Rev. Int. Contam. Ambient. 24 (1) 33-38, 2008

USO DEL ÁCIDO SULFÚRICO EN LAS DETERMINACIONES DE PLAGUICIDAS ORGANOCLORADOS. I. CALIDAD QUÍMICO-ANALÍTICA DE LA PRECIPITACIÓN DE GRASAS POR EL ÁCIDO SULFÚRICO CONCENTRADO EN MUESTRAS CON ALTO CONTENIDO DE LÍPIDOS

Stefan M. WALISZEWSKI[1], Xóchitl MÓJICA GARCÍA[1], Rosa M. INFANZÓN[1], Dulce María BARRADAS DERMITZ[2] y Octavio CARVAJAL ZARRABAL[1]

[1] Instituto de Medicina Forense, Universidad Veracruzana, SS Juan Pablo II s/n, 94290 Boca del Río, Ver. México, correo electrónico: swal@uv.mx
[2] Área Químico-Biológica, Instituto Tecnológico de Veracruz, Av. Miguel Ángel de Quevedo No. 2779, 91860 Veracruz, Ver.

(Recibido mayo 2007, aceptado diciembre 2007)

Palabras clave: plaguicidas organoclorados, grasas, ácido sulfúrico

RESUMEN

Varios trabajos describen métodos analíticos para determinar residuos de plaguicidas organoclorados en muestras ambientales. La detección por cromatografía de gases con captura de electrones exige un extracto con alto grado de pureza. Para este fin, se emplean diferentes procedimientos de purificación. La mayoría de los plaguicidas organoclorados resisten la actividad del ácido sulfúrico, propiedad que se aprovecha para destruir los compuestos endógenos y precipitar las grasas. En este trabajo se describe el tratamiento de extractos de grasas con el ácido sulfúrico concentrado y la determinación de residuos no volátiles después de su tratamiento. Se estudiaron las muestras de tejidos adiposos: (humano, bovino, cerdo y pollo), mantequilla y margarina. La técnica analítica permite muy buena recuperación de plaguicidas (mayor de 90 %) y el extracto listo para la corrida cromatográfica con una mínima cantidad (0.8 a 2.2 mg que constituye 0.22 a 1.87 % de la muestra procesada) de sustancias no volátiles determinadas gravimétricamente. La baja cantidad de residuos no volátiles presentes en el extracto purificado, permite realizar múltiples corridas cromatográficas de muestras sin disminuir la capacidad de resolución de la columna cromatográfica y la respuesta del detector de captura de electrones. Los estudios de calidad analítica de muestras grasas realizadas en 10 repeticiones, mostraron el coeficiente de varianza entre 4.8 a 12.5 % indicando un método idóneo para la monitorización de productos grasos contaminados con plaguicidas organoclorados.

Key words: organochlorine pesticides, fats, sulfuric acid

ABSTRACT

Many papers describe analytical methods for organochlorine pesticide residue determinations in environmental samples. Gas chromatography with electron capture detection requires highly purified extracts, *ie*. with an efficient clean-up step. To achieve this purpose, different clean-up methods are employed. Most organochlorine pesticides are

resistant to sulfuric acid, a property used for the destruction of endogenous compounds and fat precipitation. Both fat extract treatments that use sulfuric acid as a clean-up medium, and quantities of nonvolatile residues determined after the clean-up step, are described. Samples of adipose tissues (human, bovine, pig and chicken), butter and margarine were studied. The analytical method allows good (higher than 90 %) organochlorine pesticide recovery and an extract ready for gas chromatography with a minimal amount of nonvolatile compounds (0.8 to 2.2 mg that constitutes 0.22 to 1.87 % of the analyzed sample) determined gravimetrically. The low quantity of nonvolatile residues present in cleaned-up extracts allows multiple sample gas chromatographies without diminishing column resolution and electron capture detector response. The analytical quality study (10 repetitions for each fat sample) shows a 4.8 to 12.5 % coefficient of variation, indicating an appropriate method for fat sample monitoring studies.

INTRODUCCIÓN

Es reconocido el doble papel, benéfico y de riesgo, de los plaguicidas organoclorados, representados por DDT (dicloro-difenil-tricloroetano), HCH (hexaclorociclohexano), hexaclorobenceno (HCB), aldrin, dieldrin, endrin, heptacloro, endosulfan y metoxicloro. En el primer caso, su introducción en la agricultura proporcionó protección a cultivos agrícolas, por ejemplo el DDT en la Europa de la posguerra permitió proteger el cultivo de papa y el empleo del HCH en los cultivos de arroz en Japón, elevó significativamente la producción agrícola resolviendo el déficit de alimentos. En el aspecto sanitario, a la fecha, el DDT es el plaguicida que ha mostrado mayor eficiencia en el combate del vector del paludismo (Horton 2007), enfermedad que provoca anualmente miles de muertes en las zonas tropicales del mundo (WHO 2007). El resurgimiento del paludismo en estas zonas y el hecho de que se estima disponer de una vacuna contra esta enfermedad hasta el año 2010, ha propiciado que en los años 1984 y 2006 la Organización Mundial de la Salud (Anónimo 2007) recomendara su uso como insecticida de selección en la lucha contra vectores transmisores de enfermedades (Schapira 2006, Mandavilli 2006, Kochi 2006, Horton 2007). Esta recomendación se da bajo un programa específico, que implica su aspersión controlada únicamente dentro de las casas, por personal entrenado y 2 veces al año (máx. 2 g/m^2).

El descubrimiento de la presencia y la acumulación de los plaguicidas organoclorados en el tejido adiposo de animales y humanos y su biomagnificación en la cadena alimenticia, originó que se les agrupara bajo el nombre de contaminantes orgánicos (o químicos) persistentes y que en la década de los setenta se estableciera su restricción y prohibición (Carson 1962, Rogan y Chen 2005). Esta prohibición se ha aplicado fundamentalmente en los usos agrícolas y sanitarios de países del primer mundo y de manera paulatina en países en desarrollo.

Las muestras de matrices lipídicas, como el tejido adiposo, leche y sus derivados así como los aceites vegetales, almacenan sustancias lipofílicas, entre otras los plaguicidas organoclorados. Este tipo de muestras es el medio más adecuado para la realización de estudios que evalúan el grado de exposición ambiental y especialmente humana a los contaminantes químicos persistentes. El tejido adiposo es un excelente biomarcador para los estudios epidemiológicos de la contaminación alimenticia y ambiental. La evaluación de la exposición prolongada (Cameron y Van Staveren 1988, Barrett-Connor 1991) permite determinar la exposición precedente de los individuos sin conocer sus hábitos alimenticios y su modo de vida. El análisis del tejido adiposo refleja también la reducción del error causal inherente a la evaluación dietética basada sobre los cálculos de consumo de los alimentos por persona y la variedad de los alimentos en la dieta (Nelson 1991, Sempos *et al.* 1992).

Para evaluar el daño a la salud originado por la exposición ambiental y alimenticia a plaguicidas organoclorados, acumulados en productos con alto contenido de grasa, es de suma importancia disponer de técnicas analíticas que permitan determinar los niveles verdaderos de los residuos. La técnica analítica a utilizar debe poseer la cualidad de ser simple, rápida, de bajo costo, exacta y reproducible. Algunos plaguicidas organoclorados son resistentes a la oxidación del ácido sulfúrico concentrado, propiedad que se aprovecha en el proceso de purificación de los extractos. Éste degrada los compuestos endógenos lábiles sin afectar a los plaguicidas y precipita cuantitativamente las grasas. Los plaguicidas organoclorados, que se degradan bajo la acción del ácido sulfúrico son: dieldrin, endrin, clordano y metoxicloro. Los beneficios del uso de esta técnica consisten en

la sustitución de adsorbentes caros y disminución significativa del volumen de disolventes orgánicos utilizados, determinación de los plaguicidas libres y conjugados, degradación de ftalatos que durante la cromatografía de gases se sobreponen a los de plaguicidas conduciendo a interpretaciones erróneas (Waliszewski y Szymczynski 1990).

Los beneficios mencionados motivaron la evaluación del método analítico que utiliza el ácido sulfúrico concentrado en la purificación de extractos de muestras lipídicas así como la determinación de la cantidad de sólidos residuales después del proceso de purificación, los cuales pueden interferir en el proceso cromatográfico, contaminando la columna cromatográfica y la fuente radioactiva (Ni^{63}) del detector de captura de electrones en el cromatógrafo de gases.

MATERIAL Y MÉTODOS

Los reactivos empleados fueron hexano, ácido sulfúrico concentrado, todos con grado de pureza para análisis, sulfato de sodio anhidro en polvo activado durante 16 horas a 650 °C.

La muestra de aproximadamente 2 g de grasa, se colocó en un mortero y se trituró con suficiente cantidad de sulfato de sodio hasta obtener un polvo seco y homogéneo (Waliszewski *et al.* 2004). Este procedimiento se realizó para absorber los restos de agua y aumentar la superficie de contacto con el disolvente. La muestra se pasó a una columna cromatográfica de 1 cm di y 50 cm de longitud, con un disco poroso de cristal o un tapón de fibra de vidrio y un receptáculo para su retención. La muestra en la columna se compactó, eliminando las burbujas de aire. Las grasas de la muestra se extrajeron con 100 mL de hexano a un flujo de 3 mL/min. El extracto se dejó reposar media hora a temperatura ambiente. Se tomaron 10 mL del extracto y se transfirieron a un matraz de 50 mL, previamente pesado. El contenido del matraz se evaporó en un rotavapor a sequedad para eliminar el disolvente y se determinó por diferencia de peso la cantidad de sustancias no volátiles consideradas como grasa. Se tomaron otros 10 mL del extracto original y se transfirieron cuantitativamente a un tubo de ensayo con tapón de teflón, se agregó 1 mL de ácido sulfúrico concentrado para precipitar las grasas. El contenido se agitó vigorosamente durante un minuto y se dejó reposar 3 minutos para obtener una buena separación de las fases. El extracto purificado se secó, pasándolo por una capa de sulfato de sodio y se concentró en el rotavapor hasta la sequedad. El contenido del matraz se peso para determinar por diferencia de peso la cantidad de sustancias no volátiles restantes en el extracto purificado.

La determinación de cantidad de sustancias no volátiles consideradas como grasa presente en el extracto antes y después de la purificación, se realizó por el método gravimétrico, pesando la cantidad de residuos secos en balaza analítica. Cada muestra fue analizada con tres niveles de grasas y en 10 repeticiones.

Las muestras analizadas fueron tejidos adiposos de humano, bovino, cerdo y pollo; mantequilla y margarina

Estudio de calidad analítica

Para valorar la cantidad de residuos no volátiles se realizó el análisis de cada muestra con 10 repeticiones y tres niveles de cantidad de grasa. Los valores promedio de lecturas gravimétricas, su desviación estándar (DE), rangos y coeficiente de varianza (CV), se calcularon por medio del software estadístico Minitab versión 12.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se realizó un estudio analítico para determinar la capacidad purificadora (de precipitar cuantitativamente las sustancias consideradas como grasas) del ácido sulfúrico concentrado aplicado para el análisis de residuos de plaguicidas en muestras ricas en grasas. La grasa presente en los extractos inyectados al cromatógrafo de gases durante el análisis de plaguicidas, interfiere en el proceso cromatográfico y en la respuesta del detector de captura de electrones. Por esta razón, es una prioridad la eliminación cuantitativa de las grasas en los extractos para la determinación cromatográfica de plaguicidas organoclorados. Una de las técnicas analíticas que se utiliza para determinar residuos de plaguicidas organoclorados en muestras con alto contenido de grasa los precipita con el ácido sulfúrico concentrado (Waliszewski *et al.* 2004). En el presente trabajo, la cantidad de grasas restantes, no precipitadas presentes en el extracto, se midió gravimétricamente en diferentes tipos de muestras grasas sometidas al mismo procedimiento analítico. Para determinar la cantidad de sustancias no volátiles, consideradas como grasas, presentes en el extracto hexánico, se prepararon tres extractos de cada tipo de muestra con tres niveles de grasa determinada gravimétricamente en 10.0 mL del extracto, tomado para su análisis aproximadamente 100, 300 y 500 mg. Cada muestra analizada la constituyeron

los 10.0 mL del extracto tomado con pipeta, al que se le añadió 1 mL de ácido sulfúrico concentrado. El extracto se agitó vigorosamente durante un minuto, se decantó el sobrenadante, se evaporó el extracto purificado a la sequedad y se determinó gravimétricamente la cantidad de residuos no volátiles. Este procedimiento se repitió 10 veces.

Tejido adiposo humano

Para determinar la cantidad de sustancias no volátiles presentes en el extracto hexánico de tejido adiposo humano se extrajeron tres muestras, las cuales en cada 10.0 mL contenían 121.3, 332.1 y 525.3 mg de grasa respectivamente. Cada muestra se procesó tratándola con el ácido sulfúrico concentrado. Los residuos de sustancias no volátiles se determinaron gravimétricamente y los resultados obtenidos de 10 repeticiones se presentan en el **cuadro I**.

CUADRO I. CANTIDAD DE RESIDUOS NO VOLÁTILES (MILIGRAMOS) DE GRASA DE TEJIDO ADIPOSO HUMANO DESPUÉS DEL TRATAMIENTO DE LA MUESTRA CON UN MILILITRO DE ÁCIDO SULFÚRICO CONCENTRADO

	121.3 mg	332.1 mg	525.3 mg
$\bar{X}$ ± DE	1.2 ± 0.1 (0.99 %)	1.4 ± 0.1 (0.42 %)	2.1 ± 0.1 (0.40 %)
Rangos	1.2 - 1.4	1.2 - 1.6	2.0 - 2.3
CV	8.3 %	7.1%	4.8%

La cantidad de sustancias no volátiles presentes en el extracto de tejido adiposo humano varió desde 1.2 mg en la muestra de 121.3 mg que constituye 0.99 % de la cantidad total de muestra hasta 2.1 mg en la muestra de 525.3 mg (0.40 % de la muestra tratada). El coeficiente de variación fue bajo, de 4.8 a 8.3 %, siendo éste menor que 10 %, considerado como excelente en el análisis de residuos de plaguicidas.

Grasa de bovino

Para determinar la cantidad de sustancias no volátiles contenidas en el extracto hexánico de grasa de bovino se procedió a la extracción de tres muestras, obteniéndose los siguientes niveles de grasa por cada 10.0 mL de extracto: 118.6, 306.5 y 489.7 mg. Cada muestra se procesó tratándola con el ácido sulfúrico concentrado determinándose gravimétricamente los residuos de sustancias no volátiles. Los resultados obtenidos de 10 repeticiones se presentan en el **cuadro II**.

CUADRO II. CANTIDAD DE RESIDUOS NO VOLÁTILES (MILIGRAMOS) DE GRASA DE BOVINO PRESENTE EN EL EXTRACTO PURIFICADO DESPUÉS DEL TRATAMIENTO CON UN MILILITRO DE ÁCIDO SULFÚRICO CONCENTRADO

	118.6 mg	306.5 mg	489.7 mg
$\bar{X}$ ± DE	1.1 ± 0.1 (0.93%)	1.2 ± 0.1 (0.39%)	1.1 ± 0. (0.22%)
Rangos	1.0 - 1.3	1.1 - 1.3	0.9 - 1.2
CV	8.2%	6.8%	9.6%

La grasa de bovino varió desde 1.1 mg en la muestra de 118.6 mg (0.93 % de la cantidad inicial) hasta 1.2 mg en el extracto de 306.5 mg, que representa 0.39 % de la muestra tratada. La cantidad menor de (0.22 %) de residuos no volátiles, se determinó en la muestra de mayor peso de 489.7 mg. El coeficiente de variación calculado para las muestras estuvo entre 6.8 y 9.6 %, siendo éste menor que 10 %, considerado como excelente en el análisis de residuos de plaguicidas.

Grasa de cerdo

La cantidad de sustancias no volátiles consideradas como grasa, presentes en el extracto hexánico de tejido adiposo de cerdo, determinada en 10.0 mL del extracto fue: 128.8, 294.3 y 524.4 mg. Cada muestra de 10.0 mL se procesó tratándola con un mililitro de ácido sulfúrico concentrado. Los residuos de sustancias no volátiles se determinaron gravimétricamente y los resultados obtenidos de 10 repeticiones se presentan en el **cuadro III**.

La cantidad de residuos de sustancias no volátiles varió desde 1.4 mg en la muestra de 128.8 mg que constituye 1.08 % de la cantidad total hasta 2.0 mg en el extracto de 524.4 mg, siendo este 0.39 % de la muestra tratada. El coeficiente de variación, calculado para las muestras estuvo entre 5.0 y 6.7 %. Este valor

CUADRO III. CANTIDAD DE RESIDUOS NO VOLÁTILES (MILIGRAMOS) DE GRASA DE CERDO PRESENTE EN EL EXTRACTO PURIFICADO DESPUÉS DEL TRATAMIENTO CON UN MILILITRO DE ÁCIDO SULFÚRICO CONCENTRADO

	128.8 mg	294.3 mg	524.4 mg
$\bar{X}$ ± DE	1.4 ± 0.1 (1.08%)	1.5 ± 0.1 (0.52%)	2.0 ± 0.1 (0.39%)
Rangos	1.3 - 1.5	1.4 - 1.7	1.9 - 2.3
CV	5.2%	6.7%	5.0%

fue menor que 10 %, excelente para el análisis de residuos de plaguicidas.

Grasa de pollo

Para determinar la cantidad de sustancias no volátiles presentes en el extracto hexánico de grasa de pollo se extrajo tres muestras obteniéndose los siguientes niveles de grasa contenida en 10.0 mL del extracto: 101.7, 311.3 y 513.6 mg. Cada muestra se trató con un mililitro de ácido sulfúrico concentrado. Los residuos de sustancias no volátiles, determinadas gravimétricamente en 10 repeticiones, se presentan en el **cuadro IV**.

CUADRO IV. CANTIDAD DE RESIDUOS NO VOLÁTILES (MILIGRAMOS) DE GRASA DE POLLO PRESENTE EN EL EXTRACTO PURIFICADO DESPUÉS DEL TRATAMIENTO CON UN MILILITRO DE ÁCIDO SULFÚRICO CONCENTRADO

	101.7mg	311.3mg	513.6mg
$\bar{X} \pm$ DE	1.9 ± 0.2 (1.87%)	1.3 ± 0.1 (0.42%)	1.5 ± 0.1 (0.29%)
Rangos	1.6 - 2.3	1.2 - 1.5	1.4 - 1.7
CV	10.5%	7.7%	6.7%

Los residuos de sustancias no volátiles variaron desde 1.3 mg en la muestra de 311.3 mg que constituye 0.42 % de la cantidad total hasta 1.9 mg en el extracto de 101.7 mg, correspondiente a 1.87 % de la muestra tratada. El coeficiente de variación calculado para las muestras estuvo entre 6.7 y 10.5 %. La variación de 10.5 % fue para las muestras pequeñas de 101.7 mg de grasa. Este indicador señala todavía buena precisión en la determinación realizada. Para las muestras con mayor cantidad de grasa, el coeficiente de variación bajó a 7.7 % para la muestra de 311.3 mg y 6.7 % para la muestra grande de 513.6 mg.

Grasa de mantequilla

Para determinar la cantidad de sustancias no volátiles contenidas en el extracto hexánico de la grasa de mantequilla, se procedió la extracción de tres muestras de mantequilla obteniéndose los siguientes niveles de grasa determinada gravimétricamente en 10.0 ml del extracto: 124.1, 217.7 y 315.8 mg. Cada muestra, se procesó tratándola con el ácido sulfúrico concentrado. Los residuos de sustancias no volátiles determinados gravimétricamente en 10 repeticiones, se presentan en el **cuadro V**.

Los residuos oscilaron desde 1.2 mg en la muestra de 124.1 mg que integra 0.97% de la cantidad total hasta 2.2 mg en el extracto de 315.8 mg, que es 0.70 % de la muestra tratada. El coeficiente de variación calculado para las muestras se encuentra entre 7.7 y 9.1 %. Los análisis realizados en diez repeticiones indican una variación menor de 10% para las muestras de grasa de mantequilla, indicando muy buena calidad analítica.

CUADRO V. CANTIDAD DE RESIDUOS NO VOLÁTILES (MILIGRAMOS) DE RESIDUOS NO VOLÁTILES EN MUESTRAS DE GRASA DE MANTEQUILLA DESPUÉS DEL TRATAMIENTO CON UN MILILITRO DE ÁCIDO SULFÚRICO CONCENTRADO

	124.1mg	217.7mg	315.8mg
$\bar{X} \pm$ DE	1.2 ± 0.1 (0.97%)	1.3 ± 0.1 (0.60%)	2.2 ± 0.2 (0.70%)
Rangos	1.1 - 1.3	1.1 - 1.5	1.9 - 2.4
CV	8.3%	7.7%	9.1%

Grasa de margarina

Para determinar la cantidad de sustancias no volátiles presentes en el extracto hexánico de la muestra de margarina, se procedió a realizar tres extractos con los siguientes niveles de grasa determinada gravimétricamente en 10.0 mL del extracto: 122.8, 201.1 y 310.4 mg. Se procesa cada muestra, tratándola con el ácido sulfúrico concentrado. Los residuos de sustancias no volátiles, se determinaron gravimétricamente y los resultados obtenidos de 10 repeticiones, se presentan en el **cuadro VI**.

El **cuadro VI** revela que los residuos de sustancias no volátiles, se encuentran entre 0.8 mg (0.65 %) para las muestras de 122.8 mg, 1.2 mg (0.60 %) para las muestras de 201.1 mg y 2.0 mg (0.64 %) para las muestras grandes de 310.4 mg. El coeficiente de variación calculado para los residuos restantes ocurrió entre 5.0 a 12.5 %. Los resultados realiza-

CUADRO VI. CANTIDAD DE RESIDUOS NO VOLÁTILES (MILIGRAMOS) DE GRASA NO VOLÁTIL DE MARGARINA PRESENTE EN LA MUESTRA DESPUÉS DE SU TRATAMIENTO CON UN MILILITRO DE ÁCIDO SULFÚRICO CONCENTRADO

	122.8 mg	201.1 mg	310.4 mg
$\bar{X} \pm$ DE	0.8 ± 0.1 (0.65%)	1.2 ± 0.1 (0.60%)	2.0 ± 0.1 (0.64%)
Rangos	0.7-0.9	1.1-1.4	1.9-2.1
CV	12.5%	8.3%	5.0%

dos en diez repeticiones mostraron una variación mayor de 12.5 % para las muestras de 122.8 mg de grasa, mientras que para las muestras de 201.1 mg de grasa, el coeficiente de variación disminuyó a 8.3 % y para la muestra mayor de 310.4 mg disminuyó hasta 5.0 %.

CONCLUSIONES

La técnica analítica que utiliza el ácido sulfúrico para precipitar las grasas durante el análisis de plaguicidas organoclorados permite obtener muy buena recuperación de plaguicidas (mayor de 90 %) y un extracto listo para la corrida cromatográfica con una mínima cantidad (0.8 a 2.2 mg que constituye 0.22 a 1.87 % de la muestra procesada) de grasas determinadas gravimétricamente como sustancias no volátiles. Al comparar el costo de un mililitro de ácido sulfúrico concentrado con el costo de los adsorbentes habitualmente utilizados para separar las grasas en el extracto hexánico, resulta muy evidente que el uso del ácido sulfúrico es mucho más efectivo. La baja cantidad de residuos no volátiles presentes en el extracto tratado permite realizar múltiples corridas cromatográficas de muestras sin disminuir la capacidad de resolución de la columna cromatográfica. Al mismo tiempo se observa que el extracto analizado no contamina la fuente radiactiva (Ni^{63}) del detector de captura de electrones y no disminuye su respuesta. Los estudios de calidad analítica realizados para 6 tipos de muestras grasas con tres niveles de contenido de grasa en 10 repeticiones, mostraron un coeficiente de variación que oscila entre 4.8 y 12.5 %, indicando que es un método recomendable para la determinación de productos grasos contaminados con plaguicidas organoclorados.

REFERENCIAS

Batten P.L. y Hutson D.H. (1995). The mammalian metabolism of agrochemicals. John Whiley & Sons. New York., 268-302.

Cameron M.E. y van Staveren W.A. (1988). Manual on methodology for food consumption studies. Oxford University Press, New York, 1-206.

Carson R.L. (1962). Silent spring. Greenwich, Conn. Fawcett Crest, EUA.

Horton R. (2007). DDT for malaria control: the issue of trade. Lancet, 369, 248.

Kochi A. (2006). DDT is back: let us spray! The FASEB Journal, 20, 2427-2429.

Mandavilli A. (2006). Health agency backs use of DDT against malaria. Nature, 443, 250-251.

Nelson M. (1991). Past intake in design concepts in nutritional epidemiology. En: *Nutritional epidemiology.* (Margetts B.M., Nelson M. eds.) Oxford University Press, Oxford, 175-180.

Rogan W.J. y Chen A. (2005). Health risks and benefits of bis(4-chlorophenyl)-1,1,1-trichloroethane (DDT). Lancet, 366, 763-773.

Schapira A. (2006). DDT: a polluted debate in malaria control. Lancet, 368, 2111-2113.

Sempos C.T., Biefel R.R., Flegal K.M., Jhonson C. L., Murphy R. S. (1992). Factors involved in selecting a dietary survey methodology for national surveys. Aust. J. Nutr. Dis. 49, 96-105.

Waliszewski S.M., Gómez-Arroyo S., Carvajal O., Villalobos-Pietrini R. e Infanzón R.M. (2004). Uso del ácido sulfúrico en las determinaciones de plaguicidas organoclorados. Revista Internacional de Contaminación Ambiental, 20, 185-192.

Waliszewski S.M., Szymczynski G.A. (1990). Determination of phthalate esters in human semen. Andrología, 22, 69-73.

WHO (2007). Malaria. World Health Organization. Fact Sheet No. 94, consultada en: http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs094/en/.