of insulin, thyroxine, and cortisol in luteinization of granulosa cells grown in chemically defined media. Biol Reprod 1976; 15: 235-247.
6. Chen H, Xiao J, Hu G, Zhou J, Xiao H et al. Estrogenicity of organophosphorus and pyrethroid pesticides. J Toxicol Environ Health Part A. 2002; 65(19):1419-1435.
7. Cochran RC, Kishiyama J, Aldous C, Carr WC Jr, Pfeifer KF. Chlorpyrifos: Hazard Assessment Based on a Review of the Effects of Short-term and Long-term Exposure in Animals and Humans. Fd Chem Tox. 1995; 33: 165-172.
8. Colborn T, vom Saal, Soto A. Developmental effects of endocrine-disrupting chemicals in wildlife and humans. Environ Health Perspec. 1993; 101:378-384.
9. Comercialización de plaguicidas. Producción, ventas, importación y exportación, 2002. Boletín Técnico. Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural. ICA. Bogotá DC, 2005. 121 p
10. Córdoba D. Toxicología. 4ª. Edición, Manual Moderno. Bogotá (Colombia), 2001. 858 p.
11. Cui Y, Guo J, Xu B. Chen Z. Binding of chlorpyrifos and cypermethrin to blood proteins. Pesticide Biochem Physiol. 2006; 85: 104-114.
12. Dai D, Tang J, Rose R, Hodsong E, Bienstock R *et al.* Identification of Variants of CYP3A4 and Characterization of Their Abilities to Metabolize Testosterone and Chlorpyrifos. Pharmacol. 2001; 29:825-823.
13. Deiana P, Fatichenti F. Pesticide residues in milk processing. Ital J food Sci. 1992; 4:229-245.
14. Di Muccio A, Pelosi P, Camoni I, *et al.* Selective, solidmatrix dispersion extraction of organophosphate pesticide residues from milk. J Chromatog. 1996; 754:497-506.
15. Gaines TR. Acute toxicity of pesticidas. Toxicology and Applied Pharmacology. 1969; 14:515-534. En: Cochran RC, Kishiyama J, Aldous C, Carr WC Jr, Pfeifer KF. Chlorpyrifos: Hazard Assessment Based on a Review of the Effects of Short-term and Long-term Exposure in Animals and Humans. Fd Chem Tox. 1995; 33: 165-172.
16. Hayashi M, Maruo T, Matsuo H, Mochizuki M. The biocellular effect of thyroid hormone on functional differentiation of porcine granulosa cells in culture. Nippon Naibunpi Gakkai Zasshi 1985; 61: 1189-1196. En: Spicer LJ, Alonso J, Chamberlain CS. Effects of thyroid hormones on bovine granulosa and thecal cell function in vitro: dependence on insulin and gonadotropins. J Dairy Sci 2001; 84: 1069-1076.

17. Hincapié M. Análisis en leches de los niveles residuales de algunos pesticidas utilizados en hatos lecheros en el Norte del Departamento de Antioquia. Trabajo de Grado en Maestría. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Antioquia, Medellín. 1998. 116 p.
18. Jaiswal R, Khan MA, Musarrat J, Photosensitized paraquat-induced structural alterations and free radical mediated fragmentation of serum albumin, *J Photochem Photobiol B Biol* 2002; 67:163–170.
19. Kupfer D. Bulger W. Estrogenic properties of DDT and its analogs. *Toxicol Appl Pharmacol*. 1980; 14: 358-367.
20. Lacassie E, Dreyfuss M, Gaulier JM, Marquet P, Daguet JL et al. Multiresidue determination method for organophosphorus pesticides in serum and whole blood by gas chromatography-mass-selective detection. *J Chromatog B*. 2001; 759:109-116.
21. Libro Web de Química del NIST (National Institute of Standards and Technology). Base de Datos de Referencia Estándar del NIST. No. 69, junio de 2005. <http://webbook.nist.gov/chemistry/> (última entrada: noviembre 7 de 2007).
22. Loaiza A, Jaramillo J, León F, Incidencia de Factores Sociales, Económicos, Culturales y Técnicos en el uso de Agroquímicos por Pequeños Productores del Departamento de Antioquia. Programa Nacional de Transferencia de Tecnología, PRONATTA, Instituto Colombiano Agropecuario, ICA. Diciembre 2000; 172 p.
23. Lyons G. Endocrine disrupting pesticides. *Pestic News*. 1999; 46:16-19.
24. Ma G, Yang P, Fluorescence study on the interaction of vitamin B6 and rutin with albumin. *Prog Biochem Biophys* 1990; 17: 290–295.
25. Márquez S. Evaluación de Algunos Efectos de la Contaminación por Aplicación de Lorsban (Clorpirifos) en un Suelo y un Cultivo de Kikuyo en el Norte Antioqueño. Trabajo de Grado en Maestría, Universidad de Antioquia, Medellín, 2001. 142 p.
26. Maruo T, Hayashi M, Matsuo H, Yamamoto T, Okada H, *et al*. The role of thyroid hormones as a biological amplifier of the actions of follicle-stimulating hormone in functional differentiation of cultured porcine granulosa cells. *Endocrinology* 1987; 121: 1233-1241.
27. Maruo T, Hiramatsu S, Otani T, Hayashi M, Mochizuki M. Increase in the expresión of thyroid hormone receptors in porcine granulosa cells in follicular maturation. *Acta Endocrinol* 1992; 127: 152-160.
28. Morales C, Rodríguez N. El Clorpirifos: posible disruptor endocrino en bovinos de leche. *Rev Col Cienc Pec*. 2004; 17(3): 255-266.
29. Noa M, Hernández J, Alfonso HA. Monitoreo de plaguicidas en algunas cuencas lecheras de Cuba. Parte 2. Plaguicidas organofosforados. *Rev Salud Anim*. 1992; 14:165-170.
30. Nolan R, Rich D, Freshour N and Saunder J. Chlorpyrifos: pharmacokinetics in human volunteers following single oral and dermal doses. *Toxicol Appl Pharmacol*. 1984; 73: 8-15.

31. Programa Conjunto FAO/OMS Sobre Normas Alimentarias. Comisión del Codex Alimentarius. 26^o Período de Sesiones Roma, Italia, 30 de junio – 7 de julio de 2003. Informe de la 35^a Reunión del Comité del Codex Sobre Residuos de Plaguicidas. Rotterdam, Países Bajos, 31 de marzo – 5 de abril de 2003. ALINORM 03/24A. 121 p.
32. Racke KD, Steele KP, Poder RN, Dick WA and Avidov E. Factors affecting the hydrolytic degradation of chlorpyrifos in soil. J Agric Food Chem. 1996; 44:1582-1592.
33. Rawlings NC, Cook SJ, Waldbillig D. Effects of the Pesticides Carbofuran, Chlorpyrifos, Dimethoate, Lindane, Triallate, Trifluralin, 2,4-D, and Pentachlorophenol on the metabolic endocrine and reproductive endocrine system in ewes. Journal of Toxicol Environ Health Part A. 1998; 54(1):21-36.
34. Rigas ML, Okino MS, Quackenboss JJ. Use of a pharmacokinetic model to assess chlorpyrifos exposure and dose in children, based on urinary biomarker measurement. Toxicol Sci. 2001; 61:374- 381.
35. Salas JH, González MM, Noa M, Pérez NA, Díaz G, Gutiérrez R, et al. Organophosphorus pesticide residues in Mexican commercial pasteurized milk. J Agric Food Chem. 2003; 51: 4468-4471.
36. Silva D, Cortez CM, Cunha-Bastos J, S.R.W. Louro, Methyl parathion interaction with human and bovine serum albumin. Toxicol Lett 2004; 147: 53–61.
37. Smegal DC. Human Health Risk Assessment. Chlorpyrifos. U.S Environmental Protection Agency. Office of Pesticide Programs. Health Effects Division, 2000. 131 p.
38. Smith G, Watson B, Fischer F. Investigation on Dursban insecticide. Metabolism of (Cl)-(o,o-diethyl)-3,5,6-trichloro-2-pyridil phosphorothioate in rats. J Agricul Food Chem. 1967; 15:132-138.
39. Soto AM, Sonnenschein C. Endocrine Disruptors: a very personal story with multiple personalities. Gac Sanit. 2002; 16:209-212.
40. Spicer LJ, Alonso J, Chamberlain CS. Effects of thyroid hormones on bovine granulosa and thecal cell function in vitro: dependence on insulin and gonadotropins. J Dairy Sci. 2001; 84(5):1069-1076.
41. The Agrochemicals Handbook. Second Edition. Royal Society of Chemistry. Cambridge, England; 1990.
42. Timchalk C, Busby A, Campbell A, Needham L, Barr DB. Comparative pharmacokinetics of the organophosphorus insecticide chlorpyrifos and its major metabolites diethylphosphate, diethylphosphate and 3,5,6-trichloro-2-pyridinol in the rat. Toxicology. 2007; 237: 145-157.
43. Tinsley IJ. Chemical Concepts in Pollutant Behavior. 1er. Ed. Wiley-Interscience Publication. New York, 1998. 285 p.
44. Van den Berg KJ, van Raaij JA, Bragt PC and Notten WR. Interactions of halogenated industrial chemicals with transthyretin and effects on thyroid hormone levels *in vivo*. Arch Toxicol. 1991; 65:15-19.

45. Wakim AN, Polizotto SL, Buffo MJ, Marrero MJ, Burholt DR. Thyroid hormones in follicular fluid and thyroid hormone receptors in human granulosa cells. *Fertil Steril* 1993; 59:1187-1190.
46. Wakim AN, Polizotto SL, Burholt DR. Augmentation by thyroxine of human granulosa cells gonadotropin-induced steroidogenesis. *Hum Reprod* 1995; 10: 2845-2848.
47. Wakim AN, Polizotto SL, Burholt DR. Influence of thyroxine on human granulosa cell steroidogenesis in vitro. *J Assist Reprod Genet* 1995; 12:274-277.
48. Yang, P. Yang, Fluorescence quenching studies on the action of metal ions with human serum albumin. *Prog Biochem Biophys* 1992; 19: 110–114.
49. Zaidi SS, Bhatnagar VK, Gandhi SJ, Shah MP, Kulkarni PK et al. Assessment of thyroid function in pesticide formulators. *Hum Experim Toxicol.* 2000; 19 (9): 497-501.
50. Zhang SS, Carrillo AJ, Darling DS. Expression of multiple thyroid hormone receptor mRNAs in human oocytes, cumulus cells, and granulosa cells. *Mol Hum Reprod* 1997; 3: 555-562.

REDVET: 2010 Vol. 11, Nº 1

Recibido 04.08.09 - Ref.prov. AGO0908C - Revisado 06.12.09 - Aceptado 17.12.09
Ref. def. 011001_RED VET - Publicado: 01.01.10

Este artículo está disponible en <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n010110.html> concretamente en <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n010110/011001.pdf>

REDVET® Revista Electrónica de Veterinaria está editada por Veterinaria Organización®.

Se autoriza la difusión y reenvío siempre que enlace con [Veterinaria.org](http://www.veterinaria.org)® <http://www.veterinaria.org> y con REDVET® - <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet> - <http://revista.veterinaria.org>