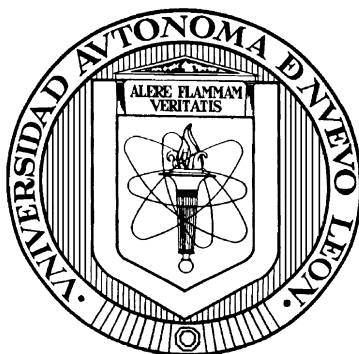


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS



**DETERMINACIÓN DE METALES PESADOS Y EVALUACIÓN DE LA
BIOTRANSFERENCIA DE ESPECIES INORGÁNICAS DE ARSÉNICO EN LECHE
BOVINA CRUDA**

POR

Q. B. P. LUZ MARÍA CASTELLANOS LÓPEZ

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRÍA EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN
QUÍMICA ANALÍTICA AMBIENTAL**

SEPTIEMBRE, 2015

**DETERMINACIÓN DE METALES PESADOS Y EVALUACIÓN DE LA
BIOTRANSFERENCIA DE ESPECIES INORGÁNICAS DE ARSÉNICO EN LECHE
BOVINA CRUDA**

Aprobación de tesis

PRESIDENTE

Dra. Laura Hinojosa Reyes

SECRETARIO

VOCAL

**DETERMINACIÓN DE METALES PESADOS Y EVALUACIÓN DE LA
BIOTRANSFERENCIA DE ESPECIES INORGÁNICAS DE ARSÉNICO EN LECHE
BOVINA CRUDA**

Comité tutorial

Dra. Isabel Sáenz Tavera

Dra. Susana T. López Cortina

M. C. Nancy Pérez Rodríguez

Resumen

Luz María Castellanos López
Número de páginas: 73

Universidad Autónoma de Nuevo León
Facultad de Ciencias Químicas

Área de Estudio: Ciencias Exactas

Fecha de graduación:
Candidato para el grado de Maestría en
Ciencias con Orientación en Química
Analítica Ambiental.

Título del Estudio: DETERMINACIÓN DE METALES PESADOS Y EVALUACIÓN DE LA BIOTRANSFERENCIA DE ESPECIES INORGÁNICAS DE ARSÉNICO EN LECHE BOVINA CRUDA

Propósito y método de estudio:

En el presente estudio se evaluó el factor de biotransferencia (FBT) de arsénico (As) inorgánico en leche bovina cruda a través de agua de consumo en zonas contaminadas con este metaloide en México. Las muestras de leche y agua fueron colectadas en municipios de Durango, San Luis Potosí y Zacatecas zonas lugares donde se lleva a cabo la minería y con antecedente de contaminación por As. Para el análisis de As total fue empleado el método de digestión acida asistido por microondas (EPA 3052). La extracción de especies inorgánicas de As fue asistida por microondas empleando H_3PO_4 0.3 M a 90 °C durante 30 min, para su posterior separación en una resina de intercambio aniónico fuerte (SAX). La determinación de As total y de especies de arsénico se llevó a cabo por Espectrometría de Masas con Fuente de Plasma de Acoplamiento Inductivo (ICP-MS). Adicionalmente en las muestras leche previamente digeridas se analizó el contenido total de Pb, Cd, Cu, Zn y Fe por ICP-MS con la finalidad de evaluar el grado de contaminación por estos metales y establecer una correlación con la concentración de As en leche y el posible origen de la contaminación.

Contribuciones y conclusiones

La concentración de As total en el agua de la mayoría de las zonas de estudio superó el límite permisible para agua de consumo según la norma oficial NOM-127-SSA1-1994-2000 (25 $\mu\text{g}/\text{L}$). En cuanto a las muestras de leche, las concentraciones de As se encontraron entre el límite de detección y 472.80 $\mu\text{g}/\text{kg}$, siendo los estados de Durango y San Luis Potosí los que presentaron las concentraciones mayores. Las concentraciones de los otros metales analizados en leche mostraron que el promedio de Pb en leche en Zacatecas y San Luis Potosí, superó el límite permisible de acuerdo a la Comisión Europea. Así mismo para el caso del Cd la concentración media en el estado de San Luis Potosí superó los niveles ya reportados. Las zonas de San Luis Potosí, Durango y Zacatecas presentaron niveles altos de metales esenciales (Zn, Cu y Fe). Además se encontró que para los metales analizados (Pb, Cd, Cu, Zn y Fe) se presentó una correlación positiva estadísticamente significativa ($p < 0.05$) con As en leche, lo cual sugiere una fuente de contaminación común la minera que se realiza en los sitios de estudio. En cuanto a la concentración de especies de As inorgánico en leche, las concentraciones para la especie de As (V) fueron mayores (79.60-242.20 $\mu\text{g}/\text{kg}$) que las de As (III) (31.00-96.81 $\mu\text{g}/\text{kg}$); dado que la especie de As (V) presenta un menor grado de toxicidad podría indicar menor riesgo para la población que ingiere este alimento. Por último, se determinó el FBT de especies de As inorgánicas a través del agua de consumo, obteniéndose valores superiores a los ya reportados para As total (2.6×10^{-6} a 6×10^{-4}); sin embargo, no se encontró una correlación significativa entre As en leche y arsénico en agua ($p > 0.05$), lo cual sugiere que el agua no es la única vía de exposición de este metaloide. Para una posterior evaluación del factor de biotransferencia se sugiere el analizar el contenido de As en alimento y el suelo donde habita el organismo e incorporar estas fuentes de contaminación al modelo del FBT.

FIRMA DEL ASESOR

Dra. Laura Hinojosa Reyes

FIRMA DEL CO-ASESOR

Dr. Juan Manuel Alfaro Barbosa

Agradecimientos

A la Dra. Laura Hinojosa por su asesoría y dedicación en este proyecto.

A mi comité de tesis Dra. Isabel Sáenz, M. C. Nancy Pérez y Dra. Susana López, por su tiempo y consejos para realizar este trabajo.

A mi co-asesor Dr. Juan M. Alfaro por su apoyo en la elaboración de la tesis.

A Dr. Adolfo Caballero por su colaboración en este proyecto.

A Dra. Margaria Martinez, Dra. Idalia Garza y M. T. E. Yolada Ortiz por su ayuda en la obtención de las muestras.

A Dra. María del R. Rocha por su ayuda en este proyecto,

A los maestros del posgrado por compartir sus conocimientos.

A la Dra. Aracely por la oportunidad de trabajar en posgrado.

A Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca otorgada.

A Facultad de Ciencias Químicas y la Universidad Autónoma de Nuevo León.

Dedicatoria

A Ma. de la Luz López por ser el principal motivo en cualquier proyecto de mi vida, por su fuerza y fe que siempre me inculcó.

A mis tíos Consuelo López y Ascensión López, por su apoyo y por ser un ejemplo de responsabilidad y bondad.

A mi hermana Ma. Luisa Castellanos por su apoyo e inspirarme con su fortaleza y dedicación a continuar con mis estudios.

A mis sobrinos Nadia, Azael, Katia y Ronaldo, por su compañía y cariño, los amo.

A Angel Saucedo por su compañía, por su apoyo y por ser una persona muy especial en mi vida.

A mis amigas Brenda, Betty, Gina, Karina, Isabel y Magda, por su enorme apoyo y por soportar mis momentos de estrés, las adoro.

A mis Dras. favoritas Idalia, Mary, Margarita, y Yolanda, por su colaboración en este proyecto y por ser un ejemplo de dedicación y trabajo.

A mis compañeros de posgrado Adrian, Ana, Eliza, Irma, Jesús, Olga, Verito, Nelly, Karen, Rubi, Don. Victor, Ruben, Daniel y Victor.

A Dr. Victor Torres y Q. Zila Royer por su enorme apoyo y cariño.

Tabla de contenido

1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Metales pesados	1
1.2 Plomo.....	2
1.3 Cadmio.....	2
1.4 Arsénico	3
1.4.1 Especies de arsénico	5
1.4.2 Contaminación por arsénico.....	7
1.4.3 Factor de biotransferencia de arsénico	8
1.5 Importancia del consumo de lácteos.....	9
1.5.1 Presencia de metales tóxicos en leche.....	11
1.6 Aportación científica	14
1.7 Hipótesis	15
1.8 Objetivo general.....	15
1.9 Objetivos específicos	15
2. ANTECEDENTES	16
2.1 Estudios de la determinación de metales en leche como indicadores de contaminación.....	16
2.2 Determinación de arsénico total en leche	18
2.3 Especiación de arsénico en leche	21
2.4 Estudios relacionados con el factor de biotransferencia (FBT)	24
3. METODOLOGÍA	26
3.1 Obtención de la muestra	26
3.1.1 Muestreo	26
3.2 Determinación de metales pesados en agua y leche cruda	27
3.2.1 Materiales y reactivos	27
3.2.2 Equipo.....	27
3.2.3 Calibración.....	28
3.3 Procedimiento analítico	29
3.3.1 Digestión total	29

3.3.2	Cuantificación.....	30
3.4	Validación del método analítico para la determinación de metales pesados en muestras de leche.....	31
3.5	Cálculo del factor de biotransferencia de arsénico total en leche bovina	32
3.6	Extracción de especies de arsénico	32
3.7	Determinación de especies inorgánicas en muestras de leche cruda bovina.....	33
3.7.1	Materiales y reactivos	33
3.7.2	Evaluación del procedimiento de preconcentración.....	34
3.8	Correlación de metales analizados en leche bovina cruda	34
4.	RESULTADOS.....	35
4.1	Obtención de la muestras.....	35
4.2	Parámetros analíticos para la determinación de metales en leche por ICP-MS	38
4.2.1	Metales esenciales	38
4.2.2	Metales pesados.....	38
4.3	Validación del método analítico para la determinación de metales pesados en muestras de leche.....	39
4.4	Determinación de metales pesados en leche cruda	43
4.4.1	Plomo	43
4.4.2	Cadmio.....	45
4.4.3	Zinc.....	47
4.4.4	Hierro	48
4.4.5	Cobre.....	50
4.4.6	Arsénico.....	52
4.5	Extracción de especies de arsénico en leche.....	54
4.6	Validación de proceso de extracción y separación de especies inorgánicas de As	55
4.7	Determinación de especies inorgánicas de As en muestras de leche cruda bovina	57
4.8	Cálculo del factor de biotransferencia de especies inorgánicas de As en leche bovina cruda a través del agua de consumo.....	58
5.	CONCLUSIONES.....	64
6.	REFERENCIAS.....	66

Lista de tablas

Tabla 1. Principales especies de arsénico de importancia ambiental.....	6
Tabla 2. Regiones del mundo con presencia de arsénico en agua subterránea	7
Tabla 3. Composición nutricional de la leche.....	10
Tabla 4. Estudios reportados de determinación de arsénico total en leche en diversos países.	13
Tabla 5. Componentes del equipo ICP-MS.....	28
Tabla 6. Programa de digestión empleado para las muestras de leche.....	29
Tabla 7. Condiciones de operación del ICP-MS.....	30
Tabla 8. Valores certificados de metales pesados en el material de referencia certificado (ERM-BD151, LGC-standards, leche en polvo).....	31
Tabla 9. Procedimientos de extracción evaluados.....	33
Tabla 10. Zonas de muestreo para la evaluación de la contaminación de As en leche	35
Tabla 11. Parámetros analíticos para la determinación de metales mediante ICP-MS.....	39
Tabla 12. Procedimientos de digestión empleados para determinar As total por AFS/HG.....	40
Tabla 13. Porcentaje de recuperación de As total en leche cruda bovina empleando el método de digestión seleccionado	41
Tabla 14. Determinación de Cu, Pb y Cd en el material de referencia certificado ERM-BD151 (leche en polvo LGC-standards).	42
Tabla 15. Concentración promedio de Pb en leche bovina cruda para los estados de estudio	44
Tabla 16. Concentración promedio de Cd en leche bovina cruda para los estados evaluados	46
Tabla 17. Concentración promedio de Zn en leche bovina cruda para los estados evaluados	47
Tabla 18. Concentración promedio de Fe en leche bovina cruda por estado evaluado.	49
Tabla 19. Concentración promedio de Cu en leche bovina cruda por estado evaluado.	51
Tabla 20. Concentración promedio de As en leche bovina cruda por estado evaluado	53
Tabla 21. Porcentaje de extracción de As en muestras de leche.....	55
Tabla 22. Porcentajes de recuperación de As(III) y As(V) para una mezcla de estándares de As(III) y As(V)	56
Tabla 23. Porcentajes de recuperación de As (III) y As (V) en extracto de leche enriquecida con especies inorgánicas de As.....	56
Tabla 24. Concentración de As(III) y As(V) en muestras de leche de la zona de estudio.....	58
Tabla 25. Concentración de As en agua de las zonas de estudio.....	59
Tabla 26. Factor de biotransferencia de especies inorgánicas de As determinados en la zona de estudio	60
Tabla 27. FBT reportados para As total.....	61
Tabla 28. Coeficientes de correlación de Pearson para el contenido de As y de metales de estudio en leche.....	¡Error! Marcador no definido.

Lista de figuras

Figura 1. Ciclo biogeoquímico del arsénico	4
Figura 2. Porcentaje de producción de leche a nivel nacional 2012	¡Error! Marcador no definido.
Figura 3. Regiones mineras de Durango (a), Zacatecas (b) y San Luis Potosí (c)	37
Figura 4. Concentración promedio de Pb en leche cruda bovina y su desviación estándar para n = 3.....	44
Figura 5. Concentración promedio de Cd en leche cruda bovina y su desviación estándar para n = 3.....	46
Figura 6. Concentraciones promedio de Zn en leche cruda bovina y su desviación estándar para n = 3.....	48
Figura 7. Concentraciones promedio de Fe en leche cruda bovina y su desviación estándar para n = 3.....	50
Figura 8. Concentración promedio de Cu en leche cruda bovina y su desviación estándar para n = 3.....	51
Figura 9. Concentraciones promedio de As en leche cruda bovina y su desviación estándar para n = 3.....	54

Nomenclatura

$\mu\text{g/g}$	Microgramo por gramo
$\mu\text{g/kg}$	Microgramo por kilogramo
$\mu\text{g/L}$	Microgramo por litro
$\mu\text{g/ml}$	Microgramo por mililitro
AAS	Espectroscopia de Absorción Atómica
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
Ag	Plata
AOAC	Asociación de Químicos Analíticos Oficiales
As	Arsénico
As (III)	Arsénico trivalente
As (V)	Arsénico pentavalente
As_2O_3	Trióxido de arsénico
AsB	Arsenobetaína
AsC	Arsenocolina
b	Pendiente de la curva de calibración
Ba	Bario
Be	Berilio
Bi	Bismuto
Cd	Cadmio
CE	Comisión Europea
cm	Centímetro

Co	Cobalto
CODEX	Comité de Aditivos y Contaminantes Alimenticios
Cr	Cromo
Cs	Cesio
$\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$	Nitrato de Cobre (II)
días/L	Días por litro
DMA	Ácido dimetilarsénico
EE UU	Estados Unidos
EPA	Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos
FBT	Factor de Biotransferencia
Fe	Hierro
$\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$	Nitrato de hierro (III)
Ga	Galio
H_2O	Agua
H_2O_2	Peróxido de hidrógeno
H_3PO_4	Ácido fosfórico
HCl	Ácido clorhídrico
Hg	Mercurio
HG	Generación de hidruros
HG-AAS	Espectroscopia de Absorción Atómica con Sistema de Generación de Hidruros
HG-AFS	Espectroscopia de Fluorescencia Atómica con Sistema de Generación de Hidruros

HNO ₃	Ácido nítrico
HPLC	Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución
HPLC-ICP-MS	Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución Acoplado a Espectrometría de Masas con Fuente de Plasma de Acoplamiento Inductivo
HPLC-UV-HG-AFS	Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución Ultravioleta Visible Acoplado a Espectrometría de Fluorescencia con Generación de Hidruros
I	Yodo
IARC	Agencia Internacional de Investigación de Cáncer
ICP-MS	Espectrometría de Masas con Fuente de Plasma de Acoplamiento Inductivo
In	Indio
ISTP	Ingesta Semanal Tolerable Provisional
LOD	Límite de Detección
Li	Litio
LOQ	Límite de Cuantificación
Mg(NO ₃) ₂ •6H ₂ O	Nitrato de magnesio hexahidratado
mg/kg	Miligramo por kilogramo
MMA	Ácido monometilarsónico
Mn	Manganeso
Mo	Molibdeno
ND	No Detectado

ng/g	Nanogramo por gramo
Ni	Níquel
OMS	Organización Mundial de la Salud
Pb	Plomo
Pb(NO ₃) ₂	Nitrato de plomo (II)
Rb	Rubidio
S	Desviación estándar
SAGARPA	Secretaria de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación
Sb (III)	Antimonio (III)
Sb (V)	Antimonio (V)
Se	Selenio
Sr	Estroncio
Tl	Talio
TMAO	Óxido de trimetilarsina
U	Uranio
V	Vanadio
v/v	Volumen/volumen
W	Watt
Zn	Zinc
ZnO	Óxido de zinc
A	Alfa

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Metales pesados

A nivel mundial, la contaminación ambiental constituye uno de los problemas más críticos a resolver; la presencia de agentes físicos, químicos o biológicos en el agua, aire y suelo, continúa incrementándose proporcionalmente con el aumento de la población humana. Entre los contaminantes químicos destacan los metales pesados, que incluyen al arsénico (As), plomo (Pb), cadmio (Cd), níquel (Ni), cobalto (Co), hierro (Fe), zinc (Zn), cromo (Cr) y plata (Ag), los cuales se encuentran en forma natural en la corteza terrestre [1-4].

En la agricultura, el uso de fertilizantes y plaguicidas, así como la irrigación de los campos con aguas contaminadas son las principales fuentes antropogénicas de contaminación del suelo, estos productos agrícolas pueden contener metales pesados, los cuales no se degradan ni química ni biológicamente, por lo que tienden a acumularse y pueden ser absorbidos por las plantas y así incorporarse a la cadena trófica a través del alimento. Actualmente se conocen numerosos daños a la salud, ocasionados por metales y metaloides, por lo cual es importante estudiar su concentración y distribución en diversos productos alimenticios para estimar su impacto en la salud humana, además de la evaluación de su biodisponibilidad, acumulación y accesibilidad a través de la dieta [5, 6]. A continuación se describen los principales efectos en la salud ocasionados por algunos metales y un metaloide, el As, al cual se ha evaluado además su transferencia en sistemas biológicos.

1.2 Plomo

El plomo es un metal pesado altamente tóxico, relacionado con daños neuronales, hematológicos, deficiencias cognitivas, insuficiencia renal y enfermedades inmunológicas. La Agencia Internacional de Investigación de Cáncer (IARC, por sus siglas en inglés) lo clasifica como carcinógeno (grupo B2) [7].

La exposición al plomo se debe a su uso en la fabricación de plásticos (estereato de plomo), pinturas, productos de plomería, baterías y anteriormente El compuesto de tetraetilo de plomo fue empleado durante décadas como aditivos para gasolina . Es constante el riesgo de exposición a este metal, siendo el sistema digestivo una de las principales vías mediante la ingesta de alimentos y bebidas. Los efectos en la salud son: interfiere en la activación de algunas enzimas, afecta la síntesis de proteínas de estructura, altera la homeostasis del calcio por su capacidad de absorberse en los huesos, inhibe la absorción de diferentes elementos traza, a nivel celular altera el sistema de óxido-reducción, dada su gran afinidad por grupos imidazol, sulfhídrico, amino, carboxilo y fosfato, comúnmente presentes en los componentes celulares y principales vías metabólicas [8].

1.3 Cadmio

Las aplicaciones que tiene el cadmio son en la fabricación de baterías, pigmentos, aleaciones, estabilizadores para plásticos y en galvanoplastia [9]. Algunos fungicidas y nematocidas son también elaborados con cadmio, siendo una posible fuente de contaminación de los suelos agrícolas [10]. Los efectos que causa a los humanos son daños gastrointestinales, fracturas de huesos, esterilidad, daños en el sistema

nervioso central, en el sistema inmune, desórdenes psicológicos, daño en el ácido desoxirribonucleico (ADN) y participa en el desarrollo de diferentes tipos de cáncer. La fuerte unión del cadmio a los grupos –SH y desplazamiento del zinc de los enlaces -S-, de proteínas y enzimas biológicas altera sus funciones participando así en procesos metabólicos [11].

1.4 Arsénico

El arsénico (As) es un metaloide ampliamente distribuido en la naturaleza, en forma natural se encuentra en rocas, suelos y aguas subterráneas en bajas concentraciones, las especies más comunes en el suelo son las de As (III) y As (V) las cuales pasan por reacciones de oxidación y reducción, otras especies como ácido monometilarsénico (MMA), óxido de trimetilarsina (TMAO) y ácido dimetilarsénico (DMA) presentan procesos de reducción y metilación. En el agua estas especies llegan como producto de la lixiviación o como producto de actividades antropogénicas también está presente en emisiones de industrias que utilizan carbón, en la fabricación de semiconductores, vidrio, aleaciones de plomo y cobre, insecticidas y herbicidas, siendo las formas de As (III), As (V) y otras orgánicas como la arsenobetaína, arsenocolina, arsenolípido y arsenoazúcares las más comunes, las cuales se incorporan al metabolismo de organismos acuáticos (Figura 1).

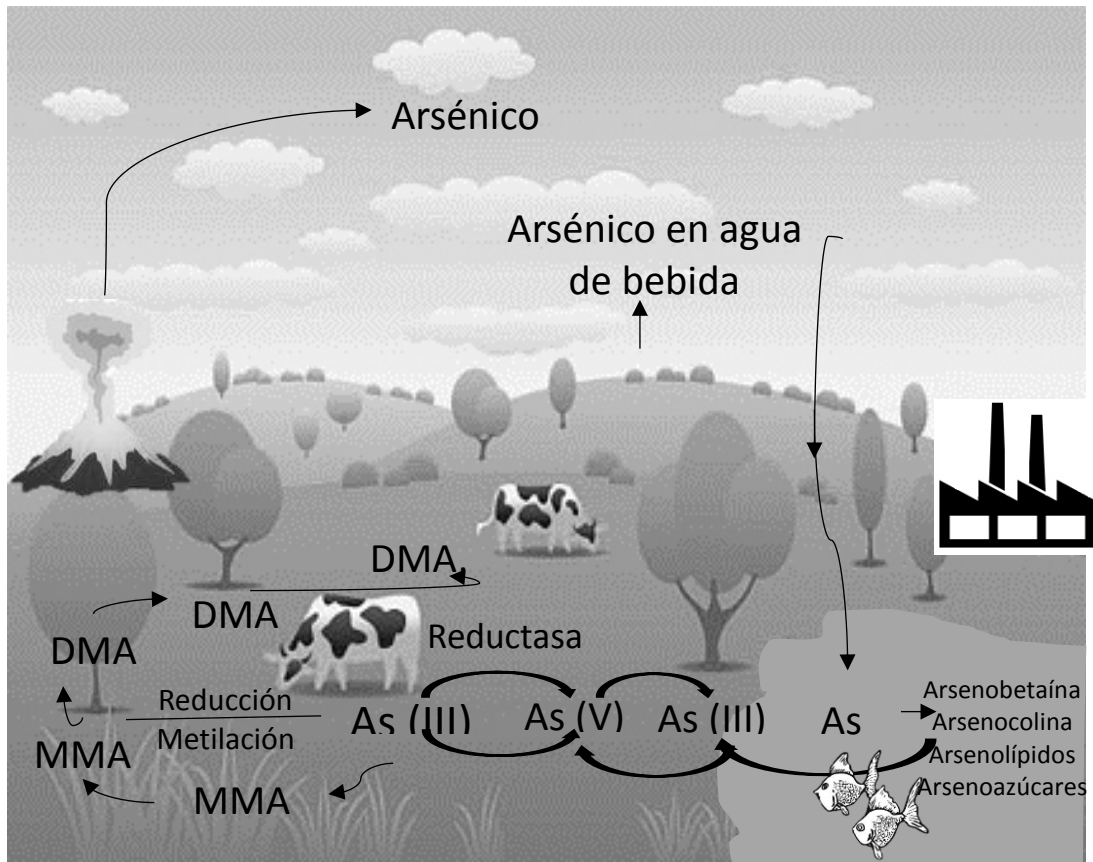


Figura 1. Ciclo biogeoquímico del arsénico

El interés en determinar su concentración y distribución en muestras ambientales radica en la elevada toxicidad que presenta para los seres vivos, los daños que causan respiratorios, anormalidades cardiovasculares, efectos gastrointestinales como gastritis, náuseas o dolor abdominal, anemia, lesiones cutáneas que van desde cambios de pigmentación hasta cáncer de piel; también se ha relacionado con cáncer de vejiga, riñón y pulmón. Existen otros padecimientos asociados con la ingesta prolongada de arsénico, entre los cuales se encuentran la diabetes, daños neuronales, reproductivos y mutagénicos [12, 13].

1.4.1 Especies de arsénico

La movilidad en el medio ambiente, la tendencia a ser acumulados en los organismos vivos así como la biodisponibilidad y toxicidad depende de la forma química y del estado de oxidación que presenta el arsénico. El arsénico puede encontrarse en forma elemental (0), trivalente As (III) o pentavalente As (V). Se ha demostrado que la toxicidad del As (III) es 10 veces mayor que la del As (V) y resulta de su habilidad para enlazarse a grupos sulfhidrilos, especialmente al grupo tiol de proteínas, produciendo un mal funcionamiento de la actividad enzimática. La toxicidad del As (V) es el resultado de su habilidad para sustituir al fosfato en reacciones catalizadas por enzimas, donde puede impedir su correcto funcionamiento. Además, las especies trivalentes presentan mayor absorción celular en comparación con las especies pentavalentes [14-16]. Las formas orgánicas, que incluyen los metabolitos metilados como el MMA, DMA, TMAO y los compuestos orgánicos complejos como la arsenocolina (AsC), arsenobetaína (AsB) y arsenoazúcares, poseen el potencial tóxico más bajo. Las especies de arsénico presentes en el agua y en el suelo son predominantemente inorgánicas, sin embargo, también han sido reportadas las especies orgánicas MMA y DMA en algunos extractos de suelos, mientras que en los alimentos existe una amplia variedad de especies inorgánicas y orgánicas [17, 18]. En la Tabla 1, se enumeran las principales especies de arsénico que han sido identificadas en muestras de importancia ambiental [16, 18].

Tabla 1. Principales especies de arsénico de importancia ambiental

Especie de arsénico	estructura	fórmula química	LD ₅₀ (g/kg) ¹	pKa
Arsenito		AsO ₃ ³⁻	0.014	9.2
				12.1
				13.4
Arseniato		AsO ₄ ³⁻	0.020	2.2
				7.0
				11.5
Ácido monometilarsónico (MMA)		CH ₃ AsO(OH) ₂	1.8	3.6
				8.2
Ácido dimetilarsínico (DMA)		(CH ₃) ₂ AsO(OH)	1.2	6.2
Arsenobetaína (AsB)		(CH ₃) ₃ As ⁺ C ₂ COO ⁻	10.0	
Arsenocolina (AsC)		(CH ₃) ₃ As ⁺ CH ₂ CH ₂ OH	6.5	
Óxido de trimetilarsina (TMAO)		(CH ₃) ₃ AsO	10.06	

¹LD₅₀: dosis o radiación de una sustancia que resulta mortal para la mitad de un conjunto de animales de prueba.

1.4.2 Contaminación por arsénico

En regiones de Bangladesh, Taiwan, India, Tailandia y América Latina se han reportado casos de contaminación por arsénico en agua. En países de América Latina como Argentina, Chile y México, la exposición a través del agua que se ingiere afecta a varios millones de personas (Tabla 2) [12, 13].

Tabla 2. Regiones del mundo con presencia de arsénico en agua subterránea

Región	Rango de concentración ($\mu\text{g/L}$)	Referencia
Bangladesh	<0.5–2,500	[19]
Taiwán, China	10–1,820	[19]
Río Rojo, Vietnam	1–3,050	[19]
Ron Phibun, Tailandia	1 – 5,000	[19]
Llanura Chaco-Pampeana, Argentina	<1–5,300	[19]
Norte de Chile, Antofagasta	100–1,000	[19]
México		
Comarca Lagunera	8–620	[20]
Los Altos, Jalisco	14.7 - 101.9	[20]
Ciudad Juárez, Chihuahua	5–650	[20]
Rio Verde, San Luis Potosí	5–54	[20]
Zimapán, Hidalgo	14–1000	[20]

En México se han descrito concentraciones elevadas de arsénico en agua subterránea en los estados de Durango y Coahuila, donde se han reportado concentraciones de 8 a 624 $\mu\text{g/L}$. Aproximadamente 400,000 personas que viven en las zonas rurales de estos estados se encuentran expuestas a concentraciones altas de arsénico [21], comparado con la concentración recomendada por la Norma Oficial Mexicana NOM-127-SSA1-1994-2000 (25 $\mu\text{g/L}$). En estados como Durango, San Luis Potosí y Zacatecas la minería es una de las principales actividades industriales y es

fuente potencial de contaminación por arsénico afectando principalmente al suelo y agua [22]; por ejemplo en San Luis Potosí (Villa de la Paz-Matehuala), cuya principal actividad económica es la minería, se evaluó la concentración de arsénico en las muestras de agua y suelo las cuales presentaron concentraciones en un rango de 8-265 $\mu\text{g/L}$ y 19–17,384 mg/kg , respectivamente, superando más de cinco veces el valor permisible para agua (50 $\mu\text{g/L}$) y por mucho el valor permitido en suelo agrícola de 22 mg/kg establecido por la NOM-147 para la remediación del suelo agrícola (NOM-147-SEMARNAT/SSA1-2004). En este estudio también la zona de Cerrito Blanco situada a 5 km de Matehuala, San Luis Potosí presentó concentraciones de arsénico en agua $>5900 \mu\text{g/L}$ que superan 100 veces los valores establecidos por la Norma Oficial Mexicana para agua de consumo [23, 24].

1.4.3 Factor de biotransferencia de arsénico

El factor de biotransferencia (FBT) para la leche proporciona una sencilla y útil herramienta para estimar el nivel ingerido de arsénico a través de las principales fuente de exposición. El FBT se define como la proporción de un contaminante en el tejido del organismo o en las sustancias secretadas (leche, orina o heces) con base en la ingesta diaria del contaminante por parte del organismo (mg/día [25]). El FBT se representa en unidades días por litro para especificar el tiempo que tarda en transferir un litro de agua que contiene el contaminante analizado.

El FBT se ha determinado para las concentraciones totales de elementos como cadmio (3.0×10^{-4} días/L), cromo (1×10^{-5} días/L), plomo (1.4×10^{-3} días/L), mercurio

(6.7×10^{-4} días/L), níquel (2.7×10^{-5} días/L) y arsénico (5.7×10^{-4} días/L) [26]. En México y Argentina, donde la contaminación por arsénico representa un grave problema, se han realizado estudios de biotransferencia de As a la leche tomando en consideración únicamente la ingesta de As a través de agua contaminada por este metaloide para determinar la calidad de este alimento. Para Argentina se encontró en un rango entre 1.5×10^{-5} y 2.6×10^{-6} días/L y en México 6×10^{-4} días/L [21, 25].

1.5 Importancia del consumo de lácteos

Los estados de Coahuila y Durango forman parte de la Comarca Lagunera que es la cuenca lechera más importante del país ocupa el primer lugar en producción a nivel nacional (30%). En el año de 2012 alcanzó una producción de 2,198, 846 L, seguido de Jalisco (26%), y Chihuahua (13%) (Figura 2) de acuerdo a los estudios realizados por la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA) [27, 28].

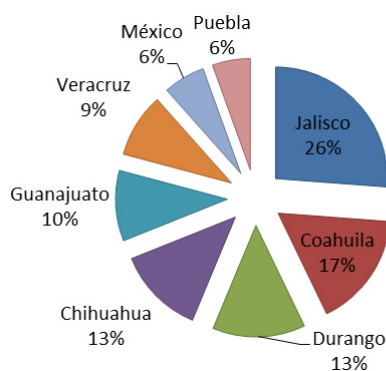


Figura 2. Porcentaje de producción de leche a nivel nacional en 2012

La leche es un alimento básico en la dieta humana debido a su valor nutricional, está compuesta de agua y sólidos como grasa, proteínas, minerales (calcio, fósforo, zinc y magnesio) y vitaminas A, D y del grupo B, especialmente B1, B2, B6 y B12 (Tabla 3) [29]. En 2011 el consumo de lácteos incluidos en la dieta de los mexicanos fue de 12 mil millones de litros. El consumo per capita de leche en el país se estima que ascendió a 66 litros en el 2012 [28].

Tabla 3. Composición nutricional de la leche

Vitaminas	Concentración (mg/L)	Minerales	Concentración (mg/L)
A	1299.5	Calcio	1277.3
B1	0.39	Cloro	1031.36
B2	1.67	Cobre	0.1
B3	0.87	Yodo *	237.21
B6	0.43	Hierro	0.52
B12 *	3.68	Magnesio	138.2
Biotina *	19.6	Manganeso	0.04
C	9.69	Molibdeno*	20.63
D	41.25	Fósforo	963.28
E	1.54	Potasio	1567.66
Folato *	61.57	Selenio *	15.47
K *	41.25	Sodio	505.36
Pantotenato de calcio	3.24	Zinc	3.92

*Concentraciones expresadas en µg/L

1.5.1 Presencia de metales tóxicos en leche

La leche es un producto de excreción de glándulas mamarias que contiene además numerosas sustancias xenobióticas entre las que se encuentran metales, representando así un riesgo para la salud humana [25]. La determinación de estos elementos en la leche es un indicador directo del grado de contaminación de la misma y un indicador indirecto de las condiciones ambientales locales o periféricas del suelo, agua, aire y vegetación de la zona donde se localiza el ganado [9].

En el caso del plomo es importante evaluar su concentración en productos lácteos debido a los efectos tóxicos que causa en infantes, los principales consumidores. El daño puede presentarse desde que se encuentran en etapa embrionaria hasta los 7 años de edad; entre los efectos adversos que causa están la alteración del crecimiento y desarrollo, por lo que es importante monitorizar las concentraciones de este elemento en leche [30, 31].

Swarup y col. determinaron plomo en muestras de sangre y leche de organismos criados en zonas industriales de la India (procesamiento de aluminio, fundición de plomo y zinc). Los resultados mostraron que los especímenes con mayor concentración de plomo en leche fueron los criados en la zona de fundición de plomo y zinc con una concentración promedio de plomo de 0.84 µg/mL [32].

El cadmio también se ha reportado en muestras de leche, en concentraciones bajas (20-30 µg/L). El origen del cadmio en la leche comúnmente es por ser impureza del zinc y químicamente en la leche el cadmio se presenta ligado a los grupos –SH de las proteínas del suero [33]. Sin embargo, cuando el ganado se encuentra en ambientes contaminados por cadmio existe la transferencia de este elemento a la leche por el

consumo de agua o alimento contaminado [34]; por ejemplo, en Irán realizaron la evaluación de los metales tóxicos Pb y Cd en muestras de leche de cabras, vacas, ovejas y búfalo en diferentes regiones del país. La concentración de plomo en 8.1% y el 1.9% de las muestras de leche de ovejas y vacas, respectivamente fue superior al valor establecido por el Codex (20 µg/L) [31].

En el caso del arsénico en leche, algunos estudios consideran que la principal fuente de exposición es el agua que es ingerida por el ganado. Por lo tanto, la determinación de la concentración de arsénico en leche es importante para evaluar el grado de contaminación del ambiente de origen [25, 26]. En México se encuentran reportados pocos estudios sobre la determinación de arsénico total en leche (Tabla 4) [21]. En el año de 1997, Rosas y col. reportaron en la zona de la Comarca Lagunera concentraciones de arsénico total en leche bovina de 0.9 a 27.4 ng/g [23]. Por otro lado, en el caso de otros países (Tabla 4), los valores más altos de arsénico en leche se encontraron en los países de Italia y Croacia [35, 36].

Tabla 4. Estudios reportados de determinación de arsénico total en leche en diversos países

Región	Concentración As (ng/g)	Referencia
Comarca Lagunera, México	0.9-27.4	[21]
Córdoba, Argentina	0.3-10.5	[25]
Valencia, España	3.4-11.6	[37]
Calabria, Italia	37.9	[35]
Región rural del norte y sur, Croacia	1-283	[36]

La determinación de la concentración total de arsénico en leche no proporciona información suficiente para evaluar la toxicidad y biodisponibilidad de este elemento, por lo que es necesario conocer además el contenido de las formas físico-químicas en las que se encuentra este elemento en la muestra. Las especies de arsénico presentan diferente grado de toxicidad (ver Tabla 1), por lo que es recomendable realizar estudios de especiación para evaluar el riesgo real que representa el consumo de alimentos [38, 39]. Con el antecedente de la presencia de arsénico en agua de consumo en algunas regiones de México, como la Comarca Lagunera, considerando su alta producción a nivel nacional de leche bovina, en el presente estudio se evaluó la distribución de especies inorgánicas de arsénico en leche bovina procedente de zonas contaminadas y su correlación con otros metales que se han reportado en este alimento.

Para la especiación de arsénico en muestras de leche, matriz con un alto contenido de proteínas, minerales y grasas, se requiere la implementación de un método de extracción para la determinación de las formas de arsénico presentes en esta muestra, ya que la información existente sobre estudios de especiación de arsénico en leche es escasa. En alimentos semejantes como leche de arroz, yogurt, queso y suplementos alimenticios a base de vegetales y frutas, se ha realizado estudios de especiación de arsénico extrayendo las especies empleando diferentes agentes extractantes como enzimas (amilasas y proteasas), solventes como metanol:agua (25:75), así como ácidos (1% ácido nítrico, 0.06 M HCl, 0.2 M ácido trifluoroacético y 0.3 M H₃PO₄). En estos estudios, la etapa de extracción ha sido asistida mediante agitación o microondas [40-42]. Uno de los problemas más críticos durante el análisis de especiación en muestras sólidas es el tratamiento de la muestra, el cual suele incluir una o varias etapas de extracción. Es esencial que todas estas etapas sean lo más eficaces posible y que las especies originales no sufran degradación ni alteración del equilibrio entre ellas. Por lo anterior, resulta importante contar con metodologías de extracción adecuadas, que permitan la determinación de las especies de arsénico en las muestras de estudio.

1.6 Aportación científica

Determinación del factor de biotransferencia de especies inorgánicas de arsénico en leche bovina cruda en zonas contaminadas con este metaloide en México, implementando una metodología para la extracción de As(III) y As(V) , así como la

evaluación de la correlación de la concentración de arsénico con otros metales en las muestras de estudio.

1.7 Hipótesis

El factor de biotransferencia de especies inorgánicas de arsénico en leche bovina cruda para algunas regiones en México es mayor que 1×10^{-5} días/L y se ve afectado por la presencia de metales pesados.

1.8 Objetivo general

Determinar metales pesados y evaluar el factor de biotransferencia de especies inorgánicas de arsénico en leche bovina cruda en zonas contaminadas con este metaloide en México.

1.9 Objetivos específicos

1. Diseñar y realizar el plan de muestreo de leche y agua en los sitios seleccionados.
2. Determinar la concentración total de arsénico, plomo, cadmio, hierro, cobre y zinc en muestras de leche y agua.
3. Desarrollar una metodología de extracción para determinar la concentración de especies de arsénico inorgánico en leche.

4. Determinar la concentración de especies de arsénico inorgánico en leche cruda bovina.
5. Determinar el factor de biotransferencia de especies de arsénico inorgánico en leche bovina cruda a través del agua de consumo en la zona de estudio.

2. ANTECEDENTES

2.1 Estudios de la determinación de metales en leche como indicadores de contaminación

La determinación de metales pesados en leche se ha realizado para evaluar la calidad y seguridad de este producto para su consumo humano [43-45]. Para estudiar la contaminación debido a la actividad industrial y su impacto en la calidad de la leche producida por ganado criado en zonas de riesgo, Patra y col (2008) determinaron las concentraciones de plomo, cadmio, cobre, cobalto, zinc y hierro en muestras de leche cruda procedente de zonas industriales en la India para determinar la correlación de metales tóxicos (Pb y Cd) y los elementos traza de la leche (Cu, Co, Zn y Fe). Las muestras fueron digeridas con ácido nítrico y perclórico 4:1 (v/v), y la determinación analítica se llevó a cabo por espectrometría de absorción atómica (AAS). La concentración de plomo y cadmio en leche de vacas criadas alrededor de plantas de fundición y fabricación de acero fue $0.85 \pm 0.11 \mu\text{g/mL}$ y $0.23 \pm 0.02 \mu\text{g/mL}$, respectivamente. La mayor concentración de plomo en leche se presentó en el grupo cercano a la planta de fundición. Mediante un análisis de correlación se estableció que los niveles de cadmio y plomo en leche aumentaron como resultado de la

exposición del ganado a ambientes contaminados y esto influyó en la composición de minerales esenciales en leche y afectó el valor nutricional de la misma [42].

Por otra parte, Bilandzic' y col (2011) determinaron la concentración de As, Cd, Cu, Hg y Pb en muestras de leche cruda procedentes de zonas rurales del sur y norte de Croacia. La zona norte es una zona más poblada y urbanizada comparada con la zona sur de Croacia. Las muestras se analizaron por AAS con horno de grafito. Previamente, las muestras se digirieron empleando ácido nítrico en microondas durante 15 min a 800 W. La concentración promedio de Pb en las zonas norte y sur fueron 58.7 y 36.2 $\mu\text{g/L}$, respectivamente; que superaron el nivel permisible para Pb de 20 $\mu\text{g/kg}$ (Comisión Europea, 2006). La concentración de arsénico fue entre 1-283 $\mu\text{g/L}$ en la región sur y 1019 $\mu\text{g/L}$ en la región norte, superando el nivel de arsénico permitido de 100 $\mu\text{g/kg}$ (Comisión Europea, 2006). En el caso de Cd y Hg fueron 1.76 y 1.59 $\mu\text{g/L}$ para la región norte y 3.4 $\mu\text{g/L}$ y 7.1 $\mu\text{g/L}$ para la sur. Se encontraron niveles de Cu similares en ambas regiones, 931.9 $\mu\text{g/L}$ 848.4 $\mu\text{g/L}$ para el norte y el sur, respectivamente [36].

En el noreste de España se determinó la concentración de elementos esenciales (Co, Cr, Cu, Fe, I, Mn, Mo, Ni, Se y Zn) y tóxicos (As, Cd, Hg y Pb) en leche de granjas orgánicas y convencionales, para el estudio se realizó una digestión ácida asistida por microondas empleando HNO_3 y H_2O_2 , y la determinación se realizó por ICP-MS. La concentración de elementos esenciales en la leche orgánica fue significativamente menor en comparación con las concentraciones encontradas en la leche de granja convencional. Las concentraciones de metales tóxicos en leche de granja orgánica y granja convencional fueron para As (ND-2.064 y ND-1.241), Cd (ND-2.345 y ND-

0.273) y Pb (ND-5.613 y ND-3.557) y no presentaron diferencias estadísticamente significativas entre los tipos de leche analizada [43].

Los estudios realizados en la India, Croacia y España claramente indican que el desarrollo de actividades industriales, el incremento en la población o mayor urbanización de la zona de estudio, está correlacionada con el incremento de las concentraciones de metales pesados en las muestras de leche.

En México también se ha realizado la evaluación de la concentración de metales en leche, como es el caso del estudio realizado por Solís y col. en 2008, quienes evaluaron las concentraciones de metales pesados en leche bovina de una zona cercana a la ciudad de México (Mixquiahuala, Valle del Mezquital) cuyo suelo agrícola ha sido irrigado con aguas residuales. Los metales analizados fueron Fe, Ni, Cu, Zn, Se y Pb, en muestras de leche cruda de ganado con alimento controlado y otro de libre pastoreo. Los investigadores encontraron que los niveles de los metales de estudio fueron bajos en leche, en comparación con las concentraciones de metales en suelo y pastizales, por lo que concluyeron que la transferencia a partir de esta fuente de contaminación es aparentemente baja [44].

2.2 Determinación de arsénico total en leche

Como ya es conocido, el arsénico presenta diferentes efectos en la salud humana por lo cual su análisis se ha extendido en diferentes alimentos entre ellos la leche con el fin de evaluar si representan una importante fuente de contaminación.

Sigrist y col. (2009) emplearon AAS con sistema de generación de hidruros (HG) para determinar arsénico en muestras de leche cruda de diferentes granjas y muestras de agua de pozos en una zona de Argentina; las muestras de leche fueron digeridas en mufla usando $Mg(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$. El contenido de arsénico total en agua estuvo en el rango de 29.8 y 307.6 $\mu g/L$. La concentración de arsénico total en leche estuvo por debajo del límite de cuantificación del método propuesto, con excepción de una muestra, que también presentó la mayor concentración de arsénico en agua de consumo [45].

En México, por otro lado, la metodología para la determinación de arsénico en leche se encuentra estandarizada y establecida por la Norma Oficial Mexicana NOM-184-SSA1-2002, y consiste en la digestión ácida asistida por microondas de la muestra y la determinación de As por AAS, así mismo, el límite permisible de As total en leche establecido es de 200 $\mu g/kg$, el cual es superior al valor recomendada por países de la Comunidad Europea (100 $\mu g/kg$ Comisión Europea, 2006) [46-48].

El desarrollo de métodos más simples y rápidos para la determinación de arsénico en leche continúa siendo objeto de estudio, como el estudio de Cava y col (2004), que propusieron un método para la determinación de As, Sb, Se, Te y Bi en muestras de leche pasteurizada utilizando la espectroscopia de fluorescencia atómica con sistema de generación de hidruros (HG-AFS) para la determinación del contenido total presentando un límite de detección de 2.5 ng/L para As; para la digestión asistida por ultrasonidos de las muestras de leche se utilizó agua regia, antiespumante y cloruro de hidroxilamina. El método propuesto fue simple, rápido y requiere un volumen mínimo de muestra (1 mL). La concentración de arsénico total reportada en las

muestras de leche pasteurizada de supermercados españoles fue entre 3.2 ± 0.3 y 11.3 ± 0.2 ng/g [48].

La Comunidad Europea establece límites permisibles muy bajos en la leche de metales como el arsénico y plomo, por lo cual se requiere utilizar técnicas sensibles con ICP-MS, como en el estudio reportado por D'Illio (2008), que empleó ICP-MS combinado con celda de reacción dinámico (DRC), para determinar arsénico, cadmio, cromo y el plomo en la leche bovina que previamente fue tratada mediante digestión ácida (HNO_3) asistida por microondas. El método fue evaluado con diferentes parámetros como estudios de recuperación, límites de detección y cuantificación y rango de linealidad. Los resultados obtenidos para el límite de detección (LOD) y límite de cuantificación (LOQ) en $\mu\text{g}/\text{kg}$ fueron, respectivamente As, 3.1 y 9.5; Cd, 0.08 y 0.24; Cr, 0.229 y 0.693; y Pb, 0.5 y 1.5. Los porcentaje de recuperación de los metales de estudio fueron los siguientes As 91%; Cd 96%; Cr 99%; y Pb, 95 [49].

En los estudios anteriores, las técnicas analíticas empleadas para la determinación de arsénico total fueron AAS/HG, AFS/HG e ICP-MS, siendo AFS e ICP-MS, las que presentan sensibilidad comparable (aproximadamente 3.0 ng/L). La ventaja del uso de ICP-MS es que es una técnica multielemental que presenta un rango lineal de varias órdenes de magnitud, siendo así una de las técnicas de elección para la determinación de metales pesados en leche [50].

2.3 Especiación de arsénico en leche

En el caso de las metodologías analíticas para la determinación de especies de arsénico en leche hay poca información reportada en los últimos años, por lo cual, surge el interés de desarrollar un método eficaz para determinar las formas de arsénico en este alimento debido a la diferencia en el grado de toxicidad de las especies de arsénico.

Cava y col. (2003) desarrollaron de una metodología rápida y sensible para determinar las especies inorgánicas de arsénico y antimonio (As (III), As (V), Sb (III) y Sb (V)), usando AFS/HG. La determinación fue de forma indirecta, empleando agua regia y antiespumante para la extracción asistida por ultrasonidos del arsénico inorgánico, seguido de la determinación por HG-AFS. Las muestras de leche comercial de diferente composición y origen presentaron concentraciones de arsénico total de 3.5 a 13.6 ng/g y de antimonio total de 4.9 a 11.8 ng/g, la concentración de As (V) y Sb (V) en las muestras analizadas fue equivalente a 62 ± 5 y $73\pm 5\%$, respectivamente [37].

Un estudio muy completo lo realizaron Datta y col. (2010) para determinar la concentración de arsénico total y sus especies en muestras de leche, heces y pelo de ganado bovino, productos lácteos elaborados con leche bovina y en muestras de agua y forraje de la zona de Bengal Occidental, India. Para la determinación de As total, las muestras fueron digeridas con ácido nítrico al 70%. Para la especiación en leche, a la muestra se le adicionó ácido fórmico para precipitar proteínas y al sobrenadante se le agregó una mezcla de metanol y agua (1:1) y se mantuvo en ultrasonidos a 60 °C por 3 h. La determinación de especies de arsénico se llevó a

cabo por AAS usando cartuchos de intercambio iónico para separar las fracciones de As (III) y As (V). Se encontraron concentraciones altas de arsénico total en leche (21 µg/L), heces (36.2 µg/L), pelo de ganado (158.8 µg/L), agua (47 µg/L) y forraje (75.8 µg/L). El estudio de especiación reveló que As (III) se eliminó principalmente a través de la leche (52% del arsénico total en leche), mientras que las formas orgánicas de As se excretaron principalmente a través de heces [51].

También se han determinado las concentraciones de especies de As en fórmulas lácteas y comidas infantiles, las muestras fueron adquiridas en supermercados de la región de Hanover, EE.UU. (Estados Unidos de América). La extracción de especies de As en leche fue asistida por microondas a 95°C por 30 min empleando HNO₃ al 1%. Las muestras se analizaron por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (HPLC) acoplado a ICP-MS empleando una columna de intercambio aniónico. Las fórmulas lácteas presentaron concentraciones de arsénico total de 2.02 a 12.06 ng/g. Con respecto a las especies de arsénico en fórmulas lácteas fueron exclusivamente inorgánicas y predominantemente arsénico (V) [38].

Con el fin de evaluar la exposición de niños a arsénico a través de la leche materna, en una zona con alta prevalencia de agua contaminada por arsénico (Bangladesh), Fångström y col. (2008) realizaron la especiación de arsénico en leche materna y orina de lactantes de 3 meses de edad. Para la extracción de especies de arsénico se agregó ácido fórmico para precipitar las proteínas, después se centrifugaron para separar las grasas, proteínas y el suero. Posteriormente el sobrenadante se analizó por HPLC con una columna de intercambio aniónico y determinación por ICP-MS. Los

resultados mostraron concentraciones de arsénico en leche materna de 0.25 a 19 $\mu\text{g}/\text{kg}$. La forma mayoritaria de arsénico en la leche fue inorgánica [52].

En un estudio de Meharg y col (2008), determinaron la concentración de especies inorgánicas de arsénico en muestras de leche de arroz. Para el análisis de especiación, a la muestra de leche de arroz se le adicionó hexano para eliminar la grasa, se le agregó 1% de HNO_3 para precipitar las proteínas y luego se filtró. El sobrenadante se analizó por HPLC utilizando una columna de intercambio aniónico y la determinación por ICP-MS. La concentración de As total en leche de arroz fue 3 veces mayor que el límite establecido en agua de consumo (10 $\mu\text{g}/\text{L}$, Regulation EC No 596/2009 of the European Parliament) y las especies de arsénico fueron principalmente en su forma inorgánica (80%) con respecto al contenido de arsénico total [40].

En otros alimentos como suplementos alimenticios infantiles y prenatales de origen vegetal se ha realizado la especiación de arsénico evaluando diferentes agentes extractantes. Para el proceso de extracción se tomaron 0.25 g de muestra y se le adicionó 5 mL de agente extractante, para el caso de la extracción con enzimas (amilasa y proteasa) se llevó a cabo a 37°C durante 40 min, para la extracción con metanol y agua a 50°C durante 30 min y el resto de los extractantes agua, HCl 0.06 M y H_2O_2 3%, ácido de tetrametilamonio al 5%, ácido trifluoroacético 0.2 M, y oxalato de amonio 0.2 M se realizó la extracción asistida por microondas durante 30 min a 90°C. La cuantificación de arsénico total se realizó por ICP-MS y la especiación mediante IC-ICP-MS. Las mejores condiciones de extracción fueron empleando H_3PO_4 0.3 M obteniendo un porcentaje de extracción del 92% con un porcentaje mínimo de

interconversión de especies, se recuperó del 83 al 109% de la concentración inicial de As (III), As (V) y DMA [41].

En cuanto a los estudios de especiación de arsénico en leche se ha llevado a cabo de manera indirecta empleando cartuchos de intercambio iónico para extracción y determinación por AFS o AAS, o por HPLC/ICP-MS empleando una columna de intercambio iónica. La cromatografía de intercambio iónico es la forma más ampliamente utilizada para la especiación de arsénico [53]. Según los estudios anteriores, las especies predominantes de arsénico en muestras lácteas fueron las formas inorgánicas que presentan mayor grado de toxicidad e interés sanitario con 80 % con respecto al arsénico total para leche bovina. Pero no existe un procedimiento estandarizado para el tratamiento de la muestra para la especiación en este tipo de matriz, considerando su grado de complejidad por contener grasas, proteínas, minerales, etc. [38, 39]. Así, en el presente trabajo además de la determinación del contenido total de metales en leche se llevó a cabo la implementación de un método de extracción para determinar las especies de arsénico en leche.

2.4 Estudios relacionados con el factor de biotransferencia (FBT)

En algunos estudios se ha determinado el factor de biotransferencia cuantificando la concentración de metales en agua o alimento que consume el ganado y en la leche que producen, sin embargo, para el caso del FBT para As total solo se han realizado dos estudios a nivel mundial.

Steven (1991) realizó una revisión bibliográfica sobre la determinación del factor de biotransferencia de 6 metales y metaloides, incluyendo arsénico (4.6×10^{-5} a $5.7 \cdot 10 \times 10^{-4}$ días/L), cadmio, cromo, plomo, mercurio y níquel; el análisis reveló que metales como plomo y arsénico presentaron mayor biotransferencia a la leche, seguido por cromo, mercurio y cadmio [26]. En un estudio realizado por Pérez y col. determinaron las concentraciones de As en agua de consumo animal, suelo, forraje y leche en establecimientos lecheros del sudeste de la provincia de Córdoba, Argentina. Los niveles de As determinados en agua de consumo, en particular en aquellos establecimientos que extraían el agua de la capa freática, sugerían la posibilidad de transferencia de As a la leche bovina. La concentración de As en las muestras de agua provenientes de la capa freática estuvo entre 61.5 y 4550 $\mu\text{g/L}$, mientras que en el agua proveniente de pozos estuvo en el intervalo entre 10 y 189 $\mu\text{g/L}$. Los niveles de As en suelo y forraje estuvieron dentro de los rangos de concentraciones normales. En las muestras de leche, la concentración estuvo entre 0.21 y 10.6 ng/g. Los resultados obtenidos permitieron estimar el FBT de As a leche bovina a partir de la ingesta de este elemento por parte de los animales, se estableció en un rango de 1.5×10^{-5} a 2.6×10^{-6} días/L tomando en consideración únicamente la ingesta de arsénico a través de agua, como la principal fuente de exposición a arsénico [25].

Rosas y col. determinaron los niveles de arsénico en agua de pozo, muestras de suelo, forraje y leche bovina que fueron obtenidas de la zona de la Comarca Lagunera ubicada en Coahuila y Durango, México donde se presenta una alta producción de leche. La concentración de arsénico inorgánico total en agua de pozo estuvo entre 7 y 740 $\mu\text{g/L}$, y aproximadamente el 90% del arsénico total se encontró

en forma de As (V). En el caso de las muestras de suelo agrícola el contenido de arsénico fue hasta 30 µg/g, sin embargo, el arsénico extraíble no fue mayor al 12 % del As total. En la alfalfa, el arsénico total varió de 0.24 hasta 3.16 µg/g. La concentración de arsénico presente en leche estuvo en un rango de <0.9 a 27.4 ng/g. El factor de biotransferencia fue de 6×10^{-4} días/L relacionándolo con la cantidad de ingesta principalmente a través del agua de consumo [21].

3. METODOLOGÍA

3.1 Obtención de la muestra

3.1.1 Muestreo

Las muestras de leche y agua se colectaron en 3 estados de la República Mexicana con antecedentes de contaminación por arsénico en el agua de consumo y con actividad minera.

Se seleccionaron como mínimo 3 organismos de cada estable, los organismos fueron de la raza lechera *Holstein freisian* que es la más común en México.

Las muestras de agua fueron tomadas directamente de lo que consume el ganado y la leche cruda fue recolectada durante el proceso de ordeña diaria acostumbrada en cada zona.

Las muestras de leche se recolectaron en recipientes de boca ancha de polietileno estéril (Megalab), de cada organismo se tomaron 200 mL. Para el agua de consumo se procedió de manera similar tomando 200 mL.

3.1.2 Pretratamiento y conservación de la muestra

Las muestras de agua fueron filtradas empleando unidades de filtración de 0.45 μm , PVDF, 33 mm (Millipore) y refrigeradas a 4°C hasta su posterior análisis.

En el caso de las muestras de leche se tomaron 20 mL en un tubo de polipropileno de 50 mL (Corning), se congelaron a -20°C y después se liofilizaron a -54 °C durante 96 h (ModulyoD-115, Thermo Scientific).

3.2 Determinación de metales pesados en agua y leche cruda

3.2.1 Materiales y reactivos

Ácido nítrico, HNO_3 , Grado ultratrazo, (Fisher scientific)

Peróxido de hidrógeno, H_2O_2 , Grado ultratrazo, (Fisher scientific)

Tubos de polipropileno 50 mL, (Corning)

Estándar de arsénico, As_2O_3 , 1000 mg/L, (Sigma Aldrich)

Estándar de hierro, $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$, 1000 mg/L, (Fisher scientific)

Estándar de cadmio, Cd, 1000 mg/L, (Fisher scientific)

Estándar de plomo, $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$, 1000 mg/L, (Fisher scientific)

Estándar de cobre, $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$, 1000 mg/L, (Fisher scientific)

Estándar de zinc, ZnO, 1000 mg/L, (Fisher scientific)

Solución estándar SmartTune para ELAN/DRC-e que contiene Mg, Cu, Rh, Cd, In,

Ba, Ce, Pb y U (10 $\mu\text{g/L}$) en 1% de HNO_3 , (Perkin-Elmer)

3.2.2 Equipo

Balanza analítica, (TP-214, Denver instruments)

Horno de microondas, (MARS 6, CEM)

Centrífuga, (ST 16, Thermo scientific)

Campana de humos (CH 110, Prendo)

Espectrómetro de masas con fuente de plasma acoplado inductivamente ICP-MS, (ELAN DRC – e, Perkin-Elmer SCIEX) con los siguientes componentes (Tabla 5).

Tabla 5. Componentes del equipo ICP-MS

Nebulizador:	Meinhard
Cámara (spray):	Ciclónica
Interfase:	conos Pt
Analizador de	Cuadrupolo

3.2.3 Calibración

Se preparó una curva de calibración multielemental con los estándares de arsénico, cadmio, cobre, hierro, plomo y zinc, el rango de trabajo fue de 0-200 µg/L, se consideró el coeficiente de correlación para asegurar la linealidad, además se calcularon los límites de detección (LD) y cuantificación (LQ) con base en las fórmulas descritas por la ICH, 2005 [54] de acuerdo a las ecuaciones 1 y 2 que se describen a continuación:

$$LD = s \times \frac{3.3}{b} \quad (\text{Ec. 1})$$

$$LQ = s \times \frac{10}{b} \quad (\text{Ec. 2})$$

Donde:

b = Pendiente de la curva de calibración

s = Desviación estándar de lectura de 10 blancos

3.3 Procedimiento analítico

3.3.1 Digestión total

Se pesaron 0.5 g de muestra de leche liofilizada que se colocó en un vaso de teflón para microondas, se le adicionó 3 mL de ácido nítrico concentrado y 2 mL de peróxido de hidrógeno y se sometió al procedimiento de digestión asistida por microondas (Tabla 6). Cada muestra se analizó por triplicado y se midió un blanco reactivo.

Tabla 6. Programa de digestión empleado para las muestras de leche

Etapa	Temperatura (°C)	Tiempo (min)
Pre-digestión	20	15
Rampa de calentamiento	temperatura ambiente a 210	20
Digestión	210	10
Enfriamiento	210 a temperatura ambiente	30

3.3.2 Cuantificación

Las muestras de los digeridos de la leche y el agua filtrada se analizaron en ICP-MS empleando las siguientes condiciones de operación del equipo (Tabla 7).

Tabla 7. Condiciones de operación del ICP-MS

Poder RF (kW):	1.35
Flujo del nebulizador (L/min):	0.95
Flujo del plasma (L/min):	16
Flujo gas auxiliar (L/min):	1.2
Voltaje de lentes (V):	8.75
Isótopos monitorizados:	⁷⁵ As, ²⁰⁶ Pb, ¹¹¹ Cd,

Previamente al análisis mediante ICP-MS, se ajustó el equipo a la máxima sensibilidad empleando la solución estándar SmartTune para ELAN/DRC-e (N8125040, Perkin-Elmer) y posteriormente se procedió a la determinación de los metales de estudio en las muestras.

3.4 Validación del método analítico para la determinación de metales pesados en muestras de leche

Se llevó a cabo mediante el empleo de un material de referencia certificado al cual se realizó el procedimiento de digestión ya descrito para las muestras de leche. El material de referencia que se analizó fue el ERM-BD151, LGC-standards (material de referencia certificado para metales pesados en leche en polvo, Tabla 8).

Tabla 8. Valores certificados de metales pesados en el material de referencia certificado (ERM-BD151, LGC-standards, leche en polvo)

ERM-BD151	
Elemento	Valor certificado [mg/kg]
Cd	0.106±0.013*
Cu	0.29±0.03*
Pb	0.207±0.014*

* Incertidumbre K=2 y nivel de confianza del 95%, ISO/IEC Guide 98-3

Este material de referencia no se encuentra certificado para arsénico, por lo cual en el caso de la validación para la metodología de análisis de As se realizó mediante estudios de recuperación, utilizando una muestra de leche cruda comercial liofilizada (0.5 g) enriquecidas con 50 µg/L As₂O₃ (Sigma Aldrich).

3.5 Cálculo del factor de biotransferencia de arsénico total en leche bovina

El parámetro que se empleó para calcular la biotransferencia de arsénico en leche bovina cruda es el FBT determinado a partir de la ecuación 3 descrita por Steven's que considera como principal fuente de contaminación el agua de consumo [23, 26].

$$BTF \left(\frac{\text{días}}{L} \right) = \frac{\text{Concentración de As en leche (mg/L)}}{\text{Promedio de la ingesta diaria de As del espécimen (mg/día)}} \quad (\text{Ec. 3})$$

Calculando para la ingesta diaria de As: concentración de As en agua y un consumo de 65 L de agua por el organismo/día (este consumo se estandariza para organismos de 500 kg de peso).

3.6 Extracción de especies de arsénico

Para la selección del método de extracción primeramente se evaluaron los procedimientos de extracción descritos en la tabla 9 y se seleccionó aquel que presentó el mayor porcentaje de As extraído frente a la concentración total de arsénico en leche.

Tabla 9. Procedimientos de extracción evaluados

Agente extractante	Procedimiento	Referencia
Ácido nítrico 0.5%	0.25 g de muestra de leche enriquecida* y 5 mL de ácido nítrico al 0.5 %. Digestión en microondas durante 30 min a 90°C.	[39]
Ácido trifluoroacético 0.2 M	0.25 g de muestra de leche enriquecida* y 5 mL de ácido trifluoroacético 0.2 M. Digestión en microondas durante 30 min a 90°C.	[41]
Ácido fosfórico 0.3 M	0.25 g de muestra de leche enriquecida* y 5 mL de ácido fosfórico 0.3 M. Digestión en microondas durante 30 min a 90°C	[41]

* La muestra de leche cruda liofilizada comercial se enriqueció con 500 µg/L As₂O₃, y posteriormente se procedió a realizar la extracción.

3.7 Determinación de especies inorgánicas en muestras de leche cruda bovina

3.7.1 Materiales y reactivos

Strata® SAX (55 µm, 70 Å), 200 mg/3 mL, Phenomenex

Solución estándar de arsenito, óxido de arsénico (III), grado ACS, 100 mg/L, Sigma Aldrich

Solución estándar de arsenato de sodio dibásico heptahidratado, grado ACS, 100 mg/L, Sigma Aldrich

Jeringas de plástico de 3 mL

Tubos de polipropileno 15 mL, Corning

Agua nanopura

Ácido nítrico, HNO₃, Grado ultratrazo, Fisher scientific

Metanol, Grado HPLC, Fisher scientific

3.7.2 Evaluación del procedimiento de preconcentración

El procedimiento empleado para la preconcentración de las especies de As (III) y As (V) fue modificado del trabajo descrito por O'Reilly [55]. Previamente, la columna Strata® SAX fue acondicionada con 6 mL de metanol y agua (1:1). Se prepararon muestras de agua enriquecidas con 25 µg/mL de arsenito y arsenato, respectivamente. Posteriormente, se hicieron pasar 20 mL de esta solución por la columna Strata® SAX, se recuperó el arsenito (20 mL) y se pasaron 5 mL de ácido nítrico 0.1 M para eluir As (V). Una vez evaluado el porcentaje de recuperación de las especies de As (III) y As (V), el procedimiento se aplicó a muestras de leche liofilizadas enriquecidas con las especies de arsenito y arsenato (25 µg/L) para evaluar la recuperación de estas especies de la muestra real, y finalmente, el procedimiento fue aplicado a las muestras problema. Todas las pruebas se realizaron por triplicado.

3.8 Correlación de metales analizados en leche bovina cruda

Para determinar la correlación de los metales evaluados (As, Cd, Cu, Fe, Pb y Zn) en leche bovina cruda y para el caso del As también en agua, se utilizó el coeficiente de correlación de Pearson para un intervalo de confianza del 95%, empleando el programa estadístico Minitab 16.

4. RESULTADOS

4.1 Obtención de la muestras

Se muestrearon 7 zonas mineras de los 3 estados de estudio y se obtuvo un total de 32 muestras de leche y 7 muestras de agua de consumo para ganado (Tabla 10).

Tabla 10. Zonas de muestreo para la evaluación de la contaminación de As en leche

Zona	Coordenadas	Clave	No. de muestras (leche)	No. de muestras (agua)
DURANGO				
Carlos Real	N 24° 17.523', W 104°27.739'	CR	5	1
Colonia Hidalgo	N 24° 09.318', W 104°35.316'	CH	4	1
Ejido "Arenal"	N 24° 02.184', W 104°23.196'	EA	5	1
Labor de Guadalupe	N 24° 11.324', W 104°35.122'	LG	5	1
SAN LUIS POTOSÍ				
Cerrito Blanco	N 23° 40', W 100° 35'	CB	3	1
ZACATECAS				
Guadalupe	N 22° 43.102', W 102°28.284'	G	5	1
Rincón de Romos	N 22° 43.910', W 102°28.75'	RR	5	1

Las muestras de estudio se colectaron en las zonas mineras (Figura 3).

a)



- 1** Pueblo Nuevo: Ejido Arenal
- 2** Durango: Labor de Gpe, Colonia Hidalgo y Carlos Real

b)



- 1** Zacatecas: Guadalupe y Rincón de Romos

c)



Figura 3. Regiones mineras de Durango (a), Zacatecas (b) y San Luis Potosí (c)

4.2 Parámetros analíticos para la determinación de metales en leche por ICP-MS

Los parámetros analíticos para la determinación de As, Pb, Cd, Cu, Zn y Fe por ICP-MS se muestran en la Tabla 11.

4.2.1 Metales esenciales

Para el caso de la determinación de Cu, Zn y Fe, el rango de trabajo fue de 0-200 µg/L. Los coeficientes de correlación obtenidos fueron superiores o iguales a 0.9990, lo que muestra la linealidad del método. En el caso del Zn y Fe los límites de detección fueron mayores que para los otros metales de estudio. El ICP-MS (ELAN DRC-e, Perkin-Elmer SCIEX) empleado en este estudio tiene un detector de tipo cuadrupolo. Para la determinación de elementos como arsénico, selenio, cromo, hierro y níquel empleando detección por ICP-MS de tipo cuadrupolo se han reportado interferencias poliatómicas generadas por componentes naturales de la muestra y/o provenientes del proceso de preparación de la misma, los cuales pueden incrementar el límite de detección. Para la determinación del Fe se empleó para el análisis el isótopo ^{57}Fe , donde las interferencias más comunes observadas son $^{40}\text{Ar}^{16}\text{OH}^+$, $^{40}\text{Ca}^{16}\text{OH}^+$ [56].

4.2.2 Metales pesados

Los rangos de trabajo para la determinación de As, Pb y Cd fueron de 0 a 200 µg/L, y presentaron buena linealidad con base en los coeficientes de correlación que fueron mayores a 0.9990.

Tabla 11. Parámetros analíticos para la determinación de metales mediante ICP-MS

Isótopo	Rango de trabajo (µg/L)	Ecuación de la recta	Coefficiente de correlación	LOD (µg/L)	LOQ (µg/L)
⁷⁵ As	0-200	$y = 2045.1[\text{As}] - 1418.4$	0.9997	0.02	0.06
²⁰⁶ Pb	0-200	$y = 8307.3[\text{Pb}] - 7652.5$	0.9995	0.05	0.17
¹¹¹ Cd	0-200	$y = 2574.1[\text{Cd}] - 1665.3$	1.0000	0.01	0.04
⁶³ Cu	0-200	$y = 8070.2[\text{Cu}] + 5733.6$	0.9998	0.54	1.79
⁶⁴ Zn	0-200	$y = 1038.5[\text{Zn}] + 5692.1$	0.9995	1.67	5.58
⁵⁷ Fe	0-200	$y = 547.38[\text{Fe}] + 3319$	0.9979	6.29	20.96

4.3 Validación del método analítico para la determinación de metales pesados en muestras de leche

En primera instancia se empleó la técnica de fluorescencia atómica con sistema de generación de hidruros (AFS/HG) como método analítico para la determinación de arsénico total. Esta técnica analítica mostró un límite de detección de 0.14 µg/L el cual es comparable con el límite de detección alcanzado con la técnica de ICP-MS, además de que es una técnica de bajo costo y fácil operación, se evaluaron diferentes métodos de digestión por microondas que se presentan en la tabla 12,

donde se emplearon relaciones de volúmenes de HNO₃, H₂O₂ y HCl, así como tiempos y temperaturas para digerir las muestras de leche enriquecidas en las que se determinó el porcentaje de recuperación de arsénico total.

Tabla 12. Procedimientos de digestión empleados para determinar As total por AFS/HG

<i>Cantidad de muestra</i>	<i>Relación de reactivos empleados</i>	<i>Programa microondas</i>	<i>Porcentaje de recuperación (%)</i>
0.20 g	HCl = 3.5 mL HNO ₃ = 1.5 mL H ₂ O ₂ = 1 mL	Pre-digestión: 15 min 10 min de T _{amb} - 200 °C 25 min a 200 °C	57±8
0.25 g	HCl = 3.5 mL HNO ₃ = 1.5 mL H ₂ O ₂ = 1 mL	Pre-digestión: 15 min 10 min de T _{amb} - 200 °C 25 min a 200 °C	60±5
0.50 g	HCl = 4 mL HNO ₃ = 2 mL H ₂ O ₂ = 1 mL	Pre-digestión: 10 min 20 min de T _{amb} - 210 °C 25 min a 210 °C	78±9
1.00 g	HCl = 5 mL H ₂ O ₂ = 1 mL	Pre-digestión: 15 min 10 min de T _{amb} - 200 °C Digestión: 25 min a 200 °C	Digestión incompleta

*Muestra de leche liofilizada enriquecida con 500 µg/L

Como se puede observar el mayor porcentaje de recuperación de As obtenido fue de 78±9%, cuando empleó mayor cantidad de ácido nítrico. Debido a la naturaleza de la muestra, que contiene una gran cantidad de ácidos grasos y proteínas, mayor contenido de ácido nítrico favorece la digestión de la muestra ya que es un oxidante fuerte y permite, por tanto, obtener un mayor porcentaje de recuperación de As; sin embargo, al emplear este método en las muestras reales donde la concentración de arsénico es menor y estar limitados por no exceder la cantidad de ácido nítrico que

suprime la señal para As en el equipo de AFS, los resultados no fueron satisfactorios, por lo cual se decidió llevar a cabo la cuantificación empleando la técnica de ICP-MS, cuya respuesta no se ve afectado por la cantidad de HNO₃ en la muestra y permitió así, utilizar mayor cantidad de ácido nítrico durante el proceso de digestión por microondas de las muestras alcanzando mayor destrucción de la materia orgánica de la leche y mejorando así el porcentaje de recuperación de As. Además el ICP-MS alcanza límites de detección comparables a los obtenidos por AFS/HG [50].

El procedimiento seleccionado para la digestión de las muestras de leche empleado fue el procedimiento EPA 3052 [57] ligeramente modificado que se describe en la sección 3.3.1. En la tabla 13 se muestran los resultados de recuperación con base en esta metodología empleando muestras de leche enriquecidas con 500 µg/L de As total. La cuantificación se llevó a cabo por ICP-MS. El porcentaje de recuperación de As total estuvo entre 100 y 109%. Estos resultados permitieron confirmar que la determinación de arsénico después de digestión ácida de las muestras proporciona resultados confiables.

Tabla 13. Porcentaje de recuperación de As total en leche cruda bovina empleando el método de digestión seleccionado

Concentración As añadido (µg/L)	Concentración As determinada por ICP-MS	% de recuperación de As total
500	523.1±22.2	100.2-109.1%

*Desviación estándar para n = 3

Además este método de digestión por microondas también fue aplicado para la determinación de metales pesados en un material de referencia (ERM-BD151, LGC-standards, leche en polvo) que está certificado para metales pesados de importancia ambiental cadmio, cobre y plomo; los resultados se muestran en la tabla 14. Como se puede observar no existe diferencia estadísticamente significativa entre los valores obtenidos y el valor certificado a un nivel de confianza del 95%, asegurándonos que el método empleado permite una correcta cuantificación de estos metales.

Una vez que el método para la determinación de As y metales pesados fue validado mediante estudios de recuperación y el análisis del material de referencia certificado, respectivamente, se procedió a analizar las muestras procedentes de las zonas de estudio.

Tabla 14. Determinación de Cu, Pb y Cd en el material de referencia certificado ERM-BD151 (leche en polvo LGC-standards).

Metal	Valor certificado (mg/kg)*	Concentración obtenida (mg/kg)*
Cu	5±0.23	4.72±0.23
Pb	0.207±0.014	0.22±0.04
Cd	0.106±0.013	0.084±0.004

*Intervalo de confianza ($\alpha = 0.05$)

4.4 Determinación de metales pesados en leche cruda

4.4.1 Plomo

La concentración promedio de plomo en leche cruda bovina en Durango, Zacatecas y San Luis Potosí fue de 3.41, 20.23 y 62.86 $\mu\text{g}/\text{kg}$, respectivamente (Tabla 15), siendo la concentración en el estado de San Luis Potosí la que superó el límite permisible establecido por la Comisión Europea que indica un valor de 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ [36]. En el municipio de Matehuala, donde se localiza la zona de estudio (Cerrito Blanco) se realizan principalmente actividades mineras donde se explota oro, plata y cobre; así la presencia de residuos de plomo se vincula directamente con la fundición primaria y secundaria de estos metales, lo que justifica su procedencia en la zona de crianza del ganado de donde se obtuvieron las muestras [58]. Para el caso de Zacatecas, tres organismos de los 10 muestreados superaron también el nivel permisible. Cabe resaltar que la zona muestreada de Guadalupe presenta una zona de descargas de residuos industriales que se le conoce como el Lago de "Saladillo", por lo que el agua de consumo podría ser una fuente importante de contaminación por este metal [59, 60].

Las concentraciones de Pb en leche bovina para las zonas de estudio se muestran en la Figura 4, los valores más altos se encuentran en Zacatecas (Río de Romos) y en San Luis Potosí (Cerrito Blanco). Las concentraciones de Pb en muestras de leche de las zonas de estudio fueron superiores a las reportadas para zonas donde no hay problemas de contaminación donde se describen concentraciones de plomo cercanos a 0.05 mg/L [34].

Tabla 15. Concentración promedio de Pb en leche bovina cruda para los estados de estudio

Zona	No. de muestras	Promedio (µg/kg)	Rango (µg/kg)
Durango	19	3.41	ND-6
Zacatecas	10	20.23	ND-41
San Luis Potosí	3	62.86	ND-64

*ND: no detectable

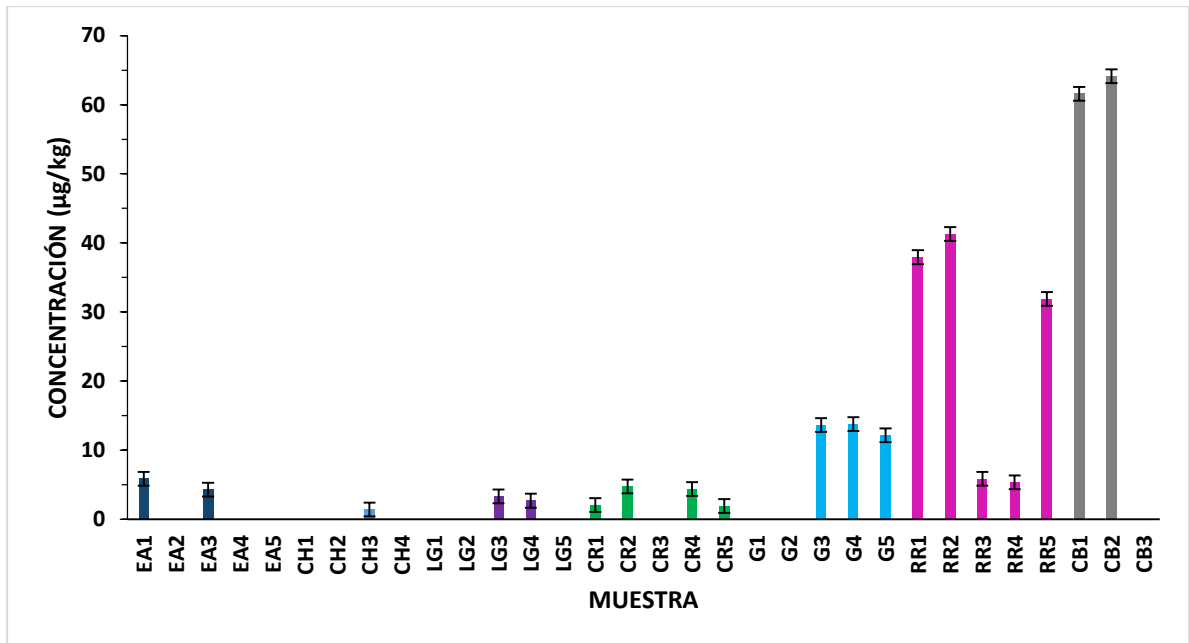


Figura 4. Concentración promedio de Pb en leche cruda bovina y su desviación estándar para n = 3

4.4.2 Cadmio

El cadmio al igual que el plomo es un metal muy tóxico y en la leche se encuentra normalmente en concentraciones bajas. Este metal se emplea en la fabricación de algunos pesticidas y fertilizantes por lo cual se presenta en constante contacto en establos cercanos a áreas de cultivo, de aquí una de las posibles fuentes de contaminación del ganado. El cadmio generalmente se encuentra como impureza en aleaciones de zinc, durante la ordeña y procesado de la leche puede contaminarse por esas aleaciones, logrando así el Cd unirse a los -SH de las proteínas del suero [33].

En la tabla 16 se muestran las concentraciones promedio de Cd de los tres estados Durango, Zacatecas y San Luis Potosí que fueron de 2.19, 2.88 y 27.84 µg/kg, respectivamente. Las concentraciones encontradas únicamente para el estado de San Luis Potosí superaron en 10 veces aproximadamente el valor reportado fue 1.2-5.0 µg/kg [61]. El cadmio se encuentra en aleaciones de zinc, plomo y cobre principalmente, siendo Matehuala uno de los municipios de San Luis Potosi donde se explotan metales como el oro, plata y cobre, por lo que la minería puede ser una fuente de contaminación, y se considera que el consumo de la leche producida en esa zona representa un riesgo muy importante para la salud [58].

Las concentraciones de Cd en leche bovina cruda de sitios de estudio se muestran en la Figura 5. Como puede verse en la zona de Cerrito Blanco en San Luis Potosí se encontraron las concentraciones más altas de Cd.

Tabla 16. Concentración promedio de Cd en leche bovina cruda para los estados evaluados

Zona	No. de muestras	Promedio (µg/kg)	Rango (µg/kg)
Durango	19	2.19	ND-4
Zacatecas	10	2.88	ND-5
San Luis Potosí	3	27.84	ND-28

*ND: no detectable

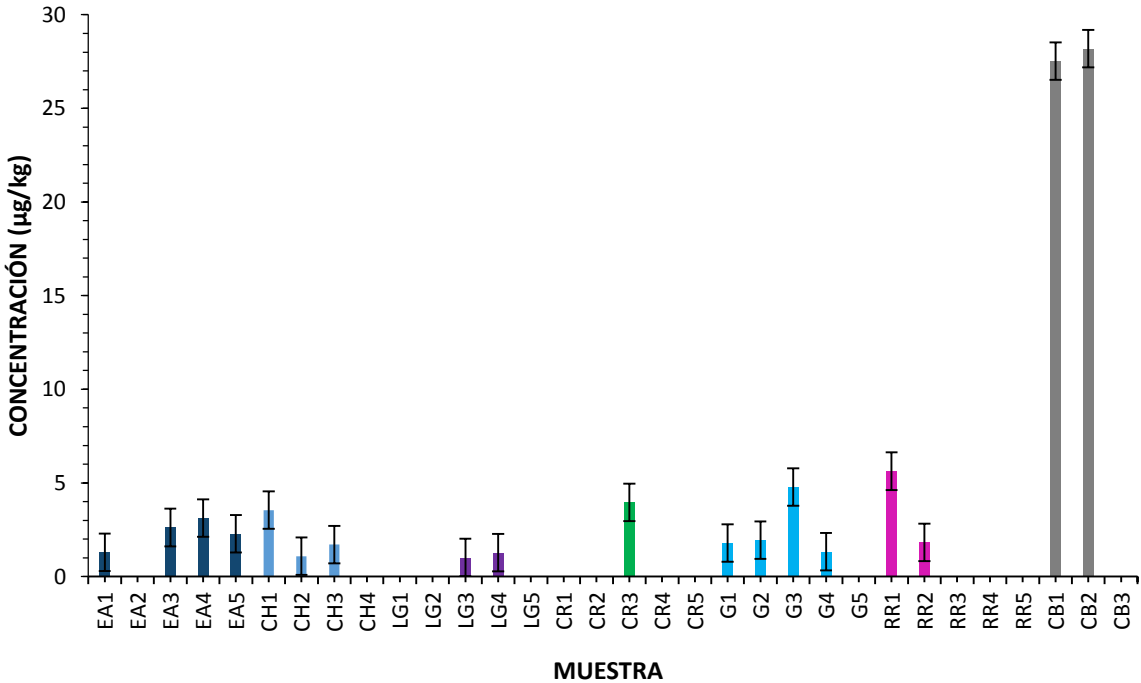


Figura 5. Concentración promedio de Cd en leche cruda bovina y su desviación estándar para n = 3

4.4.3 Zinc

El zinc es uno de los minerales esenciales importantes en la dieta humana y en leche bovina suele presentarse en concentraciones de 3.92 mg/L. Los valores promedio de concentración de zinc en este estudio se muestran en la Tabla 17. Las concentraciones promedio para el estado de Durango, Zacatecas y San Luis Potosí fueron 15.85, 9.66 y 10.63 mg/kg, respectivamente. En todos los estados el valor promedio superó el valor reportado de 3.24 mg/kg que fue encontrado en un estudio realizado en muestras de leche procedentes de Rumania [62]. Las concentraciones de Zn en las muestras de leche bovina cruda se muestran en la Figura 6. Los valores más altos se encontraron en el estado de Durango para zonas del Ejido del Arenal y la colonia Hidalgo, además de Rincón de Romos en Zacatecas, este último estado con explotación de zinc en yacimientos de vetas y cuerpos estratiformes por lo cual se justifica su presencia en el ambiente de cría de ganado analizado en el presente trabajo y que las concentraciones fueron superiores a valores previamente reportados en otros estudios que se encuentran entre 2 a 3.24 mg/kg [60, 62].

Tabla 17. Concentración promedio de Zn en leche bovina cruda para los estados evaluados

Zona	No. de muestras	promedio (mg/kg)	Rango (mg/kg)
Durango	19	15.85	ND-24
Zacatecas	10	9.66	3-22
San Luis Potosí	3	10.03	6-13

*ND: no detectable

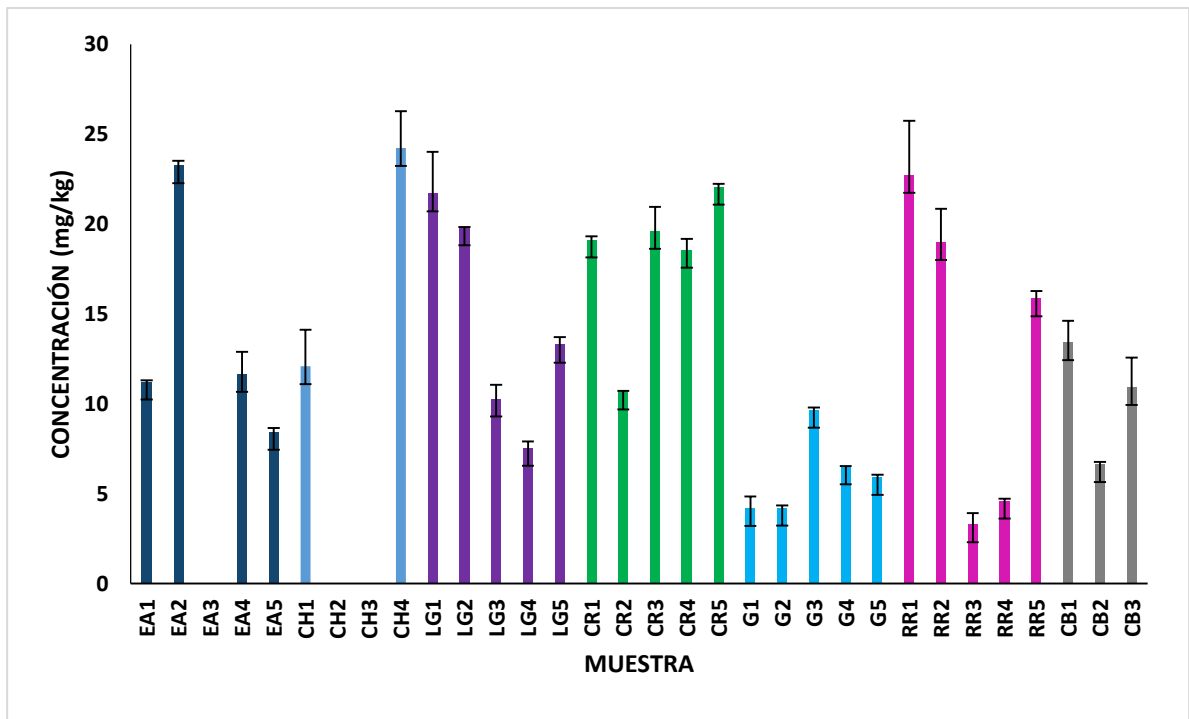


Figura 6. Concentraciones promedio de Zn en leche cruda bovina y su desviación estándar para n = 3

4.4.4 Hierro

El hierro es uno de los metales esenciales para el hombre. La concentración de hierro de 0.20-0.25 mg/kg fue encontrada en muestras de leche procedente de zonas donde no existen problemas de contaminación, y puede variar dependiendo de la raza de la vaca y etapa de lactación. A diferencia de los otros metales, la alimentación del ganado no influye en la concentración en este alimento [33]. La presencia de hierro en la leche es esencial no solo por la calidad nutricional además porque inhibe la oxidación de las grasas que dañan la calidad del alimento [63].

La concentración promedio de hierro en las muestras de leche de los tres estados analizados Durango, Zacatecas y San Luis Potosí fue de 16.7, 19.36 y 10.2 mg/kg, respectivamente; en todos los estados la media se encuentra por debajo de lo ya reportado en otros estudios de 21.73 mg/kg [62], sin embargo, para los casos de la colonia Carlos Real (Durango) y Rincón de Romos (Zacatecas), existen organismos que presentaron concentraciones que duplican el valor ya reportado (tabla 18).

En particular los estados de Durango y Zacatecas presentaron las mayores concentraciones de hierro (Figura 7), en estos estados se realizan actividades mineras principalmente en Cerro de Mercado, Río Chico (Carlos Real, Durango) en donde la pirita y el hierro son explotados [60, 64].

Tabla 18. Concentración promedio de Fe en leche bovina cruda por estado evaluado.

Zona	No. de muestras	Concentración promedio (mg/kg)	Rango (mg/kg)
Durango	19	16.7	6-43
Zacatecas	10	19.36	8-45
San Luis Potosí	3	10.2	6-15

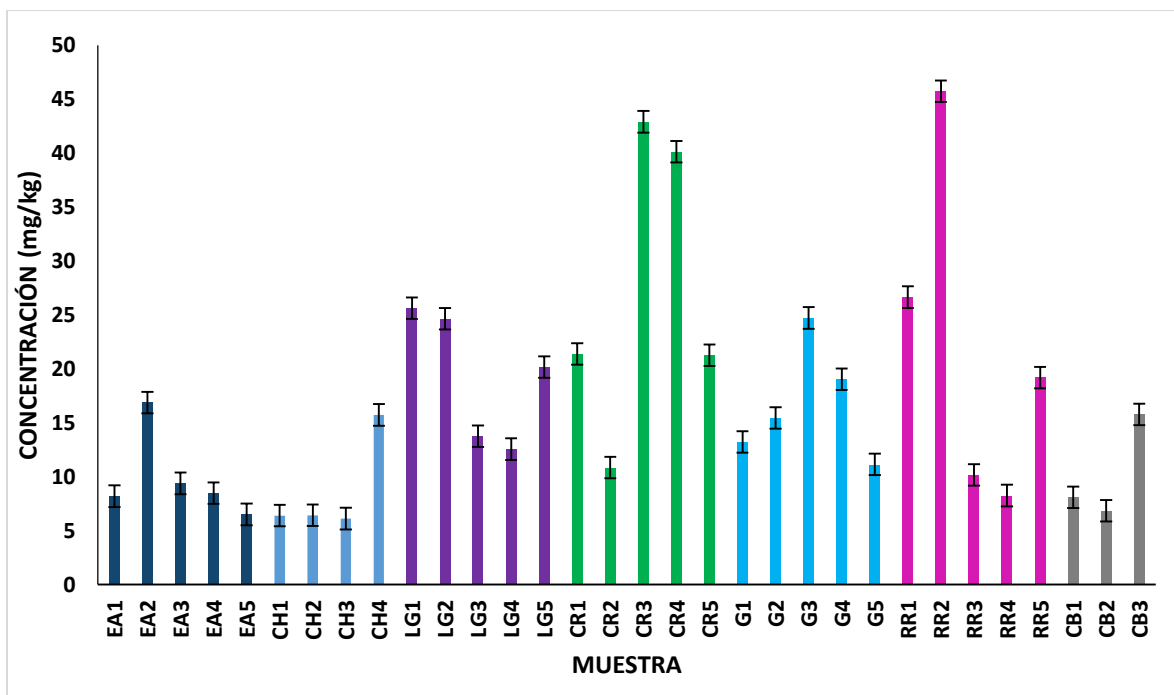


Figura 7. Concentraciones promedio de Fe en leche cruda bovina y su desviación estándar para n = 3

4.4.5 Cobre

De los estados evaluados, Zacatecas y San Luis Potosí en particular presentan vetas en las que se explota este mineral esencial, el cobre (Cu), por lo que la determinación de su concentración es importante para evaluar la calidad ambiental de las zonas de crianza del ganado y su análisis de riesgo para el consumidor [58, 60]. En general las zonas analizadas (Figura 8) superaron ampliamente el valor reportado por trabajos anteriores (1.98 $\mu\text{g}/\text{kg}$) [42]. Como se muestra en la Tabla 19, las concentraciones promedio en los tres estados Durango, Zacatecas y San Luis Potosí fueron de 131.34, 104.38 y 117.45 $\mu\text{g}/\text{kg}$, respectivamente; sin embargo, en estudios realizados en Corea por Khan y col. en 2014, reportaron la concentración de Cu de muestras de

leche fresca comercial de 383 $\mu\text{g}/\text{kg}$ [65], lo cual fue mayor a lo descrito en el presente estudio.

Tabla 19. Concentración promedio de Cu en leche bovina cruda por estado evaluado.

Zona	No. de muestras	Promedio ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Rango ($\mu\text{g}/\text{kg}$)
Durango	19	131.34	ND-329
Zacatecas	10	104.38	ND-167
San Luis Potosí	3	117.45	ND-201

*ND: no detectable

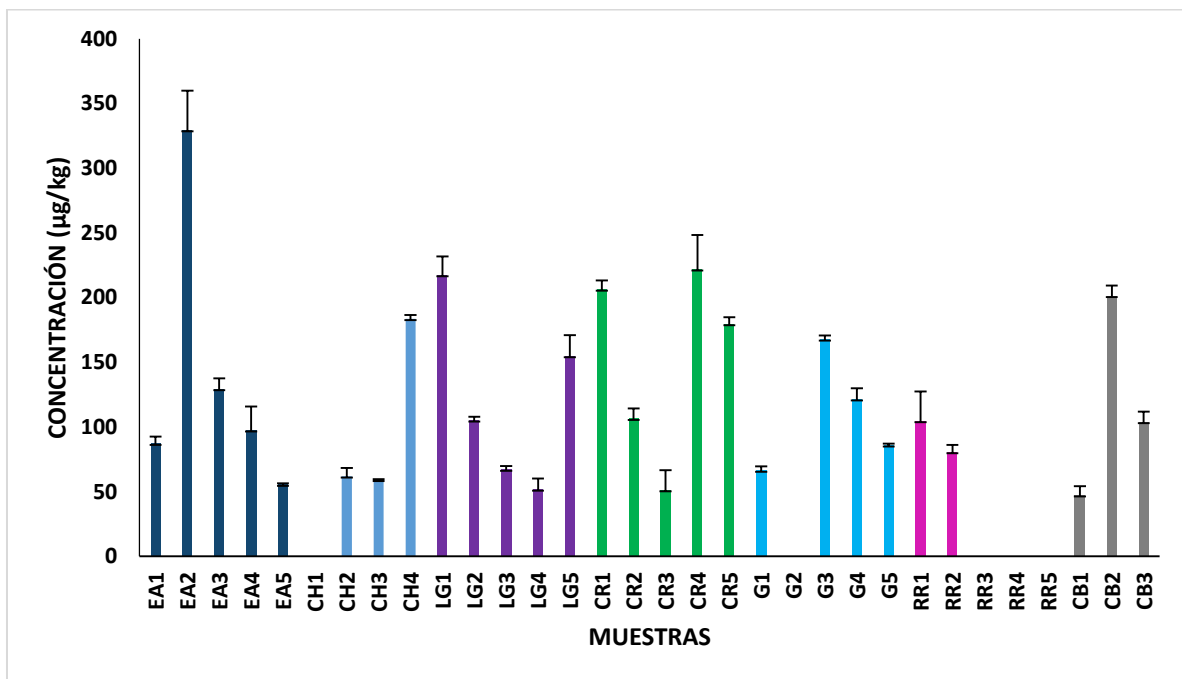


Figura 8. Concentración promedio de Cu en leche cruda bovina y su desviación estándar para $n = 3$

4.4.6 Arsénico

En diversas investigaciones se ha demostrado que la principal fuente de contaminación de la leche es a través del alimento y del agua consumidos por los organismos [21, 25]. La contaminación por arsénico del agua y alimentos a través de los cuales se incorpora este elemento a los organismos productores de leche puede provenir de diversas fuentes naturales y antropogénicas, destacándose entre ellas la minería. También se ha descrito que el uso inadecuado de raticidas, pinturas e insecticidas pueden contribuir a la contaminación por arsénico en la leche [66].

Los resultados obtenidos en este trabajo mostraron concentraciones promedio de arsénico en los tres estados Durango, Zacatecas y San Luis Potosí de 265.02, 184.64 y 288.82 $\mu\text{g}/\text{kg}$, respectivamente (Tabla 20). En todos los estados el valor promedio superó el límite permisible por la Comisión Europea de 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ [36] por lo cual se considera un alimento que no es apropiado para el consumo humano e indica que existe una fuente de contaminación importante por este metaloide en las zonas donde habita el ganado, siendo los tres estados con importancia en actividad minera. En Durango, en el ejido “Arenal”, que pertenece a la región minera de Pueblo Nuevo se lleva a cabo la explotación de oro (Au), plata (Ag), plomo (Pb) y zinc (Zn). Las otras zonas de estudio (labor de Guadalupe, colonia Hidalgo y Carlos Real) pertenecen a la región minera de Durango donde se explotan hierro (Fe) y pirita [64]. En el estado de San Luis Potosí, en la zona de estudio Cerrito Blanco los minerales Ag, Au y Cu son los principales metales extraídos [58]. Para el caso de Zacatecas, las zonas que fueron muestreadas del municipio de Guadalupe pertenecen a la zona minera de Zacatecas donde se extraen los metales de Ag, Pb, Zn, Cu y Cd [60] (Figura 3). Estas

actividades pueden incrementar la velocidad de liberación de arsénico a partir de sulfuros minerales porque los exponen a procesos de meteorización durante las tareas de excavación. En el caso de las zonas de estudio todas producen Au y Cu cuya fundición generan polvos de arsénico [58, 60, 64].

La concentración de As en leche bovina cruda se muestra en la Figura 9. Las concentraciones más altas se encuentran en Durango en las zonas del Ejido del Arenal y la colonia Carlos Real, seguida de Cerrito Blanco en San Luis Potosí. En este estudio encontramos valores superiores a los descritos por Fangstrom y col. en 2008 [52] que reportaron una concentración de 0.20 a 19 µg/kg en leche materna y también a los valores reportados por Meharg y col. [40] de 8 µg/L en leche de arroz, por lo cual se confirma el serio problema de contaminación en las zonas de estudio.

Tabla 20. Concentración promedio de As en leche bovina cruda por estado evaluado

Zona	No. de muestras	Promedio (µg/kg)	Rango (µg/kg)
Durango	19	265.02	53-472
Zacatecas	10	184.64	102-271
San Luis Potosí	3	288.82	241-338

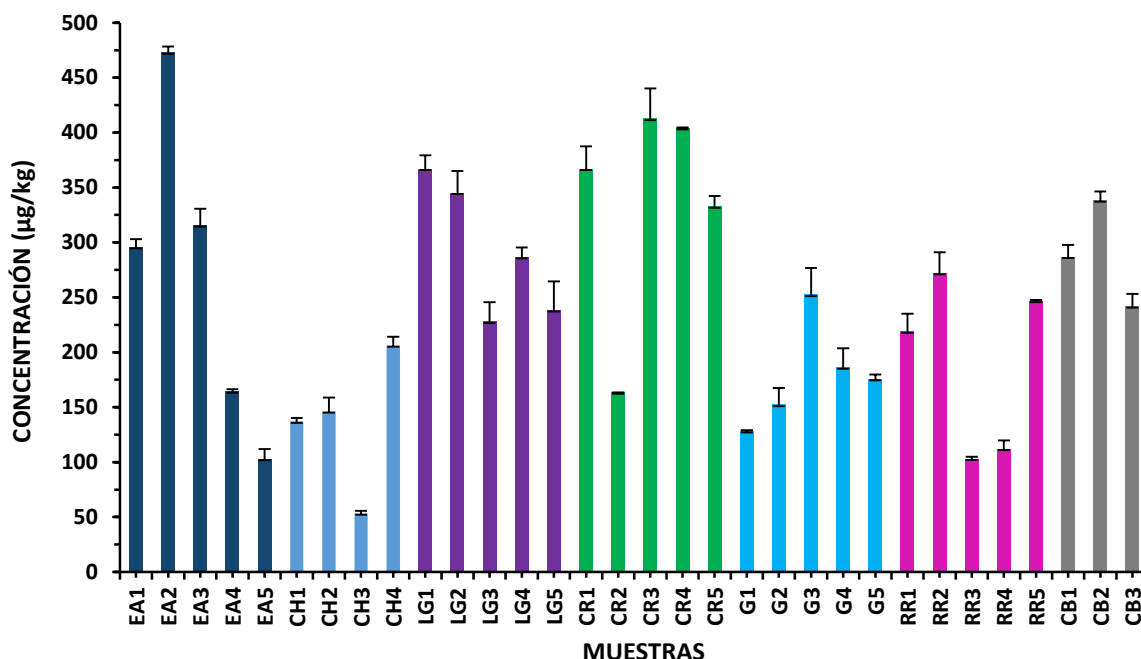


Figura 9. Concentraciones promedio de As en leche cruda bovina y su desviación estándar para n = 3

4.5 Extracción de especies de arsénico en leche

A continuación se procedió a realizar la especiación de As inorgánico en leche, para ello, preliminarmente se evaluaron 3 agentes extractantes ácido nítrico 0.5%, ácido trifluoroacético 0.2 M y ácido fosfórico 0.3 M, los cuales estaban reportados para la extracción de especies de arsénico en diferentes matrices de alimentos [39, 41], pero no para leche. Los resultados se muestran en la Tabla 21. El agente extractante que presentó mayor porcentaje de extracción fue el ácido fosfórico 0.3 M, presentando el 100% de recuperación. Con base en estudios realizados con muestras de suplementos alimenticios y prenatales, en donde se realizó la extracción de especies

de arsénico, de igual manera el ácido fosfórico fue el mejor agente extractante comparado con otros extractantes orgánicos, buffer, ácidos y enzimas. El mecanismo de acción del ácido fosfórico es actuar sobre los enlaces As-S, liberando las especies arsenicales debido a la similitud química entre el As y P, actuando el fósforo como desorbente que sustituye al As(V), y que se encuentra en la matriz de estudio [41].

Tabla 21. Porcentaje de extracción de As en muestras de leche

Agente extractante	Concentración As ($\mu\text{g/L}$)	% de recuperación
Ácido fosfórico 0.3 M	405.9 \pm 2.6	113.0
Ácido nítrico 0.5%	175.95 \pm 27.35	49.0
Ácido trifluoroacético 0.2 M	163.25 \pm 27.71	45.5

* Muestra de leche liofilizada enriquecida con 359 $\mu\text{g/L}$ As_2O_3

** Desviación estándar para n = 3

4.6 Validación de proceso de extracción y separación de especies inorgánicas de As

Primeramente, la evaluación de la separación de especies de As se realizó empleando una mezcla de estándares con las especies de As (III) y As (V) de 25 $\mu\text{g/L}$, a partir del cual se calculó el porcentaje de recuperación. En la Tabla 22 se muestran los resultados siendo para As (V) 97% y para As (III) 92%; teniendo un alto porcentaje de recuperación con las soluciones estándar, se procedió a aplicar el procedimiento de separación de especies de As en los extractos de leche cruda enriquecida con 25 $\mu\text{g/L}$ de las especies de As (III) y As (V) obtenidos empleando H_3PO_4 a 0.3 M obteniendo porcentajes de recuperación mostrados en la Tabla 23. El

porcentaje de recuperación para As (V) fue de 103% y para As (III) de 83%, siendo ese último valor más bajo que el que se presentó en las muestras de agua, sin embargo, el alto contenido de lípidos, proteínas así como otros minerales en la muestra de leche que pueden disminuir o afectar la recuperación de la especie de As (III) de la fase estacionaria empleada durante el procedimiento de preconcentración.

Tabla 22. Porcentajes de recuperación de As (III) y As (V) para una mezcla de estándares de As (III) y As (V)

Especie	Concentración adicionada (µg/L)	Concentración encontrada (µg/L)	Porcentaje de recuperación (%)
As(V)	25	24.4±2.8	97
As(III)	25	22.94±1	92

Tabla 23. Porcentajes de recuperación de As (III) y As (V) en extracto de leche enriquecida con especies inorgánicas de As

Especie	Concentración adicionada (µg/L)	Concentración encontrada (µg/L)	Porcentaje de recuperación (%)
As(V)	25	25.95±4.50	103
As(III)	25	20.91±5.48	83

4.7 Determinación de especies inorgánicas de As en muestras de leche cruda

bovina

Con las condiciones establecidas para la extracción de especies inorgánicas de As y la separación cromatográfica off-line, empleando cartuchos de intercambio aniónico (Strata® SAX), se procedió a determinar las especies inorgánicas en las muestras de estudio, porque de acuerdo a los estudios descritos son las especies principales en este tipo de matriz además son las que presentan mayor grado de toxicidad. Las muestras donde se determinaron las especies de As fueron las que presentaron la concentración más alta de arsénico, el Ejido “Arenal” del estado de Durango y la comunidad de Cerrito Blanco en San Luis Potosí. Se encontraron para el ejido “Arenal” porcentajes de As (V) del 47 al 76% del contenido total de As y en Cerrito Blanco del 59 al 66%. Para el caso de As (III) la zona seleccionada de Durango los porcentajes fueron de 13 al 42% y para la zona de San Luis Potosí el 22-37% (Tabla 24). Comparando los resultados con los reportados por Cava (2003), quien encontró que el 62.5% del arsénico en las muestras de leche se encontraba en la forma de As (V), valor que se encuentra dentro del porcentaje reportado en este trabajo, podemos deducir que en este proyecto los valores concuerdan con los ya reportados y siendo el As (V) menos tóxico que el As (III), se puede considerar menor riesgo el consumo de este producto, sin embargo el carácter acumulativo de este metaloide constituye un problema de salud importante. Otro estudio realizado por Jackson, en 2012, también reporta que la especie de As (V) es la forma mayoritaria en las muestras de leche [37, 38]. Cabe resaltar que en ambos estudios no se detectó la presencia de especies orgánicas de arsénico.

En cuanto a los porcentajes de As (III) fueron menores a los reportados por Datta y col (2010), que encontraron que el 52.4% de As estaba como As (III) en muestras de leche de arroz y se reportó que más del 80% de arsénico total se encontraba en las formas inorgánicas [51]. En este estudio se recuperó del 79 al 100% de arsénico total sumando ambas especies As (III) y As (V).

Tabla 24. Concentración de As (III) y As (V) en muestras de leche de la zona de estudio

Muestra	As Total (µg/kg)	Especies de Arsénico			
		As (III) (µg/kg)*	Porcentaje de As (III), %	As (V) (µg/kg)*	Porcentaje de As (V), %
Cerrito Blanco 1	262.56±13.31	57.92±1.35	22	154.73±4.57	59
Cerrito Blanco 2	330.91±5.79	96.81±4.71	29	198.72±28.01	60
Cerrito Blanco 3	237.02±10.14	87.14±13.82	37	157.36±20.84	66
Ejido Arenal 1	234.96±4.16	31.00±1.73	13	175.76±3.28	75
Ejido Arenal 2	380.71±8.71	89.93±27.93	15	242.20±21.86	64
Ejido Arenal 3	364.07±3.58	95.64±8.73	26	228.70±25.72	63
Ejido Arenal 4	168.37±6.02	70.45±25.26	42	79.60±19.33	47
Ejido Arenal 5	164.7±1.57	34.06±2.44	21	125.50±24	76

* Desviación estándar para n = 3

4.8 Cálculo del factor de biotransferencia de especies inorgánicas de As en leche bovina cruda a través del agua de consumo en la zona de estudio

Para calcular el FBT de especies inorgánicas de As se determinó la concentración de As total en agua. Preliminarmente, los resultados de concentración de arsénico en agua se validaron mediante el análisis del material de referencia certificado BCR® certified reference material (elementos traza, agua subterránea). La concentración de arsénico en el material de referencia certificado por ICP-MS fue de 10.07±0.33 µg/L

que al compararlo con el valor certificado ($10.8 \pm 0.4 \mu\text{g/L}$); no hubo diferencias estadísticamente significativas a un nivel de confianza del 95%. Posteriormente se procedió a analizar las muestras de agua procedentes de la zona de estudio. Los resultados se reportan en la Tabla 25. Como puede observarse, con excepción de Labor de Guadalupe en Durango y Rincón de Romos en Zacatecas, los sitios de muestreo presentaron concentraciones mayores a los niveles de arsénico permitidos para agua de consumo que establece la norma oficial mexicana ($25 \mu\text{g/L}$).

Tabla 25. Concentración de As en agua de las zonas de estudio

Zona	Clave	Concentración ($\mu\text{g/L}$)*
DURANGO		
Ejido Arenal	EA	33.1 ± 6.7
Colonia Hidalgo	CH	65.5 ± 8.1
Labor de Guadalupe	LG	7.5 ± 0.0
Carlos Real	CR	40.0 ± 0.8
ZACATECAS		
Guadalupe	G	25.6 ± 0.0
Rincón de Romos	RR	20.5 ± 0.0
SAN LUIS POTOSÍ		
Cerrito Blanco	CB	288.3 ± 0.0

* Desviación estándar para $n = 3$

Para el cálculo del FBT de las especies inorgánicas de As se tomó en consideración las concentraciones de As total en las muestras de agua y de cada especie de As en cada espécimen de estudio, los valores se muestran en la Tabla 26. Como se puede

observar la especie que presentó mayor biotransferencia fue As (V) que comparado con la especie de As (III), presenta menor toxicidad (ver Tabla 1).

Tabla 26. Factor de biotransferencia de especies inorgánicas de As determinados en la zona de estudio

Especie de As	FBT (días/L)	
	Durango EJIDO "ARENAL"	San Luis Potosí CERRITO BLANCO
As (III)	$8.7 \times 10^{-3} - 2.7 \times 10^{-2}$	$1.8 \times 10^{-3} - 5.1 \times 10^{-3}$
As (V)	$4.3 \times 10^{-2} - 6.8 \times 10^{-2}$	$4.2 \times 10^{-3} - 1.2 \times 10^{-2}$

También es importante mencionar que los valores del factor de biotransferencia para As (III) y As (V) fueron mayores que valores previamente reportados para arsénico total en estudios realizados (Tabla 27), indicando que las zonas de estudio presentan una fuente importante de contaminación por actividad antropogénica y representan un riesgo latente para la población que habita en estas zonas. Por lo que es de interés realizar estudios posteriores de evaluación de riesgo para la salud humana y establecer alguna medida para reducir las concentraciones de As en agua en estas zonas contaminadas.

Tabla 27. Factor de biotransferencia para As total reportados en la literatura

FBT REPORTADO PARA As	REFERENCIA
4.6×10^{-5} a 5.7×10^{-4}	[37]
6×10^{-4}	[26]
2.6×10^{-6} a 1.5×10^{-5}	[25]

4.9 Correlación de metales analizados en leche bovina cruda

En varios estudios se ha tratado de correlacionar la presencia de metales esenciales y tóxicos en leche para evaluar si la concentración de los metales esenciales se ve afectada por la presencia de los metales tóxicos. Así, en el presente trabajo surgió el interés de establecer la correlación entre la concentración de arsénico en leche con la concentración de otros metales en leche y con la concentración de As en agua de consumo, para establecer el grado de asociación entre las variables analizadas. Se llevó a cabo un análisis de correlación de Pearson para n=29 (tabla 28). La concentración de As en leche presentó una correlación positiva y significativa ($p \leq 0.05$) con la concentración de Zn, Cu y Fe en leche, pero no hubo una correlación con la concentración de As en agua; lo cual indica que hay una asociación entre As-Zn, As-Fe y As-Cu, pero no entre las concentraciones de As en leche y en agua.

Tabla 28. Coeficientes de correlación de Pearson para el contenido de As y de metales de estudio en leche

	As leche	Zn leche	Fe leche	Cu leche	As agua
As leche	1.0000	0.6695*	0.5400*	0.6706*	0.1253
Zn leche		1.0000	0.576497*	0.5557*	-0.1029
Fe leche			1.000000	0.2530	-0.2629
Cu leche				1.0000	0.05910
As agua					1.0000

* Las correlaciones son significativas a $p < 0.05$ (para $n=29$)

Esta asociación puede deberse a la fuente común de contaminación de la leche en las zonas de estudio, que fue la minería. Estudios realizados también han mostrado una correlación significativa entre metales analizados en muestras de leche. En Pakistán se evaluó la presencia de los metales Ca, Mg, Cu, Zn, Fe, Mn, Pb, Cd, Cr y Ni, en leche, se encontró que los datos mostraron que la concentración de plomo estaba correlacionada (<0.01) con el hierro y el cromo a un nivel de significación <0.05 . El níquel se encontró que se correlacionó (<0.05) sólo con zinc y cromo [67]. En otro estudio en Polonia se determinó las concentraciones de metales pesados tóxicos cadmio (Cd) y plomo (Pb) y los principales metales esenciales Ca, Mg, P, Cu, Fe, Mn, Se y Zn en muestras de leche para dos variedades de vacas Simmental ($n=20$) y Holstein-Friesian ($n = 20$) criadas en granjas orgánicas, obteniendo correlaciones significativas positivas para ambas razas de los siguientes elementos: Pb-Cd, Pb-Se, Cd-Se, Cd-Mn, Zn-Cu, Zn-P, Ca-P, Ca- Mg y Mg-P [68].

Estos resultados aunado a que no existe correlación positiva con la concentración de As en agua y leche sugieren que debe realizarse una evaluación posterior de las

concentraciones de As en las zonas de estudio de tanto el suelo y aire en donde pastan y también del alimento que consumen que nos permita las fuentes de contaminación de As en leche de las zonas de estudio, considerando que el modelo matemático empleado para la determinación del FBT que fue descrito por Steven [26], incluye solamente para el cálculo la concentración de As en el agua de consumo como principal fuente de transferencia de As hacia la leche.

5. CONCLUSIONES

La zona de San Luis Potosí fue la que presentó mayor problema de contaminación por metales tóxicos (As y Pb) en leche, superando las concentraciones establecidos por la Comisión Europea, representando así un riesgo para los consumidores.

Las concentraciones de metales esenciales (Cu, Fe y Zn) en leche, fueron altas comparadas con los valores ya reportados en otros estudios, lo que indica graves problemas de contaminación, principalmente por actividad minera de las zonas de estudio.

La concentración de As en agua para la mayoría de las zonas de estudio (71%) superó el límite permisible y las concentraciones más altas en leche se presentaron en San Luis Potosí y Durango, siendo este último importante productor de leche.

Se desarrolló un método de determinación de especies inorgánicas de As en leche que incluye la extracción de especies inorgánicas de arsénico empleando ácido fosfórico 0.3 M asistido por microondas a 90°C y la separación para las especies de arsénico usando un cartucho de intercambio aniónico, obteniendo porcentajes de recuperación para As (III) y As (V) del 83 y 100%, respectivamente en las muestras de leche.

En las muestras de leche procedentes de las zonas de estudio se encontró que la especie mayoritaria fue As (V) con porcentajes del 47 al 76% del As total.

El factor de biotransferencia para las especies de arsénico inorgánico en leche bovina cruda determinado a través del agua de consumo en las zonas de estudio fue mayor que 1×10^{-5} días/L.

La correlación positiva y significativa ($p \leq 0.05$) encontrada entre los metales Fe, Cu y Zn, leche y el As en leche sugieren una fuente de contaminación común que pudiera estar asociada a las actividades de minería que se desarrollan en las zonas de estudio, por lo que debe considerarse otro modelo para el cálculo del factor de biotransferencia, que incluya las concentraciones de As en alimento, en suelo, etc.

6. REFERENCIAS

1. Nagajyoti, P. C., Lee, K. D. Sreekanth, T. V., Heavy metals, occurrence and toxicity for plants: a review. *Environmental Chemistry Letters*, 2010. 8(3): p. 199-216.
2. Yang, Z. L., Long, W., Bao, Y., Yang, Q. X., Assessment of heavy metals contamination in urban topsoil from Changchun City, China. *Journal of Geochemical Exploration*, 2011. 108(1): p. 27-38.
3. Celine, S. L., Xiangdong, L., Wenzhong, S., Sharon C. C., Lain, T., Metal contamination in urban, suburban, and country park soils of Hong Kong: A study based on GIS and multivariate statistics. *Science of the Total Environment* 2006. 356: p. 45-61.
4. Wong, C. S., Li, X., Thornton, L., Urban environmental geochemistry of trace metals. *Environmental Pollution*, 2006. 142(1): p. 1-16.
5. Maas, S., Scheifler, R., Benslama, M., Crini, N., Lucot, E., Brahmia, Z., Benyacoub, S. Giraudoux, P., Spatial distribution of heavy metal concentrations in urban, suburban and agricultural soils in a Mediterranean city of Algeria. *Environmental Pollution*, 2010. 158(6): p. 2294-2301.
6. Jarup, L., Hazards of heavy metal contamination. *British Medical Bulletin*, 2003. 68(1): p. 167-182.
7. Jin, Z. F., Zhang, Z. J., Zhang H., Liu, C. Q., Li, F.L., Assessment of lead bioaccessibility in soils around lead battery plants in East China. *Chemosphere*, 2015. 119: p. 1247–1254.
8. Molina, L., Rondón, C., Di Bernardo, M., Yépez, J., Guerrero, L., Anemias sideroblásticas y puenteado basófilo: Indicador biológico por exposición ocupacional al plomo y sus derivados, Instituto Nacional de Higiene Rafael Rangel, 2012. p. 43.
9. Patra, R. C., Swarup, D., Naresh, R., Kumar, P., Shekhar, P., Ranjan, R., Cadmium Level in Blood and Milk from Animals Reared Around Different Polluting Sources in India. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 2005. 74(6): p. 1092-1097.
10. Caggiano, R., Sabia, S., D'Emilio, M., Macchiato, M., Anastasio, A., Ragosta, M., Paino, S., Metal levels in fodder, milk, dairy products, and tissues sampled in ovine farms of Southern Italy. *Environmental Research*, 2005. 99(1): p. 48-57.
11. Mouron, S. A., Grillo, C. A., Dulout, F., Golijow, C. , A comparative investigation of DNA strand breaks, sister chromatid exchanges and K-ras gene mutations induced by cadmium salts in cultured human cells. *Mutation Research*, 2004. 568: p. 221–231.

12. Mandal, B. K., Suzuki, K. T., Arsenic round the world: a review. *Talanta* 2002. 58: p. 201–235.
13. Ng, J. C., Wang, J. Shraim, A., A global health problem caused by arsenic from natural sources. *Chemosphere*, 2003. 52(9): p. 1353-1359.
14. Agreda, O., Rojas M., Sarmiento, A., Evaluación diagnóstica del contenido de arsénico en las fuentes de abastecimiento de agua potable del Estado Carabobo, Venezuela. *Gaceta Médica Caracas*, 2005. p. 113.
15. Santra, S. C., Samal, A. C., Bhattacharya, P., Banerjee, S., Biswas, A., Majumdar, J., Arsenic in foodchain and community health risk: a study in Gangetic West Bengal. *Procedia Environmental Sciences* 2013. 18: p. 2-13.
16. Wenzel, R., Arsenic Speciation in Urine by Solvent Extraction/Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry and Capillary Electrophoresis/Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry, in University of Technology, Sydney. 2001.
17. Jedynak, L., Kieroński, P., Kowalska, J., Golimowski, J., Speciation Analysis of Arsenic by HPLC–UV in Highly Contaminated Water Samples. *Analytical Chemistry Warsaw*. 2008. 53: p. 557-568.
18. Rivera, N. N., Determinación y Remoción Fotocatalítica de Especies Tóxicas de Arsénico en Muestras de Agua, TESIS, MC con orientación en Química Analítica Ambiental, in Facultad de Ciencias Químicas. 2012, UANL: Monterrey, NL. p. 118.
19. Smedley, P. L., Kinniburgh, D. G, A review of the source, behaviour and distribution of arsenic in natural waters. *Applied Geochemistry* 2002. 17(517–568).
20. Arreguín, F.I., Chávez, R., Soto, P. R. , Una revisión de la presencia de arsénico en el agua subterránea en México. Comisión Nacional del Agua (CONAGUA), Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT). 20/09/13, 3:00 pm.: p. http://revistatlaloc.org.mx/anteriores/edicion_45/pdf/arsenico.pdf.
21. Rosas, I., Belmont, R., Armienta, A., Baez, A., Arsenic Concentrations in Water, Soil, Milk and Forage in Comarca Lagunera, Mexico. Centro de Ciencias de la Atmósfera, Instituto de Geofísica, Universidad Nacional Autónoma, 1997.
22. Dávila, O. G., Water Arsenic and Fluoride Contamination in Zacatecas Mexico: An Exploratory Study. 2011: p. https://www.academia.edu/769644/Water_Arsenic_and_Fluoride_Contamination_in_Zacatecas_Mexico_An_Exploratory_Study.
23. Razo, I., Carrizales, L., Castro, J., Díaz, B., Monroy, M., Arsenic and heavy metal pollution of soil, water and sediments in a semi-arid climate mining area in Mexico. *Water, Air, and Soil Pollution*, 2004. 152: p. 129–152.

24. NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-147-SEMARNAT/SSA1-2004. DIARIO OFICIAL: p. http://www.profepa.gob.mx/innovaportal/file/1392/1/nom-147-semarnat_ssa1-2004.pdf.
25. Pérez, A., Fernández, A., Arsenic concentration in water and bovine milk in Cordoba, Argentina. Preliminary results. *Journal of Dairy Research*, 2005. 72(1): p. 122-124.
26. Stevens, J. B., Disposition of Toxic Metals in the Agricultural Food Chain. 1. Steady-State Bovine Milk Biotransfer Factors. *Environmental Science & Technology*, 1991. 25: p. 1289-1294.
27. Economía, S.d., Análisis del sector lácteo en México. Dirección General de Industrias Básicas. 26/09/13, 10:30 am.: p. http://www.economia.gob.mx/files/comunidad_negocios/industria_comercio/informacionSectorial/analisis_sector_lacteo.pdf.
28. SAGARPA, Boletín de leche, enero-marzo 2013. Servicios de informacion agroalimentaria y pesquera, 2013. 26/09/13, 10:39 am. <http://www.siap.gob.mx/opt/estadistica/Derivada/BoletinLeche/LecheMar2013.pdf>.
29. Génesis 6.01, E.R., 1997: p. http://www.dsm.com/content/dam/dsm/nip/en_US/documents/leche.pdf.
30. Farhat, A., Mohammadzadeh, A., Balalimood, M., Esmaily, H., Haghi, M., Comparing of lead level in breast milk and cow's milk. *Clinical Biochemistry*, 2011. 44(13): p. S35.
31. Rahimi, E., Lead and cadmium concentrations in goat, cow, sheep, and buffalo milks from different regions of Iran. *Food Chem*, 2013. 136(2): p. 389-91.
32. Swarup, D., Patra, R. C., Naresh, R., Kumar, P., Shekhar, P., Blood lead levels in lactating cows reared around polluted localities; transfer of lead into milk. *Science of the Total Environment*, 2005. 349(1-3): p. 67-71.
33. Alais, C., *Ciencias de la leche. Principios de la técnica lechera*. 2003: Reverté.
34. Pavlovic, I., Sikiric M., Havranek J. L., Plavljanic, N., Brajenovic, N., Lead and cadmium levels in raw cow's milk from an industrialised Croatian region determined by electrothermal atomic absorption spectrometry. *Czech Journal of Animal Science*, 2004. 49: p. 164-168.
35. Licata, P., Trombetta, D., Cristani, M., Giofrè, F., Martino, D., Calò, M., Naccari, F., Levels of "toxic" and "essential" metals in samples of bovine milk from various dairy farms in Calabria, Italy. *Environment International*, 2004. 30(1): p. 1-6.

36. Bilandžić, N., Đokić, M., Sedak, M., Solomun, B., Varenina, I., Knežević, Z., Benić, M., Trace element levels in raw milk from northern and southern regions of Croatia. *Food Chemistry*, 2011. 127(1): p. 63-66.
37. Cava, P., Cervera, M. L., Pastor, A., De la Guardia, M. Determination of arsenic and antimony in milk by hydride generation atomic fluorescence spectrometry. *Talanta*, 2003. 60(4): p. 787-799.
38. Jackson, B. P., Taylor, V. F., Punshon, T., Cottingham, K. L., Arsenic concentration and speciation in infant formulas and first foods. *Pure and Applied Chemistry*, 2012: p. 1.
39. Cava, P., De la Guardia, A., Teutsch, C., Cervera, L., De la Guardia, M., Non-chromatographic speciation analysis of arsenic and antimony in milk hydride generation atomic fluorescence spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, 2003. 493(2): p. 195-203.
40. Meharg, A. A., Deacon, C., Campbell, R. C. J., Carey, A., Williams, P. N., Feldmann, J., Raab, A., Inorganic arsenic levels in rice milk exceed EU and US drinking water standards. *Journal of Environmental Monitoring*, 2008. 10(4): p. 428.
41. Wolle, M. M., Rahman, G. M., Kingston, H. M., Pamuku, M., Speciation analysis of arsenic in prenatal and children's dietary supplements using microwave-enhanced extraction and ion chromatography–inductively coupled plasma mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, 2014. 818: p. 23-31.
42. Patra, R.C., Swarup, D., Kumar, P., Nandi, D., Naresh, R., Ali, S. L., Milk trace elements in lactating cows environmentally exposed to higher level of lead and cadmium around different industrial units. *Science of The Total Environment*, 2008. 404(1): p. 36-43.
43. Rey, F., Miranda, M., López, M. , Essential trace and toxic element concentrations in organic and conventional milk in NW Spain. *Food and Chemical Toxicology*, 2013. 55: p. 513–518.
44. Solis, C. I., Mireles, A., Hernandez, V., Determination of trace metals in cow's milk from waste water irrigated areas in Central Mexico by chemical treatment coupled to PIXE. *Microchemical Journal*, 2009. 91: p. 9-12.
45. Sigrist, M., Beldoménico, H., Rosa, M., Evaluation of the influence of arsenical livestock drinking waters on total arsenic levels in cow's raw milk from Argentinean dairy farms. *Food Chemistry*, 2010. 121(2): p. 487-491.
46. NORMA Oficial Mexicana NOM-184-SSA1-2002, Productos y servicios. Leche, fórmula láctea y producto lácteo combinado. Especificaciones sanitarias. 16/10/2013, 17:23 hrs.: p. <http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/nom/184ssa12.html>.

47. Salud, S.d., NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-127-SSA1-1994. 1994: p. <http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/nom/127ssa14.html>.
48. Cava, P., Cervera, M. L., Pastor, A., De la Guardia, M., Determination of As, Sb, Se, Te and Bi in milk by slurry sampling hydride generation atomic fluorescence spectrometry. *Talanta*, 2004. 62(1): p. 173-182.
49. D'Illio, S., Petrucci, F., D'Amato, M., Di Gregorio, M., Senofonte O, Violante N Method validation for determination of arsenic, cadmium, chromium and lead in milk by means of dynamic reaction cell inductively coupled plasma mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, 2008. 624(1): p. 59-67.
50. Gómez, J. L., Sánchez, D., Giráldez, I. Morales, E., A comparison between ICP-MS and AFS detection for arsenic speciation in environmental samples. *Talanta*, 2000. 51: p. 257-268.
51. Datta, B. K., Mishra, A., Singh, A., Sar, T. K., Sarkar, S., Bhattacharya, A., Chakraborty, A. K. Mandal, T. K., Chronic arsenicosis in cattle with special reference to its metabolism in arsenic endemic village of Nadia district West Bengal India. *Science of The Total Environment*, 2010. 409(2): p. 284-288.
52. Fångström, B., Moore, S., Nermell, B., Kuenstl, L., Goessler, W., Grandér, M., Kabir, I., Palm, B., Arifeen, S., Vahter, M., Breast-feeding Protects against Arsenic Exposure in Bangladeshi Infants. *Environmental Health Perspectives*, 2008. 116(7): p. 963-969.
53. Litter, M. I., Armienta, M. A., Farias, S. S. , *Metodologías Analíticas para la Determinación y Especiación de Arsénico en Aguas y Suelos*. Cyted, 2009. 20/09/13, 8:00 pm.: p. http://paginas.fe.up.pt/~cigar/html/documents/Monografia2_000.pdf.
54. (ICH), *Validation on analytical procedures: Text and methodology (Q2R1)*. Geneva, 2005: p. <http://www.ich.org/products/guidelines/quality/quality-single/article/validation-of-analytical-procedures-text-and-methodology.html>
55. O'Reilly, J., Watts, M. J., Shaw, R.A. , Marcilla, A. L., Ward, N. I., Arsenic contamination of natural waters in San Juan and La Pampa, Argentina p. [file:///C:/Users/Q.B.P.LuzMar%C3%ADa/Downloads/04_0309_EGAH_OReilly_revised_manuscript%20\(3\).pdf](file:///C:/Users/Q.B.P.LuzMar%C3%ADa/Downloads/04_0309_EGAH_OReilly_revised_manuscript%20(3).pdf).
56. Kenneth R. Neubauer, R.E.W., *Interference Removal and Analysis of Environmental Waters Using the ELAN DRC-e ICP-MS*. p. http://www.perkinelmer.com/CMSResources/Images/44-74184APP_InterferenceRemovalandAnalysisofEnvironmentalWatersUsingtheELANDRCeICPMS.pdf.
57. EPA, M., *MICROWAVE ASSISTED ACID DIGESTION OF SILICEOUS AND ORGANICALLY BASED MATRICES*. p. <http://www.epa.gov/solidwaste/hazard/testmethods/sw846/pdfs/3052.pdf>.

58. Panorama Minero del estado de San Luis Potosí. 2011(01/02/2015, 11:00 am): p. http://www.sgm.gob.mx/pdfs/SAN_LUIS_POTOSI.pdf.
59. Santos, E., Gavilán, A., Yarto, M., Rosiles, R., Gavilán, I., Suárez, S., Castro, J., López, T., Analysis of Arsenic, Lead and Mercury in Farming Areas with Mining Contaminated Soils at Zacatecas, Mexico. Journal of Mexican Chemical Society, 2006. 50: p. 57-63.
60. Panorama Minero del Estado de Zacatecas. 2013(01/02/2015, 11:00 am): p. <http://www.sgm.gob.mx/pdfs/ZACATECAS.pdf>.
61. Sorbo, A., Turco, A. C., Di Gregorio, M., Ciaralli, L., Development and validation of an analytical method for the determination of arsenic, cadmium and lead content in powdered infant formula by means of quadrupole Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry. Food Control, 2014. 44: p. 159-165.
62. Semaghiul, S.D., Stanciu, G., Soceanu, A., DETERMINATION OF MAJOR AND MINOR ELEMENTS IN MILK THROUGH ICP-AES Environmental Engineering and Management Journal 2008. 7: p. 805-808.
63. Magariño, H., Producción higiénica de la leche cruda. 1era ed. 2000.
64. Panorama Minero del estado de Durango. 2011(01/02/2015, 11:00 am): p. <http://www.sgm.gob.mx/pdfs/DURANGO.pdf>.
65. Khan, N., Jeong, I.S., Hwang, I. M., Kim, J. S., Choi, S. H., Nho, E. Y., Choi, J. Y., Park, K.S., Kim, K. S., Analysis of minor and trace elements in milk and yogurts by inductively coupled plasma-mass spectrometry (ICP-MS). Food Chemistry, 2014. 147: p. 220-4.
66. Matschullat, J., Arsenic in the geosphere -a review. The Science of the Total Environment, 2000. 249: p. 297-312.
67. Lutfullah, G., Khan, A. A., Amjad, A. Y., Perveen, S., Comparative Study of Heavy Metals in Dried and Fluid Milk in Peshawar by Atomic Absorption Spectrophotometry. The Scientific World Journal, 2014: p. 1-5.
68. Pilarczyk, R., Paweł, J.W., Sablik, C. P., Pilarczyk, B., Tomza-Marciniak, A., Concentrations of toxic heavy metals and trace elements in raw milk of Simmental and Holstein-Friesian cows from organic farm. Environmental Monitoring and Assessment, 2013. 185: p. 8383-8392.