



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**“DETERMINACIÓN DE GRASA EN LECHE MATERNA EN DOS
POBLACIONES DEL ESTADO DE MÉXICO”.**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

PRESENTA:

JESÚS NÁPOLES SERRANO

**ASESOR ACADEMICO
DRA. EN C.Q.B. ARACELI AMAYA CHÁVEZ**



TOLUCA, MÉX. A 24 DE ABRIL DE 2018

El presente trabajo fue desarrollado en los laboratorios del Departamento de Farmacia de la Facultad de Química de la Universidad Autónoma del Estado de México con financiamiento del proyecto de investigación “Exposición de lactantes a plaguicidas organoclorados a través de la ingestión de leche materna en el Estado de México”, con clave 3721/2014/CI registrado en la SIyEA. Así como en el laboratorio certificado de Química Ambiental a cargo del Q. Sergio Salazar, de la misma Facultad. El trabajo fue realizado bajo la dirección de la Dra. en C.B. Q. Araceli Amaya Chávez y la asesoría de la Q.F.B. Nayeli Lara Hernández.

DEDICATORIAS

Este trabajo lo dedico principalmente a mis padres que con su esfuerzo y sacrificio me permitieron tener una carrera y por ende un futuro, además de mis amigos y familiares que me apoyaron en el trayecto, a mi novia Zitlalli Osorio Cedillo que me ha apoyado en los momentos más difíciles de la carrera además de alentarme en todo momento, pero sobre todo en especial a mi difunto padrino y querido amigo Evelio Herrera Montaña (Q.E.P.D.) quien siempre apoyo mi entusiasmo y carrera.

Finalmente agradezco a mis sinodales y a mi asesora la Dra. en C.B.Q. Araceli Amaya Chávez por la oportunidad de presentar este trabajo para lograr titularme, así como el apoyo y asesoría de la Q.F.B. Nayeli Lara Hernández.

ACRONIMOS Y ABREVIATURAS

mL	Mililitros
LM	Lactancia Materna
mm³	Milímetro cubico
IgA	Inmunoglobulina A
Kcal/L	Kilocalorías/ Litro
AL	Ácido linoleico
AAL	Acido alfa linoleico
LC-PUFA's	ácidos grasos poliinsaturados
g	Gramos
α	Alfa
CV	Coeficiente de variación
β	Beta
ng/g	Nanogramos/gramo

Indice

DEDICATORIAS.....	III
ACRONIMOS Y ABREVIATURAS	IV
RESUMEN.....	VII
CAPÍTULO 1: MARCO TEORICO	1
1.1. LECHE MATERNA.....	2
1.1.1. COMPOSICION DE LA LECHE MATERNA MADURA	4
1.1.2. INMUNOLOGÍA DE LA LECHE HUMANA.....	10
1.2 CONTAMINANTES DE LA LECHE MATERNA	12
1.3 FUENTES DE EMISIÓN	15
1.3.1 TOXOCINÉTICA	17
1.3.2 EFECTOS A LA SALUD	19
1.4 ANTECEDENTES DE ESTUDIOS EN LECHE MATERNA.....	20
1.5 ALIMENTACIÓN Y CONTENIDO DE GRASA EN LA LECHE MATERNA	25
1.6 MÉTODOS DE ANÁLISIS DE GRASAS EN LECHE	29
1.6.1 CREMATOCRITO.....	30
1.6.2 ROSE GÖTTLIEB (MÉTODO DE REFERENCIA)	31
1.7 DESARROLLO Y VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS	32
1.7.1 PARÁMETROS DE VALIDACIÓN	33
1.8 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	37
HIPÓTESIS, OBJETIVOS Y METAS	38
HIPOTESIS.....	38
OBJETIVO GENERAL	38
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	38
CAPÍTULO 2: METODOLOGÍA.....	40
2.1 MATERIALES	40
2.2 REACTIVOS	40
2.3 PREPARACIÓN DE LA MUESTRA	41
2.4 PROCEDIMIENTO DEL METODO GERBER	42

2.5 CÁLCULOS Y EXPRESIÓN DE RESULTADOS	46
2.6 OBTENCIÓN DE LAS MUESTRAS	47
2.7 DESARROLLO DEL MICROMÉTODO	48
2.8. ESTANDARIZACIÓN DEL MICROMETODO.....	49
2.8.1 PRECISIÓN	49
2.8.2 REPRODUCIBILIDAD.....	49
2.8.3 TRAZABILIDAD	50
CAPÍTULO 3: RESULTADOS Y DISCUSIÓN	52
3.1 TECNICA ESTANDARIZADA	53
3.2. PRECISIÓN DEL MICROMÉTODO	53
3.2.1 REPRODUCIBILIDAD.....	56
3.3TRAZABILIDAD	57
3.3.1 HACER PRUEBA DE HIPÓTESIS.....	58
3.4 DETERMINACIONES DE GRASA EN LAS DOS POBLACIONES.....	59
3.5 CONCLUSIONES.....	70
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	71
ANEXOS	76
Anexo I Cuestionario realizado para determinar la importancia de la alimentación en el contenido de grasa en la leche materna.	76

RESUMEN

El presente trabajo tuvo como objetivo desarrollar y estandarizar un micrometodo para la determinación de grasa en leche materna, ya que las cantidades de muestra disponibles son pequeñas (menores a 2mL). Se tomó como base el método Gerber reportado en la NMX-F-387-1982 y la NOM-155-SCFI-2003, utilizando leche comercial y leche bronca de vaca para adaptar la técnica analítica y para su estandarización, se determinó la repetitividad, reproducibilidad (precisión) y la trazabilidad, con referencia al laboratorio de Química Ambiental, certificado por la Entidad Mexicana de Acreditación, A. C. (ema), la técnica, se realizó nuevamente determinando la precisión y la trazabilidad con leche materna. Se usó el micrometodo para determinar la cantidad de grasa en dos grupos Tenancingo y Toluca, Estado de México. Se aplicó un cuestionario para conocer procedencia, edad, tipo de alimentos consumidos y la frecuencia con la que lo hacen. Se usaron el 5 % de los reactivos y muestra en relación al método Gerber, los resultados mostraron que cumple con los criterios establecidos en la Guía de Validación de Métodos Analíticos del Colegio de QFB, México. Para la repetitividad se obtuvo un CV=3.2% para la leche bronca y un CV=3.9% para leche comercial. En la reproducibilidad resultó un CV=3.35%. Para trazabilidad se obtuvo un CV=4.86 %, con el micrométodo y de 4.73% en el laboratorio de referencia, En la prueba t de Student el valor de $p=0.747$ con un nivel de significancia del 95 %, indica que no existen diferencias significativas y por tanto la trazabilidad es aceptable. Las voluntarias de Tenancingo (50), con edad promedio de 23 años, 44% procedían de comunidades donde la principal actividad es la agricultura y la floricultura, la mayor

parte manifestaron consumir una dieta rica en grasas (carnes rojas, pollo, embutidos y lácteos) y cocinar con manteca de cerdo y aceite, el contenido de grasa promedio fue de 2.52 % (1.81 a 3.63%). Las participantes del grupo de Toluca (n=50), tenían una edad promedio de 26 años, el 54 % procedía de los municipios de Toluca, Zinacantan y San Antonio la Isla, manifiestan una dieta con menor grasa de origen animal, el promedio de grasa obtenido para este grupo fue de 2.26%. Se realizó un análisis de U de Mann-Whitney obteniendo un $p > 0.05$, concluyendo que no hay diferencias significativas. El micrométodo cumple con los criterios de validación determinados y fue eficiente en la determinación de grasa en las muestras analizadas.

CAPÍTULO 1: MARCO TEORICO

Una nutrición deficiente en la primer etapa de la vida aumenta el riesgo de padecer enfermedades agudas y crónicas además es responsable, directa o indirectamente, de hasta un 30% de las muertes en niños y niñas menores de 5 años de edad. La nutrición temprana inicia con la lactancia materna (LM) forma en que las madres alimentan naturalmente a sus bebés. La leche materna contiene anticuerpos que protegen al bebé de enfermedades infantiles.¹

En un recuento histórico sobre la alimentación del lactante, *Fomon* (1995) cita documentos del siglo II a.C. donde se menciona la lactancia materna. En el antiguo Egipto y en Babilonia, el destete se realizaba aproximadamente a los 3 años de edad. Entre los siglos IV y VII d.C., la edad del destete se hallaba generalmente entre los 20 y 24 meses de edad. Está bien documentado el uso de las nodrizas a partir de los siglos III o IV a.C. en Babilonia.²

Se conocía entonces sobre la importancia de alimentar al bebé recién nacido con leche humana, incluso cuando no fuera de su propia madre, unas veces porque ésta fallecía y otras por moda o comodidad de las familias de alto estatus social. Sin embargo, el uso de las nodrizas decayó con el aumento de la morbilidad y mortalidad infantil, y la transmisión de enfermedades tanto infecciosas como de “la mente”, como refiriera Burton en su libro publicado en 1651.²

1.1. LECHE MATERNA

La leche materna se forma en la propia glándula mamaria utilizando los componentes presentes dentro de esta y los nutrientes maternos necesarios. A pesar de que la composición de la leche materna expresa el estado nutricional de la mujer, esta queda en deudas generalmente. Son muchos los factores que influyen tanto en la composición como en el volumen de la secreción láctea, desde factores genéticos y nutrición materna, hasta las técnicas de extracción, almacenamiento y suministro al bebé.³

La leche humana va cambiando su composición química desde el parto, calostro, de transición y madurez.³

Se han identificado más de 200 componentes en la leche humana. La leche contiene células vivas (Macrófagos, neutrófilos, linfocitos, células epiteliales), membranas y glóbulos de grasa, rodeados de membranas.³

La leche materna sufre modificaciones de los elementos que la integran en diferentes etapas

1. Precalostro. Es un exudado del plasma que se produce en la glándula mamaria a partir de la semana 16 de embarazo. Cuando el nacimiento ocurre antes de las 35 semanas de gestación, la leche producida es rica en proteínas, nitrógeno total, inmunoglobulinas, ácidos grasos, magnesio, hierro, sodio y cloro. Tiene bajas

concentraciones de lactosa, ya que un recién nacido prematuro tiene poca actividad de lactasa⁹⁻¹¹.

2. Calostro. Se secreta cinco a siete días después del parto, aunque en las mujeres multíparas puede presentarse al momento del nacimiento del bebé. Tiene una consistencia pegajosa y es de color amarillento por la presencia de β -carotenos. Su volumen puede variar de 2 a 20 mL/día en los tres primeros días; a medida que el bebé succiona, aumenta hasta 580 mL/día hacia el sexto día.¹¹ Esta cantidad es suficiente para cubrir las necesidades del recién nacido por lo que no es necesario complementar con fórmulas lácteas. Tiene mayor cantidad de proteínas (97% en forma de inmunoglobulina A-IgA-), vitaminas liposolubles, lactoferrina, factor de crecimiento, lactobacilos *Bifidus*, sodio y zinc. En concentraciones menores se encuentran las grasas, la lactosa y las vitaminas hidrosolubles.¹³

El calostro protege contra infecciones y alergias ya que transfiere inmunidad pasiva al recién nacido por absorción intestinal de inmunoglobulinas; además, contiene 2000 a 4000 linfocitos/mm³ y altas concentraciones de lisozima.¹⁴ Por su contenido de motilina, tiene efectos laxantes que ayudan a la expulsión del meconio.⁵

3. Leche de transición. Su producción se inicia después del calostro y dura entre cinco y diez días.¹⁴ Progresivamente se elevan sus concentraciones de lactosa, grasas, por aumento de colesterol, fosfolípidos y vitaminas hidrosolubles; disminuyen las proteínas, las inmunoglobulinas y las vitaminas liposolubles debido a que se diluyen por el incremento en el volumen de producción, que puede alcanzar

660 mL/día hacia el día 15 postparto. Su color blanco se debe a la emulsión de grasas y a la presencia de caseinato de calcio.⁴

4. Leche madura. Comienza su producción a partir del día 15 postparto y puede continuar por más de 15 meses. Su volumen promedio es de 750 mL/día, pero puede llegar hasta 1,200 mL/día en madres con embarazo múltiple

1.1.1. COMPOSICION DE LA LECHE MATERNA MADURA

Tiene un perfil estable de sus diferentes componentes:

- Agua. Representa el 87% del total de sus componentes ^{4,5} y cubre satisfactoriamente los requerimientos del bebé, aún en circunstancias extremas de calor, por lo que no se requieren líquidos suplementarios.^{6,7}
- Energía. Aporta 670 a 700 kcal/L por medio de los carbohidratos y los lípidos.⁸
- Carbohidratos. Aportan energía al sistema nervioso central. El principal carbohidrato contenido en la leche es la lactosa; favorece el desarrollo de la flora intestinal por las bifidobacterias e impide el crecimiento de microorganismos patógenos por promover la acidez; ayuda a la absorción de calcio y mantiene estable la osmolaridad de la leche ya que mantiene bajas las concentraciones de sodio y potasio.⁴

- Proteínas. En la leche materna hay entre 8.2 y 9 g de proteína por litro; su concentración se reduce a medida que el tiempo de lactancia avanza, No importa que la madre no consuma altas cantidades de proteínas en su dieta. El tipo de proteínas que contiene la leche humana, ya que son de mejor biodisponibilidad gracias a la presencia de enzimas digestivas como la amilasa. ⁴

Las proteínas de la leche humana se dividen en dos grupos: ¹³ Proteínas del suero, la α -lactoalbúmina la más abundante (37%). Su importancia es tal ya que actúa como co-factor en la síntesis de lactosa. Tiene un peso molecular de 14,500 Da,^{27,28} mucho menor si se compara con la β -lactoglobulina, que llega a pesar 36,000 Da, como en la leche entera de vaca y por tanto, en fórmulas infantiles. La lactoferrina representa el 27% de total. Se liga al hierro para mejorar su transporte y absorción.¹⁰

La protección de la leche materna a mucosas como la boca, la nariz y el oído se debe a la inmunoglobulina A secretora⁷ que liga antígenos específicos en el tubo digestivo, ya que resiste el proceso de digestión debido a su estabilidad ya que conserva un pH bajo. Finalmente, la lisozima actúa frente a la pared celular de bacterias Gram positivas.¹⁰

La caseína, auxilia en el transporte de calcio, fósforo y aminoácidos que son usados para fines estructurales a nivel celular.¹⁶ En la leche materna existen dos de las tres subunidades: la β -caseína que se une con K-caseína y con iones de fósforo para formar pequeñas micelas (30-75 nm) comparado con los 600 nm de la α -caseína

contenida en la leche de vaca, se digiere mejor la leche materna en el intestino del bebé.

En los primeros diez días después del parto la leche humana tiene una relación suero/caseína de 90/10; posteriormente 60/40 hasta los ocho meses después del parto y se mantiene en 50/50 hasta el fin de la lactancia, lo cual la vuelve fácilmente digerible.

Entre los compuestos que contienen nitrógeno en la leche se encuentran los aminoácidos de los cuales sobresale la taurina, debido a que favorece la digestión de grasas y el desarrollo del sistema nervioso central; la carnitina, que es necesaria para la oxidación de lípidos dentro de la mitocondria y el ácido glutámico, la cistina y glutamina actúan como neuromoduladores y neurotransmisores.

Y los azúcares ligados a nitrógeno, péptidos y el factor de crecimiento epidérmico que contribuyen al desarrollo y función de la mucosa intestinal.

Se han identificado en la leche humana 13 nucleótidos; de los cuales destacan adenosina, citosina, guanosina, uridina y inosina que promueven el crecimiento y maduración intestinal, favorecen la función inmune, modifican la micro-flora intestinal, incrementan la biodisponibilidad del hierro y aumentan la concentración de lipoproteínas de alta densidad y los ácidos grasos de cadena larga.⁷

- **Vitaminas.** En la leche madura las vitaminas que son hidrosolubles tienen una concentración óptima para el desarrollo y nutrición del lactante; la niacina y la vitamina C son las que se encuentran en mayor cantidad. Dentro del grupo de liposolubles, la leche humana contiene mayores concentraciones de β -caroteno (precursor de vitamina A) y vitamina E.

Aunque no contiene niveles óptimos de vitamina D, los bebés alimentados con leche materna no padecen raquitismo (enfermedad producida por la falta de calcio y fósforo debido a una mala alimentación, que se caracteriza por deformaciones de los huesos que se doblan con facilidad y debilidad del estado general), debido a que en su lugar poseen el sulfato de esta, adquirida por vía transplacentaria que tiene actividad durante los primeros tres meses de vida del lactante.

En la leche materna los niveles deseables se alcanzan cuando la madre consume un suplemento; y cuando no es por ingesta esta se adquiere por la acción del sol y de los rayos ultravioleta.

La vitamina K no se encuentra en las cantidades óptimas en leche materna (2 $\mu\text{g/L}$) ya que los requerimientos diarios son de 12 $\mu\text{g/día}$, debido a esto debe aplicarse a todo recién nacido 1 mg intramuscular en dosis única.¹⁶

- **Minerales.** Destaca el hierro, se observa que las concentraciones se reducen a lo largo de la lactancia hasta mantenerse estable en los seis meses después del parto.

Se absorbe entre 45 y 75% a diferencia de la leche de vaca donde sólo se absorbe el 10%.

Una explicación para esto es que el hierro en la leche materna se encuentra unido a seroproteínas en 65 a 81% del total y una 2 a 14% unido a la caseína, esta al tener un paso lento por el estómago, sufre degradación.

La relación calcio/fósforo de la leche materna es de 1.2 a 2; esto es útil en la absorción hasta de 75% del calcio. De esto depende la formación del tejido óseo en la infancia.⁷

- Oligoelementos. Son elementos que son necesarios en la dieta ya que estos no se pueden sintetizar dentro del cuerpo un ejemplo es el zinc que forma parte de los sistemas activadores de enzimas; su concentración en leche humana es de 2 a 4 µg/mL y su biodisponibilidad es elevada entre un 45 a 58% de la fracción sérica de las proteínas.

Otro elemento importante es el flúor, a pesar de su baja cantidad en leche materna, es útil para evitar las caries, lo cual es evidente si se compara a los niños alimentados al pecho materno con los alimentados con biberón. Finalmente, el magnesio que debe mantenerse en equilibrio muy estable con el calcio en la leche humana para prevenir hipocalcemia en el recién nacido.¹⁶

- Grasas. El contenido de lípidos difiere entre mujeres (de 1 a 7 g/dL), lo que depende de diferentes variables (como alimentación, metabolismo entre otros). Las concentraciones de grasa aumentan desde 2 g/100 mL en el calostro, hasta alrededor de 4 a 4,5 g/100 mL a los 15 días post parto. De ahí en adelante siguen siendo relativamente estables, pero con bastantes variaciones interindividuales tanto en el contenido total de grasa, como en la composición de los ácidos grasos. El ácido α -linolénico y linoleico se conocen como ácidos grasos indispensables debido a que no pueden ser sintetizados por el ser humano y deben provenir de la dieta de la madre.¹⁶

Estos ácidos grasos se convierten en poli-insaturados (LC-PUFA's) tales como el ácido docosahexaenoico o DHA que es esencial en el desarrollo estructural y funcional de los sistemas visual-sensorial, perceptual y cognitivo del lactante; y el ácido araquidónico (AA; 20:4n-6), útil como sustrato para la síntesis de las prostaglandinas, los leucotrienos y trombohexanos, que modulan las respuestas inflamatoria e inmune, porque activan la proliferación de linfocitos, células natural killer, en adición de la producción de citocinas y de IgE en las células inflamatorias.¹⁶

La industria alimentaria no ha podido igualar la relación que hay de 1.3:1 entre ácidos grasos poliinsaturados/saturados de la leche humana, cuya importancia clínica es contribuir en la absorción de elementos esenciales como calcio y fósforo. Aporta concentraciones altas de colesterol, un lípido que se requiere en la proliferación de neuronas y en la mielinización de células gliales.⁴

Además, favorece la constitución y especialización de enzimas como la hidroximetilglutaril Co enzima A reductasa hepática y la 7 α hidroxilasa biliar, así como los receptores de lipoproteínas¹⁶, lo que durante la infancia se traduce en concentraciones séricas elevadas de colesterol total y lipoproteínas de baja densidad (LDL) para regular la diferenciación, proliferación y distribución de adipocitos en la vida adulta. Así mismo es un factor de protección contra la enfermedad coronaria aterosclerosa, ya que estas concentraciones séricas descienden.¹³ Finalmente, contiene lipasa, una enzima que mejora la digestión de las grasas por el lactante.⁴

1.1.2. INMUNOLOGÍA DE LA LECHE HUMANA

El sistema inmunitario del recién nacido es solo el 1% del total de un adulto. La leche materna debe ser considerada como “la primera vacuna” que recibe el niño, ya que lo protege contra numerosas infecciones a las que está expuesto durante el primer año de vida. Durante la lactancia se desarrolla y se activa el tejido linfoide relacionado con las mucosas (MALT) del bebé, en el intestino, los pulmones, las glándulas mamarias, las glándulas salivales y lagrimales, y las vías genitales.¹⁷

Este proceso se realiza a través del eje entero-mamario donde tienen lugar una serie de mecanismos: en el intestino, tejido linfoide y glándula mamaria de una madre lactante con objeto de producir una gran cantidad de IgA de secreción.¹⁷ Es un sistema que se opone a los antígenos, eficaz contra *E. coli*, *Salmonella*, *Campilobacter*, *Vibrio cholerae*, *Shigella* y *G. lamblia*.¹⁸ También se han encontrado

anticuerpos IgA contra proteínas de alimentos como la leche de vaca, la soya y el frijol negro. No promueve inflamación ya que no activa complemento, por lo tanto no consume energía. ¹⁹

Eje entero-mamario. Cuando la madre ingiere antígenos bacterianos, virales y otros, llegan al intestino y en el segmento terminal del íleon, donde se encuentra el tejido linfoide de las mucosas (MALT), son capturados por las células M y transportados a las placas de Peyer. Aquí se elaboran los antígenos de los macrófagos y son presentados a los linfocitos T, de donde surgen las subpoblaciones de linfocitos B, lo que hace proliferar las células precursoras productoras de anticuerpos. ¹⁹

Estas células emigran por los ganglios linfáticos regionales del mesenterio y llegan al conducto torácico, donde se dividen en tres compartimentos: las glándulas mamarias, los tejidos linfáticos del intestino materno y el sistema bronquial. En estas regiones maduran y se transforman en células plasmáticas productoras de IgA. Inicialmente las IgA son monómeros, en las células epiteliales de las glándulas exocrinas (mama, lagrimal, salival), los sistemas respiratorio, digestivo y urinario, se unen en pares con la cadena J para formar el dímero de IgA; se fijan a las glicoproteínas (componente secretor) para resistir y protegerse de la digestión enzimática y están listas para ser transportadas a través de las células epiteliales y aparecer en las secreciones exocrinas en la superficie las membranas mucosas. ¹⁹

La leche materna contiene gran cantidad de componentes inmunológicos tanto humorales como celulares que constituyen su función protectora contra virus, bacterias y parásitos.

1.2 CONTAMINANTES DE LA LECHE MATERNA

La leche humana, la sangre materna y el tejido adiposo son matrices pertinentes para evaluar la carga de contaminantes en el organismo. La OMS y la mayoría de los países han reconocido que la leche materna representa la muestra idónea para la biovigilancia de la exposición a compuestos orgánicos persistentes (COP's), pues se obtiene de forma no invasiva esta tiene un alto contenido de grasa y por tanto se pueden encontrar grandes cantidades de estos compuestos. Además que representa para el recién nacido una importante fuente de exposición (OMS, 2007), aunado a que es más fácil de obtener este tipo de muestra que la de tejido adiposo.⁴³

Prado et al. (2002), mencionan que el hecho de encontrar compuestos orgánico-persistentes en leche materna se ha convertido en un problema generalizado que muestra repercusiones en todo el mundo, ya que puede ser influenciado por factores como la zona geográfica, el clima, características culturales, sociales y económicas de cada lugar. También agregan que si bien el uso de plaguicidas órganoclorados ha sido prohibido o restringido, aún se han encontrado en leche y sus derivados.

Los plaguicidas se distribuyen en el organismo a través del torrente sanguíneo. Los compuestos liposolubles se unen a las lipoproteínas, mientras que las moléculas hidrosolubles lo hacen a las proteínas plasmáticas o permanecen disueltas en la sangre. Según su afinidad, el plaguicida se fijará en órganos o tejidos específicos,

como el hígado o los riñones, y aquellos que son lipofílicos se acumularan en tejidos como el adiposo y el nervioso.⁴⁵

Las sustancias químicas conocidas como compuestos orgánicos persistentes (COPs), son compuestos químicos que en su mayoría están conformados por cloro y carbono; se originan en la industria química por procesos de combustión o generación de electricidad, por lo que son uno de los principales factores ambientales causantes de enfermedades en los humanos, las que se expresan en patologías agudas o crónicas, dependiendo del tipo específico y de las características del contaminante. Se estima que dos tercios de los fallecimientos prematuros que ocurren en los países en vías de desarrollo se asocian con la contaminación del aire, que incluye los COPs tanto por exposición en lugares cerrados como en el exterior.²⁰

Desde 1987, se señala a los COPs, junto con el mercurio, como un problema de salud pública importante por su toxicidad ya que son volátiles, lo que provoca que puedan ser transportados a largas distancias, incrementando sus concentraciones en el ambiente y se biomagnifican en las cadenas alimentarias. En la actualidad se localizan numerosos compuestos organoclorados (OC) en todo el mundo, incluso lejos de la fuente de origen. En el ártico se han podido observar los efectos nocivos de estos compuestos, que amenazan a la integridad de los sistemas alimentarios tradicionales y a la salud.

Los plaguicidas órgano clorados (OCI) incluidos en el grupo de los COPs, según el Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente (2003), son 9: Aldrin, Endrin, dieldrin, DDT, Heptacloro, Toxafeno, Clordano, Mirex y Hexaclorobenceno, un producto químico industrial (bifenilospoliclorados, PCBs) y un subproducto de liberación no intencional al ambiente (Dioxinas y furanos).²²

Las características comunes a la mayoría de estos compuestos son su baja solubilidad en agua y su elevada solubilidad en la mayoría de los disolventes orgánicos, lo que les confiere un carácter altamente lipofílico. Además, en general poseen baja presión de vapor y una alta estabilidad química, así como una notable resistencia al ataque de los microorganismos.

Estas propiedades permiten predecir que estos compuestos y sus productos de transformación tenderán a acumularse en el tejido graso de los organismos vivos; lo que ocurre con la mayoría de estos plaguicidas.

Su baja presión de vapor, su gran estabilidad físico-química y su resistencia al ataque de los microorganismos, condicionan que su persistencia en el ambiente sea elevada.³¹

Las grasas están en la sangre y leche en forma de glóbulos esféricos suspendidos en la fase acuosa del suero y a su vez el glóbulo graso es una masa de triglicéridos de 3 a 4 micras de diámetro envuelta por una membrana formada por proteínas, fosfolípidos, colesterol, cerebrósidos y agua.⁴³

Esta condición favorece las características de fijación del contaminante órgano clorado. La leche humana está formada por grandes cantidades de glóbulos grasos muy pequeños que se forman en las células alveolares mamarias.⁴⁶

La movilización de lípidos en el organismo es de gran importancia cuando se tienen bioacumulados plaguicidas, ya que por medio de este proceso, tales sustancias pueden ser redistribuidas nuevamente por el organismo. Un caso típico se presenta durante el embarazo.⁴⁷

Teniendo en cuenta que los principales componentes de la leche son grasas y proteínas se puede asegurar que son un medio apto para el depósito y transporte de los compuestos organoclorados, por lo que, en la etapa del embarazo el cuerpo de la madre realiza un desplazamiento hacia las glándulas mamarias de grasas almacenadas en distintas partes del cuerpo para la formación de leche y por ende con este movimiento se encuentran unidos los plaguicidas.⁴⁷

1.3 FUENTES DE EMISIÓN

En relación con las fuentes de contaminación, las sustancias químicas y las toxinas pueden encontrarse en el agua, suelo, aire y en los alimentos, por lo que la exposición es virtualmente inevitable; la exposición puede ser ambiental o laboral, por ejemplo a través del uso productos cosméticos, agrícolas o medicamentos.³²

Un aspecto importante en el ciclo de estos compuestos, es el proceso de partición que puede ocurrir en la atmósfera (i.e., como gases y material particulado) y en las fases lipídicas del suelo y/o vegetación. Este fenómeno sería regulado entre otros factores, por el tamaño de las partículas, clima, fuentes de emisión y algunas variables físico-químicas de los compuestos, como el coeficiente de partición octanol-aire, temperatura y presión de vapor. Estas variables son limitantes ya que regulan su persistencia en las distintas matrices ambientales (vegetación, suelos, biota acuática y terrestre, sedimentos, etc.) ²².

Debido a las características de estos compuestos como su baja solubilidad en agua y su elevada solubilidad en la mayoría de los disolventes orgánicos les dan características lipofílicas, es decir que dichos compuestos así como sus productos de transformación tienden a acumularse en tejidos grasos de los organismos. Los tejidos ricos en grasas acumulan a los contaminantes lipofílicos del ambiente a través de interacciones fisiológicas de los componentes celulares, la determinación de su concentración en tejidos humanos como el tejido adiposo o el suero sanguíneo pueden reflejar la magnitud de una contaminación ambiental local.

Esto nos lleva a comprender un poco los riesgos de dichos compuestos así como saber cuál es el trayecto que siguen en el cuerpo y por tanto como ingresan en el cuerpo y su posible efecto en el organismo.

1.3.1 TOXOCINÉTICA

La toxicidad por vía dérmica depende de la rapidez con que el ingrediente activo sea capaz de alcanzar la circulación general, esto enfocado a sus propiedades fisicoquímicas directamente ya que un ejemplo un compuesto altamente lipofílico tiende a atravesar de una manera más rápida y eficiente las barreras lipídicas del cuerpo y de la toxicidad inherente al propio producto. Algunos ingredientes activos se absorben escasamente por esta vía (menos del 1%), mientras otros atraviesan fácilmente la barrera dérmica y la absorción es prácticamente total. La toxicidad aguda por vía dérmica se evalúa mediante la determinación experimental de la DL50: dosis letal media, es decir, la dosis (mg/kg de peso del animal) que causa la muerte del 50 % de los animales a los que se les ha administrado por aplicación sobre la piel.

Así como la exposición por la piel que puede darse mediante el ámbito laboral se debe tener en consideración factores como la vía inhalatoria (ambiental) ya que el material es altamente volátil y puede viajar por vía aérea incluso de una ciudad a otra y la persona inhala este material particulado, dependiendo del tamaño de las partículas se puede inferir que esta vía es más importante ya que el ingreso a la sangre es más probable y rápido. También se puede entrar en contacto con organoclorados por vía alimentaria pero la absorción de estos depende de más factores siendo los más importantes la inhalatoria y cutánea.

Una vez absorbidos los organoclorados y sus metabolitos se distribuyen rápidamente por todo los órganos y tejidos, aunque las concentraciones más

elevadas se alcanzan en el hígado (donde sufren la mayor parte de sus transformaciones y la mayoría de compuestos aquí se transforman en un compuesto biológicamente activo) y los riñones, antes de ser eliminados de manera prácticamente total por la orina y las heces. No obstante, los compuestos más lipofílico pueden almacenarse en pequeña proporción en los tejidos grasos y el tejido nervioso, dada su riqueza en lípidos, generalmente son liberados al hacer dietas entre otras maneras que eliminan los depósitos grasos del cuerpo, y debido a esto como se menciona anteriormente debe tenerse en cuenta que la leche materna en el embarazo usa las reservas de grasa de la madre para la formación de la leche y por esta razón también es una vía de excreción del cuerpo de este tipo de compuestos.

Estos puntos son importantes no solo para el caso particular de los humanos ya que una de las vías de exposición es la alimentaria podemos hacer referencia a la cadena alimentaria por lo que se tiene que abordar un tema muy importante “La bioacumulación” que es la capacidad de un organismo para concentrar algunas sustancias en sus tejidos y por tanto también “la biomagnificación” que se refiere al aumento continuo de la concentración de una sustancia en cada eslabón sucesivo de la cadena alimenticia.²⁴ También es definida como el aumento en la concentración de un químico en el organismo a través del tiempo, con la concentración del mismo químico en el ambiente. Este fenómeno se da como resultado de un almacenamiento más rápido que la degradación.²⁴

Es importante abordar este tema debido a que no somos los únicos expuestos a dichos compuestos, además de la exposición en vegetales también consumimos productos animales que al igual que nosotros están expuestos y almacenan en sus organismos los compuestos y como se menciona anteriormente a través del tiempo y de los diferentes eslabones estas concentraciones pueden crecer hasta ser una fuente de exposición muy importante.

1.3.2 EFECTOS A LA SALUD

Existe evidencia epidemiológica que hay una asociación significativa entre la exposición a compuestos organoclorados y los abortos espontáneos, el tiempo para lograr el embarazo, los defectos de nacimiento, el retraso del crecimiento intrauterino, ciertos cánceres en la infancia, la espermatotoxicidad y el daño cromosómico.²¹

La exposición de un niño a plaguicidas puede ocurrir tempranamente, tanto en la fase prenatal como durante la lactancia con leche materna, llevando objetos contaminados a su boca y por contacto cutáneo.

En los mamíferos (incluidos los humanos), los plaguicidas organoclorados en niveles de concentración de 1 a 5 mg por kilogramo de peso corporal, son capaces de inducir la producción de enzimas hepáticas para la transformación de compuestos tóxicos y alterando su metabolismo, al mismo tiempo que hace al receptor menos susceptible a los plaguicidas organoclorados.²³

El efecto sobre la salud humana de la exposición a plaguicidas depende de diferentes factores como el tipo de plaguicida y su toxicidad, la cantidad o dosis de exposición, la duración, el momento de exposición y la vía por la cual ocurrió. Los estudios epidemiológicos han descrito las relaciones estadísticas entre la exposición prenatal y de los niños a los plaguicidas en bajas dosis y el aumento de la pérdida de embarazos y malformaciones congénitas. La exposición crónica a bajas dosis de algunos plaguicidas puede causar efectos adversos, como problemas de desarrollo del sistema nervioso central, afectación del sistema inmunitario, desestabilización endocrina o cáncer, (Zayas, 2007).

1.4 ANTECEDENTES DE ESTUDIOS EN LECHE MATERNA

La población ha estado expuesta a compuestos orgánicos persistentes en el ambiente y baja degradabilidad, lo que provoca que se bioacumulan por su lipofiliidad en los depósitos grasos, se biomagnifican a través de la cadena alimentaria. La leche y la sangre maternas son matrices relevantes para evaluar la carga de contaminantes orgánicos persistentes en el organismo humano. Esta información apoya para establecer medidas para disminuir las concentraciones de estas sustancias en los alimentos, que son la principal fuente de exposición para la mayoría de las personas.

Investigaciones realizadas en varias partes del mundo muestran que los habitantes de zonas de agricultura intensiva donde se ha utilizado DDT, presentan mayor grado de contaminación que los pobladores de otras regiones. ⁴²

La persistencia de residuos de los COP's, se ha demostrado mediante estudios que han evidenciado su presencia en niveles de concentración significativamente altos en leche materna humana. El DDE y DDT han sido los compuestos hallados en el 100 % de las muestras analizadas en todos los países donde se efectuaron estos estudios (Cánada 1969, Italia 1973, España 1977, Mexico 1990) .⁴⁶

Las mayores concentraciones se han reportado antes y después de los 70's, donde era una práctica común el uso de este tipo de compuestos. Las concentraciones de DDT que se reportaron en leche materna para países como Estados Unidos y Canadá, (Ritsey, 1968) oscilaban entre 4 y 5 ppm, en España (Hernández, 1979) su concentración máxima fue de 10 ppm y en América latina se alcanzan valores máximos de 76 ppm en Guatemala, 32 ppm en El Salvador (de Campos, 1971, 1974) y 13 ppm en México (Gladen and Rogal, 1989). De acuerdo con la tendencia estas concentraciones bajaron años después en que se dejaron de emplear dichos compuestos (1985).⁴³

Minh et al. (2004) en su estudio en el sur y norte de Vietnam reporta concentraciones medias de DDT's en leche materna de 2100 y 2300 ng/g de grasa predominando el DDE entre el 85 al 90%. Estos son los valores más altos encontrados en el continente asiático, las cuales han disminuido en los últimos 10 años.

En México, el periodo de octubre de 2005 a febrero de 2006, se realizó el monitoreo de leche materna en dos poblaciones de Yucatán, una de mujeres que presentaron posparto temprano y la otra de mujeres que viven en una comunidad costera del puerto de Chelem, Progreso y en la clínica de lactancia del Hospital Materno Infantil de la ciudad de Mérida. En Chelem, 38 madres donaron muestras de 20 mL de leche el 58 % reportaron ser originarias de Chelem, el 18 % nacieron en la ciudad de Mérida, y el 27 % en otros estados de la República Mexicana; el 77 % tenía más de 10 años de residir en la comunidad. Los resultados mostraron que la mayoría de las muestras contenían plaguicidas organoclorados, Tabla 1.

Tabla 1. Porcentajes e intervalos de concentración encontrados en muestras de leche de mujeres de Yucatán, México³⁵

COP reportado	Porcentaje	Intervalo de concentración (ng/g de grasa)
p´p´DDE	84%	3041.46-5056.83
p´p´DDT	29%	209.75-123.09
o´p´DDD	47%	51.03-35.84
B-HCH	66%	612.31-694.75
γ-clordano	58%	576.51-240-31

En otro estudio realizado en Mérida, Yucatán (2009), las concentraciones de plaguicidas organoclorados y PCB en la leche materna de 148 mujeres que vivían

en Mérida fueron, en promedio, de 10 a 20 veces más bajos que los de las mujeres que viven en la costa de Chelem. Así, la concentración promedio de plaguicidas totales en Mérida fue de 362 ng/g lípido contra 5123 de Chelem. La concentración de PCB totales en Mérida fue de 6.77 contra 1541 ng/g lípido de Chelem. La de p,p'DDE en Mérida fue de 241 contra 3041 ng/g lípido de Chelem.³⁶

En Sonora, estado que presenta ecosistemas de características semidesérticas en la mayor parte de su territorio (95%) con climas muy secos, altas temperaturas y escasa precipitación (INEGI, 2010), se han observado exposiciones en el sector agrícola. Se llevó a cabo un estudio en los valles agrícolas de las localidades de El Júpare, Pueblo Yaqui, Ejido 5 de Junio, Pesqueira y Caborca. Los resultados mostraron que la población está en situación de exposición crónica a plaguicidas por la combinación de varias condiciones de riesgo: los años de trabajo que ha dedicado a las actividades agrícolas en campos donde existe probada presencia de sustancias químicas, las horas de trabajo que han dedicado a esta actividad (mínimo seis horas seis días a la semana), la escasa distancia que separa los campos agrícolas de sus residencias, la poca información que poseen de los riesgos a los que están expuestos, a lo cual se suman las deficientes o nulas prácticas de cuidado y prevención ante tales riesgos en su vida cotidiana (hogar y trabajo). Los resultados de los residuos de plaguicidas encontrados en los fluidos corporales de los encuestados se añaden a la confirmación de su exposición.

En estudios publicados en la revista de Ginecología y Obstetricia de México en el año 2000, destacan estudios y como el caso de pacientes del Hospital Estatal de Ginecología y Obstetricia del Instituto de Salud del Estado de Aguascalientes donde se analizaron varios tejidos de las pacientes (tejido graso, leche materna, sangre materna y de cordón umbilical) donde se encontraron cantidades importantes de plaguicidas organoclorados en todas las matrices. En leche materna se encontraron cantidades desde 7.6 a 10271 para DDT, y de 10 a 24 ng/g base lipídica para Dieldrin.

Se analizó el contenido de plaguicidas organoclorados en treinta y siete muestras de leche humana de madres provenientes de dos zonas distintas de la ciudad de México, entre los años 1997 y 1999. Los análisis se realizaron por cromatografía de gases, utilizando columna capilar y detector de captura de electrones. Los resultados encontrados en el hospital de la zona 1, presentaron los siguientes porcentajes de ocurrencia y concentración, expresados en mg/g base grasa: b-Hexaclorociclohexano, b-HCH: (37,8%, 0,70); dieldrín (62,2%, 1,74); aldrín (54%, 0,30); heptacloro (48,6%, 0,40); p-p' DDT (37,8%, 1,11); p-p' DDE (32,4%, 1,06). En el hospital de la zona 2, zona suburbana, se encontró: b-HCH (65%, 0,53); aldrín (76,9%, 0,06); heptacloro (38,4%, 0,13); p-p' DDT (26,9%, 0,18); p-p' DDE (96,1%, 0,65).⁵³

1.5 ALIMENTACIÓN Y CONTENIDO DE GRASA EN LA LECHE MATERNA

La lactancia es, en la vida de la mujer, un periodo más agotador que el propio embarazo y sus necesidades energéticas y nutritivas son muy elevadas (debe ingerir 500 calorías extra cada día debido al esfuerzo metabólico que implica la producción de leche).

En este caso es el bebé con la succión que ejerce al alimentarse es quien regula la cantidad de leche producida, esto quiere decir, que cada hijo establece una perfecta “simbiosis” con su madre: si se trata de leche rica en grasa, se regula una producción menor; por el contrario el bebé generará mayor succión y estimulará una mayor cantidad de leche cuando ésta sea pobre en grasas.

Para compensar las pérdidas nutritivas que sufre la madre sólo hay un medio: una alimentación adecuada que se mantendrá mientras dure la lactancia. Esto no significa que se deba comer en exceso, sino que la dieta se adapte a sus nuevas necesidades.

Con ello, se evitará que las madres engorden durante esta época (algo habitual) como consecuencia de hábitos alimentarios incorrectos adquiridos durante el embarazo. Conviene controlar periódicamente el peso de la madre lactante, con el fin de elevar o rebajar las calorías de la dieta si el peso disminuye o aumenta.

No obstante, en ningún caso se ha de iniciar en este periodo una dieta excesivamente baja en calorías (es decir, menor de 1500 calorías diarias), ya que las demandas nutritivas son muy elevadas.

Además, la madre que da el pecho emplea las reservas de grasa acumuladas durante el embarazo para la producción de leche, la supervisora de Neonatología de Clínica Santa María, Providencia, Región Metropolitana, Chile, explica que las grasas presentes en la leche están directamente ligadas con las grasas consumidas por la madre. Por tanto una alimentación adecuada es necesaria para recuperar progresivamente el peso previo al embarazo así como ofrecer la mejor calidad de alimento para el lactante.⁴⁹

Dicho esto, la leche materna, se ha estudiado a nivel científico y se ha podido ver que su composición nutrimental, es distinta no solamente entre la leche de una vaca y la leche de ser humano, sino también cambia de mamá a mamá, según un estudio publicado por la revista Scientific American (His milk, her milk, 2012). El sexo del bebé es un factor importante o incluso la leche materna de un prematuro será distinta a la de un bebé a término.⁵¹

Una dieta hipocalórica estricta es totalmente desaconsejable porque puede reducir la cantidad de leche producida y conducir a un estado de malnutrición en la madre. La alimentación de una madre en etapa lactante es recomendable que cumpla con los siguientes puntos para garantizar una correcta nutrición del bebé, así como que

la madre no tenga repercusiones ni falta de energía, asegurando así niveles óptimos de nutrientes, grasas y elementos benéficos de la leche materna:

- La alimentación deberá ser lo más variada posible, para que resulte completa y equilibrada⁴⁰.
- Las necesidades de proteínas son el doble que en condiciones normales. Una gran parte deberán ser de origen animal y se dará preferencia a las carnes con bajo contenido de grasas tal es el caso de alimentos provenientes de aves, pescado blanco y azul, huevos, leche y a otros derivados poco grasos.
- Aumentar la cantidad de alimentos ricos en hidratos de carbono complejos, como cereales (pan, arroz, pasta), patatas y legumbres.
- Se debe tener control en la ingesta de grasas (aceites, mantequilla, etc.) ricos en ácidos grasos esenciales y vitamina E⁴⁰.
- Las vitaminas A, D, E, C, B1, B2 y ácido fólico se requieren en mayor cantidad. Por ello, además de carnes y lácteos, ricos en vitaminas B1 y B2, es imprescindible consumir verduras y fruta fresca que aportan beta-carotenos, ácido fólico y vitamina C. Se aconseja que una pieza de fruta al menos sea rica en vitamina C (cítricos, melón, frutas tropicales, fresas). También conviene incluir verduras cocidas en combinación con primeros platos o como guarnición de los segundos, para cubrir el aporte de dichas vitaminas y el de la fibra necesaria para la madre.

- Como los lácteos son la principal fuente de calcio y este mineral es componente indispensable de la leche materna y evita la desmineralización de la madre, se deben tomar al menos 3/4 de litro de leche cada día, o bien medio litro de leche y otros lácteos (yogures, cuajadas, quesos poco maduros o fermentados, postres lácteos, purés y cremas elaborados con leche, queso fresco en ensaladas, bechamel...)⁴⁰.
- La leche utilizada en la preparación de platos será preferiblemente desnatada. La del desayuno y merienda puede ser entera o semidesnatada, por su aporte de vitaminas A y D.
- Ha de asegurarse un buen aporte de líquidos: zumos, infusiones y sobre todo agua, ya que la leche materna contiene un 85%-90% de agua que se debe reponer.
- Las bebidas alcohólicas están contraindicadas porque la concentración de alcohol en la leche es la misma que la del plasma materno.
- Moderar el consumo de bebidas excitantes (café, té, refrescos con cafeína), evitar el tabaco y algunos fármacos, ya que sus componentes pasan a la leche. Conviene leer bien los prospectos de los medicamentos y consultar al médico antes de tomarlas.

- Excluir de la dieta los alimentos que proporcionen mal sabor a la leche: ajo, cebolla, rábanos, espárragos, col, coliflor, coles de Bruselas, embutidos fuertes y especias en general.⁴⁰

Este tipo de alimentación es recomendable para mejorar la calidad de la leche para aportar al lactante los nutrientes necesarios mencionados en capítulos anteriores, siempre en cantidades recomendadas para evitar problemas de salud del lactante.⁴⁰

1.6 MÉTODOS DE ANÁLISIS DE GRASAS EN LECHE

El contenido de grasa de la leche y los derivados lácteos puede determinarse por medio de diversos métodos. Su determinación es muy importante en el control de calidad de la industria láctea, tanto para cuantificar su contenido nutricional como para detectar adulteraciones fraudulentas. Los métodos químicos tradicionalmente utilizados para la determinación de la materia grasa en lácteos se basan en medir la grasa separada, después de destruir su estado globular, o mediante la extracción de la grasa por medio de un disolvente.²⁸

La grasa existe en la leche en forma de emulsión que se estabiliza por medio de los fosfolípidos y las proteínas. El método Gerber se basa en la ruptura de la emulsión por la adición de ácido sulfúrico concentrado. La grasa libre puede separarse por centrifugación por la adición de una pequeña cantidad de alcohol amílico, el cual

actúa como un agente tensoactivo que permite la separación nítida de las capas de grasa y la capa ácido-acuosa. Así como más métodos son empleados para la determinación de grasas en la industria alimentaria, el más usado sigue siendo el método Gerber.²⁶

1.6.1 CREMATOCRITO

Este método es un poco más simple que el anterior se basa en el fundamento de la técnica de microhematocrito de la sangre, donde en el caso de la sangre, los glóbulos rojos se separan del resto de los componentes sanguíneos, en este caso las micelas de grasa se sedimentan con proteínas y forman la crema.

Se aplica la fuerza centrífuga para separar la grasa de la leche y conocer el contenido de grasa total en leche materna (madura). Este método al ser más simple es un tanto más práctico sin embargo se requiere de equipo espectrofotométrico de alta sensibilidad para determinar la concentración final de cada componente ya que, las grasas tienen una longitud de onda característica de 3.5 μm , las proteínas de 6.5 μm y la lactosa de 9.5 μm .

Para ello primero se introducen aproximadamente 60 μL de leche en un tubo capilar, se sella un extremo con plastilina y se centrifuga en un equipo para capilares a

3000g durante 3 minutos, después se lee el sobrenadante con una escala de micro hematocrito y el precipitado posteriormente el valor de Crematocrito se determina con la siguiente formula:

$$\text{Crematocrito} = \frac{a}{a+b} \times 100$$

Dónde:

a= lectura de la crema o sedimento en cm

Y b= lectura del sobrenadante. ³¹

1.6.2 ROSE GÖTTLIEB (MÉTODO DE REFERENCIA)

El contenido en materia grasa se determina por extracción de la materia grasa de una solución amoniacal-alcohólica de la muestra con ayuda de Éter Etílico y de Éter de Petróleo, evaporación de los disolventes, pesada de los residuos y cálculo en porcentaje de la muestra, según el método Rose-Gottlieb.²⁷

Los volúmenes etéreos conteniendo la grasa disuelta se vuelcan o sifonan a un matraz de bola previamente tarado. Se hacen cuatro o cinco extracciones y luego se evaporan los solventes y se determina la grasa extraída por pesada. El alcohol etílico, soluble en agua y éter, permite que este último entre en contacto más íntimo con la grasa²⁷.

En los productos lácteos permite además la precipitación de la caseína en forma muy finamente dividida y por consiguiente la rápida disolución de ésta en el hidróxido de amonio. El éter de petróleo reduce la solubilidad del agua en el éter etílico y previene la extracción por el éter de materiales.

1.7 DESARROLLO Y VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS

Para el desarrollo de un método analítico se deben tener en cuenta las características del analito a valorar en nuestro caso como la mayoría de los compuestos organoclorados se depositan en las matrices lipofílicas se parte de estudios donde especifican que estos se encuentran reportados en ng de analito/ g de matriz lipofílica (grasa). Por lo que en nuestro caso particular es importante determinar la cantidad de grasa en la leche materna para evaluar el potencial riesgo de contaminación a lactantes por medio de la ingestión de leche materna.

Partiendo de esto se requiere de un método validado y para los métodos actuales las cantidades de leche usadas son grandes e imposibles de obtener de una madre donadora se requiere un método confiable y preciso donde se usen menores cantidades de leche humana para su análisis.

Por ello se requiere de una validación que está definida como “El proceso por el cual se establece, mediante estudios de laboratorio, que las características de

desempeño del método cumplen con los requisitos para las aplicaciones analíticas previstas.³⁸

Implica la demostración de la determinación de las fuentes de variabilidad y del error sistemático y al azar de un procedimiento, no solo dentro de la calibración sino en el análisis de muestras reales.³⁸

El protocolo de validación del método analítico debe especificar:

- El propósito y el alcance
- Responsabilidades y competencias del equipo de trabajo
- Método de ensayo normalizado y documentado (*los pasos del método no pueden ser modificados durante la validación*)

1.7.1 PARÁMETROS DE VALIDACIÓN

REPETIBILIDAD: Precisión obtenida bajo las mismas condiciones de operación en un intervalo corto de tiempo (mismo día), por un mismo analista, en la misma muestra homogénea y en el mismo equipo. La guía de validación de métodos analíticos del colegio de QFB establece que se realicen mediciones mínimo por triplicado en un mismo día para evitar variaciones por condiciones climáticas así como reducir el error entre estas, para que entre mediciones el coeficiente de variación no exceda el 5% para poder aceptar que un método a validar es repetible, esto enfocado a métodos con matrices biológicas.

PRECISIÓN: al grado de concordancia entre resultados analíticos individuales cuando el procedimiento se aplica repetidamente a diferentes porciones de una muestra homogénea; se evalúa como repetibilidad y reproducibilidad, para esto al igual que en el punto anterior la guía de validación refiere que se realicen pruebas mínimo por triplicado y que el coeficiente de variación entre estas medidas no exceda el 5%, establecido para métodos bioanalíticos.

EXACTITUD: a la concordancia entre el valor obtenido experimentalmente y el valor de referencia.

REPRODUCIBILIDAD: Expresa la precisión entre laboratorios como resultado de estudios interlaboratoriales diseñados para estandarizar la metodología, La guía de validación del colegio de QFB establece para este caso particular que las pruebas donde se comparen dos métodos uno desarrollado con uno ya validado debe cumplir con el criterio de aceptación de métodos analíticos que involucren matrices biológicas, donde dice que el CV debe ser menor a 5%.

ROBUSTEZ: Medida de la capacidad de un procedimiento analítico de permanecer inafectado por pequeñas pero deliberadas variaciones en los parámetros del método y provee una indicación de su fiabilidad en condiciones de uso normales.

Cuando se evalúa un método que va a ser comparado con otro ya validado se determina la incertidumbre y la precisión del método. Se calcula el coeficiente de

variación y la desviación estándar o desviación típica definidos de la siguiente manera.⁴¹

DESVIACION ESTANDAR: es una medida del grado de dispersión de los datos con respecto al valor promedio. Dicho de otra manera, la desviación estándar es simplemente el "promedio" o variación esperada con respecto a la media aritmética.

La desviación estándar puede ser interpretada como una medida de incertidumbre. La desviación estándar de un grupo repetido de medidas nos da la precisión de éstas. Cuando se va a determinar si un grupo de medidas está de acuerdo con el modelo teórico, la desviación estándar de esas medidas es de vital importancia: si la media de las medidas está demasiado alejada de la predicción (con la distancia medida en desviaciones estándar), entonces consideramos que las medidas contradicen la teoría. Esto es coherente, ya que las mediciones caen fuera del rango de valores en el cual sería razonable esperar que ocurrieran si el modelo teórico fuera correcto. La desviación estándar es uno de tres parámetros de tendencia central; muestra la agrupación de los datos alrededor de un valor central (la media o promedio).³⁷

C.V.: En estadística, cuando se desea hacer referencia a la relación entre el tamaño de la media y la variabilidad de la variable, se utiliza el coeficiente de variación. Su fórmula expresa la desviación estándar como porcentaje de la media aritmética, mostrando una mejor interpretación porcentual del grado de variabilidad que la desviación típica o estándar.

Por otro lado, presenta problemas ya que a diferencia de la desviación típica este coeficiente es variable ante cambios de origen. Por ello es importante que todos los valores sean positivos y su media dé, por tanto, un valor positivo. A mayor valor del coeficiente de variación mayor heterogeneidad de los valores de la variable; y a menor C.V., mayor homogeneidad en los valores de la variable.³⁷

Existen diferentes formas de evaluar la precisión: repetibilidad, precisión intermedia, reproducibilidad.

En términos generales la precisión, debe determinarse, analizando un número suficiente de alícuotas, que permitan calcular estadísticamente la desviación estándar y la desviación estándar relativa. Se recomienda llevar a cabo un total de nueve determinaciones, que cubran el intervalo especificado en el procedimiento. Otra forma de evaluarlo es, analizando por lo menos seis muestras independientes a la concentración normal de trabajo.³⁸

Hay diferentes criterios de aceptación dependiendo de la matriz y del equipo de medición, en el caso de la repetibilidad y la precisión intermedia la desviación estándar relativa, es el parámetro de comparación para evaluar la precisión del sistema o del método analítico y debe ser menor o igual al 2%, y en algunos casos puede ser igual o menor del 3%. La reproducibilidad, se obtiene al realizar el procedimiento repetidas veces en un intervalo corto y sin que haya diferencias significativas entre los resultados.²⁵

1.8 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La leche materna es la más importante fuente de nutrientes (proteínas, carbohidratos, grasas y vitaminas), factores inmunológicos y otros constituyentes importantes para los bebés. Desafortunadamente, no está libre de contaminantes, siendo una de las principales vías de eliminación de plaguicidas organoclorados del cuerpo de las madres y al mismo tiempo la principal fuente de exposición a estos contaminantes por los bebés. Los plaguicidas organoclorados (OCI) se depositan en lípidos y al ser estos un componente muy importante de la leche materna el peligro de contaminación del bebé por vía alimenticia es muy alto.

Para evaluar la exposición de los bebés a éstos compuestos, es necesario determinar su concentración en leche materna expresando los resultados por el contenido de grasa en cada muestra. Los métodos convencionales para la determinación de grasa en leche comercial, utilizan volúmenes que difícilmente se obtienen de las voluntarias que participan en los estudios ya que generalmente donan cantidades pequeñas que no son suficientes para el análisis requerido, motivo por el cual es necesario desarrollar un micrométodo que sea reproducible con los métodos normalizados para emplearlo en la investigación en poblaciones expuestas y al mismo tiempo reducir el uso de reactivos, residuos y costos.

HIPÓTESIS, OBJETIVOS Y METAS

HIPOTESIS

El micrométodo que se desarrollará en la Facultad de Química de la UAEMex, tomando como base el método Gerber, será eficaz y preciso para la determinación de grasa en muestras de leche materna humana.

OBJETIVO GENERAL

Desarrollar y estandarizar un micrométodo para cuantificar el contenido de en muestras de leche materna humana y aplicarlo en dos poblaciones del Estado de México (Tenancingo y Toluca).

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1.- Desarrollar un micrométodo para cuantificación de grasa en un volumen menor a 2 mL de leche de vaca basado en el método Gerber de la NOM-155-SCFI-2003.
- 2.- Determinar la precisión y reproducibilidad del micrométodo.
- 3.- Adaptar la estandarización del micrometodo desarrollado a partir del cálculo de trazabilidad.
- 4.- Determinar el contenido de grasa en muestras de leche materna humana.

5. Realizar los análisis estadísticos para determinar las diferencias entre ambas poblaciones de estudio.

CAPÍTULO 2: METODOLOGÍA

En el presente trabajo se desarrolló un micrométodo para la cuantificación de la grasa contenida en leche materna que cumpla con los criterios de validación para muestras biológicas, tomando como base el método Gerber descrito por la NOM-155-SCFI-2003, “Leche, fórmula láctea y producto lácteo combinado-denominaciones, especificaciones fisicoquímicas, información comercial y métodos de prueba”, además de la NMX-F-387-1982. “Alimentos. Leche fluida determinación de grasa butírica por el método de Gerber”.

2.1 MATERIALES

Butirómetro de Gerber de 0 a 8% con tapón de hule

Una centrífuga de Gerber.

Pipeta de 11 mL volumétrica para Leche.

Pipeta de 10 mL volumétrica bola de seguridad.

Pipeta de 1 mL volumétrica con bola de seguridad.

Baño María.

2.2 REACTIVOS

Todos los reactivos que se indican deben ser grado analítico.

Ácido sulfúrico puro, de peso específico 1,820 +/- 0,005 a 20°C aproximadamente al 90%, libre de óxido de nitrógeno y otras impurezas. Se puede preparar a partir de H₂SO₄ 98% w/w, midiendo aproximadamente 908 mL, más 160 mL de agua (verificar sistemáticamente el peso específico del ácido sulfúrico).

Alcohol amílico 98% v/v, densidad a 20°C de 0,808 a 0,818 g/mL. En lugar de alcohol amílico se puede utilizar alcohol iso-amílico libre de grasa y furfurool, de peso específico de 0,810-0,812 a 20°C.

Tanto el ácido sulfúrico como el alcohol de cada lote debe someterse a un control de pureza, colocando en un butirómetro, 11 mL de agua destilada, añadir 10 mL de ácido sulfúrico y 1 mL de alcohol amílico, cerrar el butirómetro y centrifugar durante 3 minutos. Después de 24 h de reposo, no debe observarse ningún trozo de grasa visible en la superficie.²⁶

2.3 PREPARACIÓN DE LA MUESTRA

Para la estandarización del método se analizaran muestras de tres diferentes marcas de leche pasteurizada, tres de leche bronca y una muestra compuesta de leche materna.

Antes de analizar las muestras de leche deben atemperarse a 20°C. Es preciso alcanzar esta temperatura, porque todas las pipetas aforadas están calibradas a

20°C. Si a 20°C no se obtiene un buen reparto de la materia lipídica, se calienta la muestra de 35°C-40°C, se mezcla con cuidado y se enfría rápidamente a 20°C ± 2°C.

Una vez atemperada a 20°C, las muestras de leche se deben mezclar cuidadosamente, para evitar la formación de espuma, y permitir un reparto homogéneo de la materia grasa, inmediatamente proceder a la determinación.²⁶

2.4 PROCEDIMIENTO DEL METODO GERBER

Colocar los butirómetros limpios y secos en una gradilla, se introducen en cada uno de ellos 10 mL de ácido sulfúrico, usando la pipeta volumétrica, cuidando de no impregnar el cuello y las paredes del butirómetro.

Mezclar la muestra a analizar, invirtiendo el recipiente tapado en tres o cuatro tiempos e inmediatamente medir 11 mL de leche (realizar el análisis por duplicado), depositándola en los butirómetros, de la siguiente manera:

La punta de la pipeta debe estar apoyada en posición oblicua (aproximadamente en ángulo de 45°) contra la pared interna del cuello del butirómetro, para permitir que la leche se deslice a lo largo del vidrio y se superponga al ácido sulfúrico sin producir rastros de ennegrecimiento (evitar que el ácido y la leche se mezclen, Fig. 1).²⁶



Fig. 1 Butirómetro con el ácido y leche adicionados.

Para terminar, se añade 1,0 mL de alcohol amílico dentro de cada butirómetro por medio de la pipeta volumétrica de 1mL. Tapar el butirómetro, utilizando el pulsador como punto de presión (Figura 2).²⁶



Fig. 2 Butirómetro con los tres componentes.

Agitar los butirómetros en dos tiempos; en un primer tiempo se debe realizar una agitación vigorosa, sin interrupción y sin inversiones, hasta conseguir que la leche y el ácido sulfúrico se mezclen y la proteína se disuelva (Fig. 3).²⁶



Fig. 3 Butirómetro después de agitarse.

Posteriormente invertir los butirómetros de 6 a 8 veces, permitiendo que el ácido de la sección de la escala graduada y el de la ampolla terminal se mezcle. La agitación termina cuando no queden vestigios de caseína sin disolver.²⁶

Durante esta operación se recomienda tener el Butirómetro envuelto en una tela, ya que la mezcla de ácido sulfúrico con la leche ocasiona una reacción exotérmica.²⁶

Calentar los butirómetros en el baño María a una temperatura entre 60 a 65°C durante 15 min. Al finalizar este tiempo sacar los butirómetros y secarlos, (Figura. 4)²⁶



Fig. 4 Se introducen los butirómetros al baño maría.

Inmediatamente centrifugar durante 5 minutos, a la velocidad de 1000 a 1200 rpm. Una vez concluida la centrifugación, colocar los butirómetros, con la escala hacia arriba, en un baño María a 65°C, durante 5 a 10 minutos (tiempo necesario para permitir la separación total de la grasa), es imprescindible que la capa de la grasa en la escala se mantenga enteramente inmersa en el agua caliente (Fig. 5).²⁶



Fig. 5 Se sacan de la centrifuga con cuidado.

Remover el butirómetro del baño de agua y alzarlo verticalmente hasta que el menisco de la columna de grasa esté al nivel de los ojos. Ajustar la columna de grasa, girando con cuidado el tapón hasta colocar los límites de la capa de grasa dentro de la escala, haciendo coincidir la parte inferior de la capa de grasa con una de las divisiones de la escala del butirómetro (Fig. 6).²⁶



Fig. 6 Se deja reposar en la gradilla para poder ver la separación.

La diferencia entre esta división y la correspondiente al menisco de la parte superior de la capa de grasa, indica el contenido de grasa de la leche en porcentaje w/v, repetir la centrifugación por 5 minutos y leer el resultado. Como se ilustra en la figura 7²⁶.

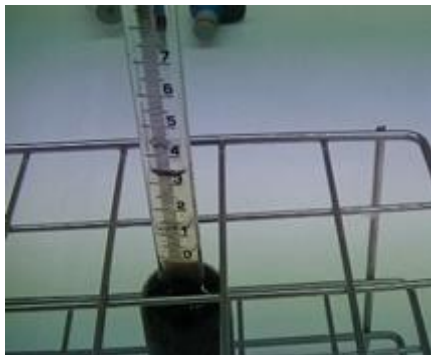


Fig. 7 División entre la grasa y el material de análisis.

2.5 CÁLCULOS Y EXPRESIÓN DE RESULTADOS

El contenido de grasa presente en la muestra, expresado en porcentaje, se calcula de la siguiente manera:

$$B-A$$

Dónde:

A es la lectura al inicio de la columna de grasa.

B es la lectura de la parte superior de la columna de grasa

El resultado se expresa directamente en por ciento de la grasa contenida en la leche (% w/v) es decir g de grasa/100 mL de leche.

Para convertir el resultado expresado en peso/volumen (w/v), se divide el valor numérico de la lectura entre la densidad de la leche. Expresando el resultado en (w/w), es decir gramos/100 g de leche.²⁶

2.6 OBTENCIÓN DE LAS MUESTRAS

La toma de la muestra se llevó a cabo en las instalaciones de los hospitales General Tenancingo “Miguel Hidalgo y Costilla” y el Hospital Materno Infantil “Mónica Pretelini de Peña” ambos de la dependencia del Instituto de Salud del Estado de México, con todas las medidas de higiene del caso.

Se le indicó a la madre donante el uso de bata estéril con abertura hacia delante, gorro y tapaboca. Luego del lavado de manos con agua y jabón, lavado de mamas con agua y secado con gasa estéril, se procedió a la toma de muestra, para el efecto se utilizó un procedimiento referido como “extracción manual”, el cual consistió en extraer la leche sin la utilización de ninguna bomba de succión. La donadora realiza con las manos movimientos circulares y realizando presión sobre la areola.

Las muestras se depositaron en recipientes de vidrio ámbar con tapa de baquelita, estériles, para luego ser transportadas en un contenedor con hielo hasta el laboratorio de la Facultad de Química UAEMex, también se realizaron encuestas para determinar la alimentación de las dos regiones, edad de la madre, meses del neonato para asegurar que las donadoras se encuentren en el primer trimestre de lactancia y lugar de procedencia para evaluar el grado de exposición a organoclorados de las madres implicadas.

2.7 DESARROLLO DEL MICROMÉTODO

Se usaron cantidades de reactivos proporcionales (5%) bajo las condiciones establecidas por la NOM-155-SCFI-2003

-550 μ L de Leche bronca de vaca

-500 μ L de ácido sulfúrico al 90%

-50 μ L de alcohol amílico

Al inicio para establecer los parámetros de validación se realizaron análisis con 3 muestras de leche bronca de vaca y 3 con muestras de leche pasteurizada. Se analizaron 4 muestras por dos analistas, obteniendo variaciones en los resultados, esto debido a que se siguió la norma actual que cambió las condiciones con respecto a la anterior, debido a esto se hicieron modificaciones y se siguieron los pasos de la NMX-F-387-1982, donde se establece alcohol iso-amílico y no alcohol amílico, al igual mencionaba que debe volver a introducirse al baño después de centrifugar.

También surgieron inconvenientes con la graduación de los tubos para obtener un resultado porcentual real, ya que se usaron como primera instancia tubos eppendorf, no resultó ya que la graduación de estos no permitía una lectura correcta.

Posteriormente se probó con tubos de ensaye de 13x100 sin obtener buenos resultados, como consecuencia se probaron tubos cónicos de vidrio graduado pero la centrifuga con la que se contaba no estaba apta para estos tubos y como consecuencia a dichas pruebas fallidas se usaron tubos de hematología wintrobe ya que su graduación permitió leer a la perfección la cantidad de grasa en las muestras y así obtener un resultado porcentual real.

2.8. ESTANDARIZACIÓN DEL MICROMETODO

2.8.1 PRECISIÓN

La prueba se realizó por sextuplicado utilizando leche bronca de vaca comprada en tres localidades y de leche pasteurizada de tres marcas diferentes. Se calculó la media, desviación estándar y coeficiente de variación los resultados se muestran en la Tabla 1 en el capítulo 3.

2.8.2 REPRODUCIBILIDAD

Se realizaron los análisis por triplicado del contenido de grasa en leche materna obtenida del banco de leche del Hospital General Tenancingo “Miguel Hidalgo y Costilla”. La determinación se realizó en dos días diferentes y por dos analistas, como lo sugiere la “Guía de validación de métodos analíticos del colegio de QFB”. Se calculó la media, desviación estándar y coeficiente de variación por analista y total.

2.8.3 TRAZABILIDAD

La trazabilidad que es definida por la Organización Internacional para la Estandarización como la propiedad del resultado de una medida o del valor de un estándar donde éste pueda estar relacionado con referencias especificadas, usualmente estándares nacionales o internacionales, a través de una cadena continua de comparaciones todas con incertidumbres especificadas (ISO 9001:2008), que para nuestro caso es la comparación entre el Departamento de Farmacia (micrometodo desarrollado) y el laboratorio de Química Ambiental que cuenta con el certificado emitido por la EMA, como referencia estándar.

Las determinaciones se realizaron por cuadruplicado utilizando leche materna y se calculó una *t* de student para comprobar si no había diferencias significativas entre las determinaciones realizada entre los dos métodos, para este fin la Guía de Validación de métodos Analíticos del colegio de QFB en su punto 8.7 pp 30 donde especifica que para la metodología se necesitan analizar las muestras mínimo por triplicado para evaluar los resultados interdía, así como por dos analistas en días distintos, los cuales deben usar los mismos equipos y condiciones.

Y ya que la NOM-177-SSA1-2013 define como reproducibilidad a la precisión de un método analítico que expresa la variación obtenida entre determinaciones independientes realizadas en el mismo laboratorio, pero en diferentes condiciones

de análisis, tales como días, equipo, columnas o analistas se realizan varias determinaciones por triplicado por dos analistas en dos días distintos.

CAPÍTULO 3: RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los pasos que se siguieron en el desarrollo del micrométodo para la cuantificación de grasa en leche materna utilizando volúmenes inferiores a 2 mL fueron los siguientes:

- 1.- Se depositan en tubos de ensaye de 13x100, 500 μ L de ácido sulfúrico al 90% cuidando que el ácido no roce las paredes del tubo.
- 2.- Por las paredes del tubo se agrega lentamente 550 μ L de leche bronca de vaca.
- 3.- Se adicionan al tubo 50 μ L de alcohol amílico.
- 4.- Se agita para mezclar perfectamente.
- 5.- Con una pipeta Pasteur de vidrio de talle largo transferir todo el contenido de los tubos a los tubos wintrobe.
- 6.- En Baño María previamente calentado a una temperatura entre 60-65 °C introducir los tubos wintrobe durante 15 min.
- 7.- Centrifugar los tubos wintrobe durante 2 min a 1100 rpm.
- 8.- Introducir nuevamente los tubos al baño maría entre 60-65 °C durante 5 min.
- 9.- Observar la separación de la grasa y realizar los cálculos para determinar la cantidad de grasa obtenida.

Nota: los tubos tienen una capacidad de 1.2 mL y una graduación de 1 a 12 por lo que cada línea es proporcional a 0.1 mL o 100 μ L y sabiendo esto:

Volumen total de leche 550 μ L = 100 %

Lectura obtenida de grasa = X%

3.1 TECNICA ESTANDARIZADA

Se realizó la estandarización utilizando leche bronca de vaca, con el propósito de establecer las condiciones óptimas de análisis y comparar los valores obtenidos con el micrométodo con valores conocidos ya que se usaron tanto leche bronca, para determinar variabilidades, así como leches comerciales con valores reportados en marbete como referencias y apreciar que los valores experimentales correspondan a los valores reportados en marbete, para después realizar los análisis con las mejores condiciones con leche materna.

3.2. PRECISIÓN DEL MICROMÉTODO

Los resultados de la precisión del método se muestran en la tabla 1, donde se observa que el contenido de grasa promedio obtenido en la leche bronca fue de 3.3% y el de la leche envasada del 4.0%, habiendo mayor variabilidad en esta última. Al determinar el coeficiente de variación para cada muestra se obtuvieron valores menores al 5%, establecido así por la guía de validación del colegio de QFB de México como criterio de aceptación para métodos con matrices biológicas, un

valor promedio de 3.2 % en leche bronca y de 3.9 % en leche envasada, lo que indica que el método es repetitivo.

En el Departamento de Alimentos y Biotecnología de la UNAM, reporta que han encontrado para la leche entera un contenido de grasa en un intervalo entre 3,5 y el 5% y para leches descremadas de menos del 0.5% donde se puede apreciar que los valores encontrados en este estudio concuerdan con el valor de referencia.

Por otro lado la Universidad de Zulia, Facultad de Ciencias Veterinarias, de Venezuela en su documento “Cátedra de Ciencias y Tecnología de la Leche” (Maracaibo, 2004) nos ofrece datos para la leche bronca o cruda y menciona que el contenido de grasa puede variar de menos de 3 % a más de 6 %, dependiendo de la raza, y la alimentación, obteniendo en promedio de 4.1 % de grasa para la leche producida en el Estado Zulia⁵⁰, valores cercanos a los obtenidos en este estudio (3.3%). Cabe resaltar que las comunidades de donde provenían las muestras son áreas rurales del Estado de México donde las vacas son alimentadas principalmente por pastoreo.

Tabla 1. Contenido de grasa en las muestras de leche comercial y leche bronca de vaca con el micrométodo desarrollado.

Procedencia	M1	M2	M3	M4	M5	M6	Prom.	S	C.V. %
Agropecuaria Tenancingo	3.36	3.28	3.18	3.52	3.18	3.18	3.335	0.1436	4.307
Comunidad Tepoxtepec	3.25	3.42	3.45	3.36	3.34	3.34	3.3425	0.0704	2.106
Calimaya	3.28	3.40	3.30	3.32	3.13	3.32	3.2825	0.1132	3.450
Leche comercial 1	3.26	3.44	3.46	3.36	3.08	3.12	3.285	0.1552	4.725
Leche comercial 2	3.26	3.36	3.38	3.52	3.16	3.26	3.325	0.1535	4.616
Leche comercial 3	5.38	5.23	5.26	5.46	5.54	5.36	5.4025	0.1322	2.44

NOTA: resultados en porcentaje (% w/v) de leche, M= muestra, S= desviación estándar y CV= coeficiente de variación.

Para el caso de las leches comerciales, las marcas comerciales 1 y 2, los marbetes indicaban un contenido de grasa de 3.3 g/100 mL (3.3 %) y para la marca comercial 3 que se trataba de una leche fortificada con vitaminas, minerales y otros

componentes que refuerzan la nutrición de los niños, reportaba en su marbete 5.5 g de grasas contenidas en porciones de 100 mL (5.5%). Como puede observarse en la Tabla 1, el contenido de grasa determinado en el laboratorio con el micrométodo coinciden, por ejemplo para la marca comercial 3, se obtuvo un promedio de 5.4 % y un intervalo de entre 5.23 a 5.46 %.

3.2.1 REPRODUCIBILIDAD

Como se observa en los resultados de la Tabla 2, los valores obtenidos para el contenido de grasa en la leche materna estuvieron en un intervalo entre 2.46 a 2.84 con un promedio de 2.6764 % y el coeficiente de variación promedio fue de 3.36 %, valor menor al 5% por lo que se cumplen con los criterios de aceptación establecidos por la guía de validación de métodos analíticos del Colegio de QFB de México para métodos biológicos, en su punto 8.7 pp 30, donde especifica que para la metodología se necesitan analizar las muestras mínimo por triplicado para evaluar los resultados interdía, así como por dos analistas en días distintos, los cuales deben usar los mismos equipos y condiciones. Y ya que la NOM-177-SSA1-2013 define como reproducibilidad a la precisión de un método analítico que expresa la variación obtenida entre determinaciones independientes realizadas en el mismo laboratorio, pero en diferentes condiciones de análisis, tales como días, equipo, columnas o analistas se realizan varias determinaciones por triplicado por dos analistas en dos días distintos.

Tabla 2: Reproducibilidad de los resultados de grasa (% w/v) en una muestra de leche materna obtenida en el Hospital General Tenancingo.

	Analista 1	Analista 2
Día 1	2.72 2.62 2.84	2.72 2.72 2.68
Día 2	2.46 2.65 2.70	2.72 2.63 2.65
Promedio	2.665	2.687
S	0.114	0.036
CV (%)	4.309	1.363
CV Global (%)	3.35	

3.3TRAZABILIDAD

Se realizó una comparación de los valores mostrados en la Tabla 3 donde se usó una muestra Obtenida del Hospital General de Tenancingo “Miguel Hidalgo y Costilla” para este propósito, se realizó el análisis en los laboratorios de Farmacia (DF) y el laboratorio que cuenta con el método validado Laboratorio de Química Ambiental (QA), ya que la guía de validación de métodos analíticos sugiere que se realicen mínimo 3 mediciones en condiciones iguales para comparar los resultados entre ambos métodos, el que se va a validar y el ya validado, que deben similares y su coeficiente de variación entre mediciones menor al 5% como se establece para métodos biológicos.

Tabla 3: Comparación del contenido de grasa (% w/v) obtenida en dos laboratorios diferentes con una muestra de leche materna.

Laboratorio	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3	Muestra 4	Prom.	S	C.V.
DF	3.00	2.96	3.20	2.85	3.0025	0.146	4.86
QA	2.94	3.00	2.96	3.25	3.0375	0.143	4.73

Al observar los coeficientes de variación se puede ver que son menores al 5% criterio de aceptación para la comparación de métodos (Método desarrollado y de referencia) para un tipo de muestra, por lo que la trazabilidad del método cumple y puede ser aceptada.

Asimismo se realizó una prueba de t de Student mediante, el programa Minitab donde se comparan las medias de los resultados obtenidos por ambos laboratorios.

3.3.1 HACER PRUEBA DE HIPÓTESIS

Diferencia = μ (DF) - μ (QA)

Estimación de la diferencia: -0.035

IC de 95% para la diferencia: (-0.299, 0.229)

Prueba T de diferencia = 0 (vs. \neq): Valor T = -0.34 Valor p = 0.747 GL = 5

Se obtuvo una p = 0.747, por tanto se concluye que no hay diferencias significativas entre las mediciones. El método desarrollado puede considerarse con una trazabilidad aceptable y se acepta la validación del micrométodo.

3.4 DETERMINACIONES DE GRASA EN LAS DOS POBLACIONES

El total de muestras colectadas fueron 100, 50 del grupo de Tenancingo y 50 del de Toluca. La edad promedio de las mujeres de Tenancingo fue de 23 años y el de Toluca de 26 años, a pesar de que el intervalo de edad fue similar para ambos grupos, (Tabla 4), la mayor parte de las mujeres de Tenancingo 44 (88%) tienen a sus bebés a una edad más temprana (15 a 23 años) que las del grupo de Toluca 37 (74%) que son madre entre los 18 a los 29 años probablemente debido a la diferencia al acceso para la atención médica, a la cultura y la información que se transmite a la población.

Tabla 4. Características de las donantes de los grupos de estudio

Grupo	Número de donantes	Rango de edad (años)	Edad promedio (años)
Toluca	50	16-39	26
Tenancingo	50	15-36	23

El lugar de procedencia de las voluntarias del grupo de Tenancingo fue principalmente de lugares con alto índice de explotación agropecuaria, es decir la mayor parte de la población encuestada está expuesta a agroquímicos, entre los que se encuentran plaguicidas organoclorados (OCI), tal es el caso de las que viven en la zona de Santa Ana Ixtlahuatzingo (24%) donde hay invernaderos y zonas de explotación de floricultura, Acatzingo de la Piedra con un 20% de madres que se

encuentran en una zona donde el comercio de productos agrícolas es una fuente importante de ingresos, el 20 % son de Tenancingo de Degollado. Para el caso del grupo de Toluca, las voluntarias proceden de la Zona Metropolitana del Valle de Toluca, principalmente de los municipios de Toluca (36.1%), Zinacantepec (19.4%), San Antonio la Isla (19.4%), Metepec (11.1%), Lerma (8.3%) y Mexicalzingo (5.5%).

Se realizaron las determinaciones de grasa en los dos grupos de estudio: Tenancingo y Toluca obteniéndose los resultados que se muestran en la Tabla 5. Cabe aclarar que algunos resultados de las muestras procesadas no fueron incluidos, debido a que al realizar la determinación, la desintegración de sólidos no se realizaba de manera adecuada (se apreciaba una capa negra de proteína sin desnaturalizar) lo que causaba interferencias en las lecturas, en el método Gerber se refieren problemas con muestras con altos contenidos de proteínas, azúcares y otros sólidos y debido a esto el ácido empleado era insuficiente y por tanto se excluyeron.

Tabla 5. Porcentaje de grasa obtenida en muestras de leche materna de dos poblaciones: Toluca y Tenancingo.

Muestra	Tenancingo	Toluca
1	2,72	1,81
2	2,72	2,72
3	1,81	3,63
4	1,81	1,81
5	1,81	1,81
6	1,81	1,81
7	2,72	2,72
8	3,63	1,81
9	2,72	2,72
10	1,81	1,81
11	2,72	3,63
12	1,81	2,72
13	1,81	1,81
14	2,72	1,81
15	1,81	1,81
16	1,81	2,72
17	1,81	1,81
18	2,72	1,81
19	3,63	1,81
20	2,72	1,81
21	2,72	1,81
22	1,81	2,72
23	1,81	1,81
24	1,81	1,81
25	2,72	1,81
26	3,63	2,72
27	2,72	2,72
28	1,81	1,81
29	1,81	3,63
30	3,63	1,81
31	2,72	2,72
32	2,72	1,81
33	1,81	2,72

34	2,72	1,81
35	3,63	1,81
36	2,72	2,72
37	2,72	1,81
38	2,72	3,63
39	1,81	
40	1,81	
41	3,63	
42	2,72	
43	2,72	
44	3,63	
45	3,63	
46	2,72	
Promedio	2.52	2.26
S	1.032	1.033
CV (%)	37.042	41.359
INTERVALO	1.81-3.63	1.81-3.63

Con el propósito de conocer si los resultados de la grasa de las dos poblaciones, tenían un comportamiento normal, se realizó la prueba de Kolmogorov-Smirnov, los resultados se muestran en las figuras 1 y 2, donde se observa que no tienen una distribución normal para ambas poblaciones.

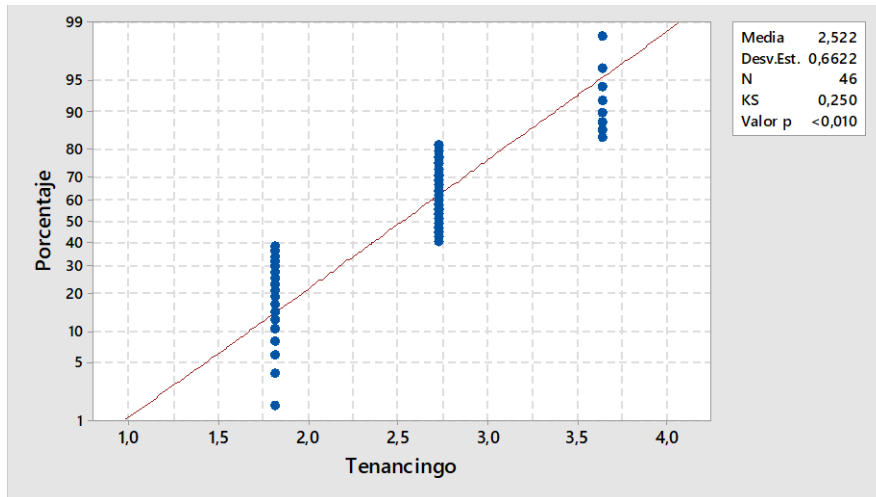


Figura 1. Gráfica de probabilidad de los valores de grasa obtenidos en la población de Tenancingo, Estado de México

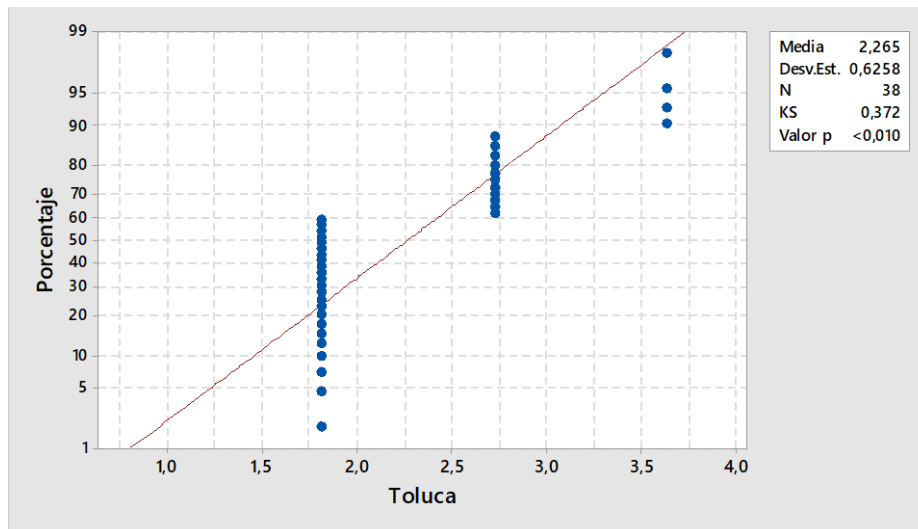


Figura 2. Gráfica de probabilidad de los valores de grasa obtenidos en la población de Toluca, Estado de México.

Se realizó una prueba de U de Mann-Whitney para conocer si hay diferencias entre el contenido de grasa (%) entre ambas poblaciones.

Mann-Whitney: Tenancingo; Toluca
Método

η_1 : mediana de Tenancingo

η_2 : mediana de Toluca

Diferencia: $\eta_1 - \eta_2$

Estadísticas descriptivas

Muestra	N	Mediana
Tenancingo	46	2,72
Toluca	38	1,81

Estimación de la diferencia

Diferencia	IC para la diferencia	Confianza lograda
0,0000000	(-0,0000000; 0,91)	95,04%

Prueba

Hipótesis nula $H_0: \eta_1 - \eta_2 = 0$

Hipótesis alterna $H_1: \eta_1 - \eta_2 \neq 0$

Método	Valor W	Valor p
No ajustado para empates	2146,00	0,087
Ajustado para empates	2146,00	0,060

Se obtuvieron valores de p mayores al $\alpha=0.050$ (nivel de confianza del 95%) por lo que la hipótesis que describe los resultados, es la nula, es decir no existen diferencias significativas estadísticamente entre ambas poblaciones, en la gráfica de intervalos, se muestran los promedios de las poblaciones y su grado de dispersión.

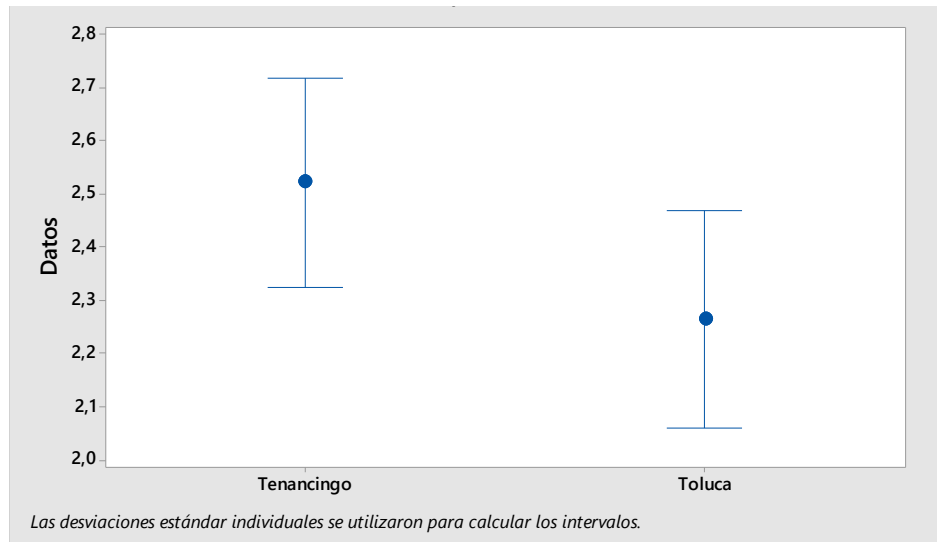


Figura 3. Grafica de intervalos de los valores de porcentaje de grasa de las voluntarias de Tenancingo y Toluca con un intervalo de confianza al 95%.

Tal y como se mencionó en los antecedentes hay estudios que demuestran que la alimentación así como factores como el nivel socioeconómico y el sexo del bebe interfieren en la concentración de grasas. Hennel en 1990 dice que el contenido de grasa en la leche humana se encuentra en un intervalo de entre 3 al 5%, por lo que los resultados obtenidos en este estudio concuerdan ya que para la población de Tenancingo se obtuvo un valor promedio de 2.52% y para la de Toluca de 2.26%, con un intervalo, que coincide para ambas poblaciones, entre 1.81 a 3.63 %, Tabla 4. Para las dos poblaciones en estudio el porcentaje de grasa en la leche materna se presentó con mayor frecuencia en el intervalo de entre 1.81 a 2.75 en 38 muestras (82.6%) procedentes de Tenancingo y 34 muestras (89.5%) en el grupo de Toluca, Tabla 5. En una población de Costa Rica, Castro et al. en 1984, obtuvieron una concentración de grasas en leche materna en un rango de 1.58 a 2.79 % y Villarroel et al. en 2006, en México reportan valores de 1.5 al 3.6%.

Tabla 6. Frecuencias de los valores obtenidos en las determinaciones de grasa en leche materna en las dos poblaciones por intervalo.

intervalos	Frecuencia	
	Tenancingo	Toluca
1.81 - 2.25	18	23
2.25 - 2.75	20	11
2.75 - 3.25	0	0
3.25 - 3.63	8	4
Total	46	38

Con el propósito de conocer de qué manera influye la alimentación de la población en el contenido de grasa en la leche materna, se aplicó el cuestionario que nos proporcionó la información que se describe en las Tablas 7 y 8.

Tabla 7. Frecuencia con la que las voluntarias de Tenancingo (N=50), manifestaron que consumen los alimentos enlistados.

Tenancingo					
ALIMENTO	FRECUENCIA				
	NUNCA	1-3 VECES/ MES	1-3 VECES/ SEMANA	4-6 VECES/ SEMANA	UNA O MAS VECES/ DIA
CARNES ROJAS (vaca, cerdo, cordero,...)		10	25	7	8
CARNES BLANCAS (pollo, pavo, conejo,...)		5	35	6	4
EMBUTIDOS		14	16	7	3
HUEVO		13	27	8	2
PESCADO	12	18	7	8	5
MARISCO FRESCO O CONGELADO	19	25	2	1	
PAN, PAPAS, ARROZ O PASTA	18	22	5	3	2
CEREALES (avena,...)	18	12	15	3	2

PRODUCTOS LACTEOS	23	14	11	1	1
MANTECA DE PUERCO	10	28	6	6	
ACETITE VEGETAL		6	6	38	

Los resultados muestran que el 50 % de las participantes del grupo de Tenancingo consumen carnes rojas (carne de vaca y cerdo principalmente), el 70 % carnes blancas (en su mayoría pollo) y productos o alimentos donde se usa en su mayoría aceites vegetales y algunos productos ricos en grasas como lo son huevo, embutidos y productos lácteos, con una frecuencia de 1 a 3 veces a la semana. El consumo de alimentos con un bajo contenido de grasas es muy poco, se observan dietas que aunque diariamente lleven vegetales, son ricas en grasas. Los resultados obtenidos muestran que el 43 % de las muestras tienen un contenido de grasa en un intervalo de entre 2.25 y 2.75% y un 17.39 % se encuentran en el intervalo de 3.25 a 3.63%.

Tabla 8. Frecuencia con la que las voluntarias de Toluca (N=41), manifestaron que consumen los alimentos enlistados.

ALIMENTO	FRECUENCIA				
	NUNCA	1-3 VECES/ MES	1-3 VECES/ SEMANA	4-6 VECES/ SEMANA	UNA O MAS VECES/ DIA
CARNES ROJAS (vaca, cerdo, cordero,...)		28	10	2	1
CARNES BLANCAS (pollo, pavo, conejo,...)		8	24	6	3
EMBUTIDOS		22	15	4	
HUEVO		26	13	2	
PESCADO	12	16	2	1	
MARISCO FRESCO O CONGELADO	16	14	7	4	

PAN, PAPAS, ARROZ O PASTA	16	15	5	5	
CEREALES (avena,...)	24	12	3	2	
PRODUCTOS LACTEOS		14	16	7	4
MANTECA DE PUERCO	26	15			
ACETITE VEGETAL		28	12	1	

Los resultados de la población del grupo de Toluca (N=41), muestran mayor consumo de carnes blancas, en su mayoría pollo (58.5%), que de carnes rojas (24.4%), en la misma frecuencia de 1 a 3 veces por semana. Así mismo hay la tendencia que la mayoría de las participantes pocas veces incluyen en su alimentación productos con altos contenidos de grasa ya que los valores de frecuencias más altas se encuentran en las respuestas de “nunca” o “1 a 3 veces/mes”. Debido a esto se analizan los resultados en relación al intervalo que se encontró en este estudio donde el contenido de grasa en la leche en este grupo fue del 60.52% de las muestras tienen un valor en el intervalo de 1.81 a 2.25% de contenido de grasa y únicamente un 10.52% se encuentran en el intervalo de 3.25 a 3.63%, menor al grupo de Tenancingo en un 6.87% lo que explica que la alimentación juega un papel importante así como F. Domínguez Ortega et al., en 1997 realizó estudios del contenido de grasas en la leche materna de una población de madres en España tomando en cuenta factores como el aumento de grasas corporales durante el embarazo y alimentación, encontrando que una asociación significativa con el contenido de grasa en la leche humana, desde la producción del calostro hasta la leche madura.

La importancia de este método radica en que la leche está constituida de micelas formadas de grasas, esto representa un potencial peligro hacia el lactante, debido a que la madre está expuesta a peligrosos pesticidas organoclorados (OCI) directa o indirectamente, y debido a la naturaleza de los contaminantes organoclorados tienden a depositarse en las grasas del cuerpo, esto incluye la leche y ya que es la única fuente de alimento para el bebé hay un riesgo inminente de contaminación por vía oral de dichos pesticidas.

3.5 CONCLUSIONES

- El micrométodo desarrollado utiliza el 5 % de los reactivos y de la muestra en relación al método Gerber, los resultados de los parámetros de validación determinados mostraron que cumple con los criterios de validación determinados, de acuerdo a la Guía de Validación de Métodos Analíticos del Colegio de QFB, México.
- El micrométodo desarrollado cumple con los criterios y fue eficiente en la determinación del porcentaje de grasa en las muestras analizadas.
- El micrométodo resultó eficiente para determinar el contenido de grasa en dos grupos de estudio, ya que los valores encontrados (1.81 a 3.63%), coinciden con los reportados en la bibliografía.
- El contar con un método validado que utilice poca cantidad (500 μ L) de muestra para determinar el contenido de grasa en leche materna, es importante para estudios de vigilancia epidemiológica en la población, principalmente en la expuesta a compuestos tóxicos lipofílicos.
- La alimentación de las madres juega un papel importante en la cantidad de grasa de la leche materna y por ello a mayor cantidad de grasa, mayor riesgos a la salud del bebé por la exposición a contaminantes liposolubles que puede obtener a partir de su principal alimento en los primeros meses de vida.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. V Congreso Español de Lactancia Materna. Marzo 2009
http://www.calidadasistencial.es/images/gestion_soc/congresos_antteriores/13.pdf
2. *Uauy R, Mize CE, Duran Castillo C.* Fat intake during childhood: metabolic responses and effects on growth. *American Journal of Clinical Nutrition.* 2000; 72(5):1354s-60s.
3. Organización Mundial de la Salud. Cantidad y composición de la leche materna. En *Cantidad y Calidad de la Leche Materna: OMS, 1985:3-21*
4. Reyes Vázquez H. Características de la leche materna. En: Reyes Vázquez H, Martínez González A. *Lactancia Humana. Bases para lograr su éxito.* 1ª ed. México: Editorial Médica Panamericana; 2011. p. 80-6.
5. Aguilar Cordero MJ. Composición, propiedades y bioquímica de la Leche Humana. En: Aguilar Cordero MJ. *Lactancia Materna.* 1ª ed. Madrid, España: Elsevier Science; 2005. p. 51-61.
6. Almroth SG. Water requirements of breast fed infants in a hot climate. *Am J Clin Nutr* 1978; 31:1154-7.
7. Sachdev HP, Krishna J, Puri RK, Satyanarayana L, Kumar S. Water supplementation in exclusively breastfed infants during summer in the tropics. *Lancet* 1991; 337(8761):929-33.
8. Garza C, Schanler RJ, Butte NF, Motil KJ. Special properties of human milk. *Clin Perinatol* 1987; 14(1):11-32.
9. Schanler RJ, Goldblum RM, Garza C, Goldman AS. Human milk for preterm infants: nutritional and immune factors. *Semin Perinatol* 1989; 25(2):184-8.
10. Aguayo J. Maternal lactation for preterm newborn infants. *Early Hum Dev* 2001; 65(Suppl):S19-29.
11. Reyes Vázquez H. Características de la leche materna. En: Reyes Vázquez H, Martínez González A. *Lactancia Humana. Bases para lograr su éxito.* 1ª ed. México: Editorial Médica Panamericana; 2011. p. 80-6.
12. Azeredo A., Torres J. P. M., Fonseca M. F., Britto J. L., Bastos W. R., Silva C. E. A., Cavalcanti G., Meire R. O., Sarcinelli P. N., Claudio L., Markowitz S., Malm O., 2008. DDT and its metabolites in breast milk from the Madeira River basin in the Amazon, Brazil. *Chemosphere*, 73, S246-S251.

13. Aguilar Cordero MJ. Composición, propiedades y bioquímica de la Leche Humana. En: Aguilar Cordero MJ. Lactancia Materna. 1ª ed. Madrid, España: Elsevier Science; 2005. p. 51-61.
14. Uruakpa FO, Ismond MAH, Akobundu ENT. Colostrum and its benefits: a review. *Nutr Res* 2002;22:755-67.
15. Wellstart International Lactation Management Self-Study Modules, Level I, Third Edition (Revised), Shelburne, Vermont: Wellstart International, 2009. Disponible en: <http://www.wellstart.org/Self-Study-Module.pdf>
16. García-López R. Composición e inmunología de la leche humana. *Acta Pediatr Mex* 2011;32(4):223-230
17. Lawrence RM. Factores de resistencia del huésped e importancia inmunológica de la leche humana. En: Lawrence RA, Lawrence RM. Lactancia Materna. Una guía para la profesión médica. 6ª ed. Madrid, España: Elsevier España; 2007. p. 183-224.
18. Lawrence RM, Pane CA. Human breast milk: Current concepts of immunology and infectious diseases. *Curr Probl Pediatr Adolesc Health* 2007;37:7-36.
19. Baeza-Bacab MA. Aspectos inmunológicos de la leche materna. En: Reyes Vázquez H, Martínez González A. Lactancia Humana. Bases para lograr su éxito. 1ª ed. México: Editorial Médica Panamericana; 2011. p. 87-91.
20. Gonzales RL, Alvarado JA, Perez NE. Compuestos orgánicos persistentes en leche materna de mujeres de Yucatán. Género, ambiente y contaminación por sustancias químicas. México 2011
21. Tolcachier, A J. Salud ambiental. Libro virtual intranet, Roemmers. 2000 http://www.intramed.net/sitios/libro_virtual4/8
22. Desconocido. Programa de monitoreo ecotoxicológico de los efluentes industriales en el río cruces, provincial de Valdivia Chile. Chile (2007)
23. Guimaraens- Juanena, Dolores. Exposición dérmica laboral. Instituto nacional de seguridad e higiene en el trabajo. Centro Nacional de Nuevas Tecnologías. Madrid. 2010
24. Waliszewski S, Herrero M, Caba M, Cedillo L, Meza E, Zepeda R, Hernández F, Infanzon R. Niveles de plaguicidas organoclorados en madre e hijo. Género Ambiente y contaminación por sustancias químicas. Veracruz, 2010.
25. Guía de validación de métodos analíticos.pdf [En línea] disponible en <https://www.ministeriodesalud.go.cr/index.php/biblioteca-de-archivos/2472-guia->

[de-validacion-de-metodos-analiticos+&cd=3&hl=en&ct=clnk&gl=mx&client=firefox-b](#) consultado el día 26 de julio de 2017

26. Leche, fórmula láctea y producto lácteo combinado-Denominaciones, especificaciones fisicoquímicas, información comercial y métodos de prueba. NOM-155-SCFI-2003.pdf

27. Pinto C., Carrasco R., Fraser L. Barriga I. Validación del método butirométrico de Gerber por comparación con el método de referencia de RöseGottlieb para la determinación de materia grasa en leche. Instituto de Ciencia y Tecnología de los Alimentos, Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Austral de Chile. Valdivia. Chile. (2000)

28. García, E. Fernández, I. Fuentes, A. Determinación del contenido en grasa de la leche por el método Gerber. Departamento de tecnología de alimentos. ETSIAMN. Universidad Politécnica de Valencia. España. 2013

29. Fernando Atmetlla, Sonia Willis, Isaac Sánchez, Lupita Montero. UTILIZACIÓN DE MICROMÉTODOS EN LAS PRUEBAS DE TIEMPO DE PROTROMBINA (TP) Y TIEMPO DE TROMBOPLASTINA PARCIAL (TTP). Fac. Microbiología. Universidad de costa rica. 2013

30. Fomon SJ. Nutrición del Lactante. Madrid: Editores Mosby/Doyma Libros; 1995.

31. VillaroelJauri, Carrero Pablo, Paredes Dilizio, otros, Nueva alternativa para el análisis de grasa en leche humana. *REVISTA DE LA FACULTAD DE FARMACIA Vol. 47 (1) 2005*

32. Bejarano F. Guía Ciudadana para la aplicación del Convenio de Estocolmo. Red de Acción sobre Plaguicidas y Alternativas en México (RAPAM) Texcoco, Edo. de México, México, 2004.

33. Pronczuk J. Contaminantes Orgánicos Persistentes (COPs) Salud infantil tóxicos y medio ambiente: riesgos existentes y emergentes. Santiago de Chile ALATOX 21-22 agosto 2006.

34. González Navarrete RL, Alvarado-Mejía JA, Rodas-Ortiz JP, Gold-Bouchot G, Ceja-Moreno V. Contaminación por DDT y Derivados en Leche Materna, Mérida Yucatán. Libro de resúmenes del 13 Congreso de Investigación en salud pública INSP. 2009:36.

35. Rodas-Ortiz JP, Ceja-Moreno V, González-Navarrete RL, Alvarado-Mejía JA, Rodriguez-Hernández ME, Gold-Bouchot G. Organochlorinepesticides and PolychlorinatedBiphenylslevels in Human milkfrom Chelém, Yucatán, México. *Bull EnvironContamToxicol* 2008; 80:255-259.

36. González-Navarrete R, L, Alvarado-Mejía J, Pérez-Herrera N. Monitoreo de contaminantes orgánico persistentes en leche materna en Yucatán. En: Aportes al conocimiento de la salud en Yucatán. Mérida, Yucatán, UADY, 2010.247-263.
37. Coeficiente de variación y medidas estadísticas disponible en línea en: <http://webcache.googleusercontent.com/search?q=cache:A5MiYnVdOBIJ:docente.sinnovadores.net/Archivos/5935/COEFICIENTE%2520DE%2520VARIACI%25C3%2593N.pdf+&cd=1&hl=en&ct=clnk&gl=mx&client=firefox-b-ab> Consultado el 30 de Junio de 2017
38. Validación de métodos analíticos disponible en línea en: www.who.int/medicines/publications/pharmprep/ Consultado el 30 de Junio de 2017
39. Zayas, Roberto y Cabrera, Ulises. Los tóxicos ambientales y su impacto en la salud de los niños. Hospital Pediátrico Docente de Centro Habana. Rev. Cubana Pediatra v.79 n.2 Ciudad de la Habana abr.-jun. 2007
40. Alimentación de una madre en periodo de lactancia disponible en línea en: <http://revista.consumer.es/web/es/20010101/alimentacion/27171.php#sthash.i8hccqSl.dpuf> Consultado el 30 de julio de 2017
41. Guía para la validación y la verificación de los procedimientos de examen cuantitativos empleados por el laboratorio clínico. Centro nacional de metrología. México, Abril 2008
42. Díaz-Barriga. Factores de exposición y toxicidad del DDT y de la deltametrina en humanos y en vida silvestre. “Informe técnico apoyado por la comisión de cooperación ambiental de América del norte”. México 2010
43. Smith, D. Worldwide trends in DDT levels in human breast milk. International journal of epidemiology, USA 1999-28: 179-188
44. Prado, G. Presencia de residuos y contaminantes en leche humana. Rev. Esp. Salud pública 2002; 76: 133-147
45. Needham, L. y Wang, R. Analytic considerations for measuring environmental chemicals in breast milk. Environmental health perspectives volume 110, number 6, June 2002.
46. Aguayo, J., Arena, J. Lactancia materna: Guía para profesionales. Monografías de la A.E.P. N° 5. Comité de lactancia materna de la asociación española de pediatría. Pp 59-70. Madrid 2004.
47. García, M. Estudio de las principales fuentes de contaminación por plaguicidas en neonatos –lactantes residentes en pueblo yaqui, Sonora, México tesis.

Profesional Químico. Instituto Tecnológico de Sonora (ITSON). Ciudad Obregón, Sonora, México. PP. 27-37. México 1991.

48. Minh, N., Someya M., Minh T. Persistent organochlorine residues in human breast milk from Hanoi and Hochiminh city, Vietnam: Contamination, accumulation kinetics and risk assessment for infants. *Environ. Pollut.* 129; 431-441. Vietnam 2004.

49. lactancia materna disponible en línea en: http://www.clinicasantamaria.cl/noticias/noticia_muestra.asp?new=1302 consultado el 09 de Noviembre de 2017

50. Universidad de Zulia. Cátedra de ciencias y tecnología de la leche. Maracaibo, Venezuela. 2004

51. La leche ¿Un mal necesario? Foodness México. Disponible en línea en: <http://foodnessmexico.blogspot.mx/2015/03/la-leche-un-mal-necesario.html> consultado el 09 de Noviembre de 2017

52. Hernell O. The requirements and utilization of dietary fatty acids in the newborn infant. *Acta Paediatr Scand* 1990; 365:20-27.

53. Guadalupe Prado y otros. Niveles de pesticidas organoclorados en leche humana de la Ciudad de México. *Agro Sur*, Vol. 32 N° 2, 2004, pp. 60-69

54. Tue N. M. et al. Kinetic differences of legacy organochlorinepesticides and polychlorinated biphenyls inVietnamese human breast milk. *Chemosphere* 81 (8):1006-011. 2010

55. Ceca Lara S. et al. Contaminantes orgánicos persistentes en leche materna de centros urbanos de la provincia de Buenos Aires. *AUGMDOMUS*, 4:92-102, 2012

ANEXOS

Anexo I Cuestionario realizado para determinar la importancia de la alimentación en el contenido de grasa en la leche materna.

EDAD: _____

PROCEDENCIA: _____

MESES DEL NEONATO _____

ALIMENTACION DE LA MADRE

ALIMENTO	FRECUENCIA				
	NUNCA	1-3 VECES/ MES	1-3 VECES/ SEMANA	4-6 VECES/ SEMANA	UNA O MAS VECES/ DIA
CARNES ROJAS (vaca, cerdo, cordero,...)					
CARNES BLANCAS (pollo, pavo, conejo,...)					
EMBUTIDOS					
HUEVO					
PESCADO					
MARISCO FRESCO O CONGELADO					
PAN, PAPAS, ARROZ O PASTA					
CEREALES (avena,...)					
PRODUCTOS LACTEOS					
MANTECA DE PUERCO					
ACETITE VEGETAL					