

## Evaluation of polycyclic aromatic hydrocarbons in cattle farms and its relation with the safety in grass and milk

### Evaluación de los hidrocarburos aromáticos policíclicos en granjas pecuarias y su relación con la inocuidad en pasto y leche

Dayana Sosa<sup>1</sup>, Brizeidi Peña<sup>1</sup>, and A.C. Escobar<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>*Centro de Ensayos para el Control de la Calidad de los Alimentos (CENLAC), Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria (CENSA). Dirección postal: Carretera de Jamaica y Autopista Nacional, San José de las Lajas, Mayabeque, Cuba*

<sup>2</sup>*Departamento de Producción Agrícola Animal (DPAA). Universidad Autónoma Metropolitana-Unidad Xochimilco. Dirección postal: Calzada del Hueso 1100, Col. Villa Qietud, Coyoacán. CP 04960. Ciudad de México. Email: arturo.escobar60@gmail.com / escobar@censa.edu.cu*

In this study the concentration of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in grass and milk was quantified, and the relation between their concentration in these matrices and those reported in the soil was estimated. A total of 15 grass sites were selected and of these, ten were milk producers. For this, the proximity to the emission sources and the concentrations of these pollutants in agricultural soils from Havana and Mayabeque were taken into account. Gas chromatography with mass detection was used for its identification and quantification. The results were analyzed by linear regression, descriptive statistics and simple ANOVA and Tukey test to determine differences in the studied matrices. The Infostat statistical package was used for this. The median concentration of the sum of the PAHs in grass and milk were 45.0 and 10.1 µg/kg, respectively, with predominance of phenanthrene. Significant associations were found between the PAHs concentrations between grass and soil ( $y = 2.4109x - 11.073$ ,  $R^2 = 0.8444$ ,  $SE = 0.42$ ,  $P < 0.01$ ), as well as in grasses and milk near sources of contamination ( $y = 0.1848x - 17.675$ ,  $SE = 3.9E-03$ ,  $R^2 = 0.9996$ ,  $P < 0.05$ ). The data presented contributes to the limited information on the presence of this group of persistent organic pollutants in cattle farms from the Caribbean region and it is concluded that the milk is safe, according to the European Union regulation and the grasses are of low risk for the animals health.

Key words: *pollution, CGMS, Cuba, livestock*

Livestock in Cuba is a strategic objective for dairy production, where the first link is related to the sustainable management of land (Cuella *et al.* 2015), followed by the use of improved grasses, in grazing or in association with forage trees, timber and others, that cover at least 80 % of the energy requirements of animals in a semi-intensive production system (Milera *et al.* 2018) that contributes to the increase of milk production. But ensuring a quality and safe product is also an interest of producers and the Ministerio de la Agricultura.

The safety of milk is mainly associated with the presence of antibiotics (Panigrahi *et al.* 2017) and pesticides (Gao and Sun 2018). However, it is increasingly important to analyze other persistent organic compounds (POCs) and inorganic in the food chain (Cuesta *et al.* 2017). Among the POCs are the

En este estudio se cuantificó la concentración de los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs) en pasto y leche, y se estimó la relación entre su concentración en estas matrices y las reportadas en el suelo. Se seleccionaron 15 sitios de pasto y de estos, diez resultaron ser productores de leche. Para ello, se tuvo en cuenta la cercanía a las fuentes emisoras y las concentraciones de estos contaminantes en suelos agropecuarios de La Habana y Mayabeque. Se empleó la cromatografía gaseosa con detección de masa para su identificación y cuantificación. A los resultados se le realizó análisis de regresión lineal, estadística descriptiva y ANOVA simple y test de Tukey para determinar diferencias en las matrices estudiadas. Se utilizó para ello el paquete estadístico Infostat. La mediana de concentración de la suma de los HAPs en pasto y leche fueron de 45,0 y 10,1 µg/kg, respectivamente con predominio del fenantreno. Se encontraron asociaciones significativas entre las concentraciones de los HAPs entre el pasto y suelo ( $y = 2.4109x - 11.073$ ,  $R^2 = 0.8444$ ,  $EE = 0.42$ ,  $P < 0.01$ ), así como en pastos y leche cercana a las fuentes de contaminación ( $y = 0.1848x - 17.675$ ,  $EE = 3.9E-03$ ,  $R^2 = 0.9996$ ,  $P < 0.05$ ). Los datos presentados contribuyen a la limitada información sobre la presencia de este grupo de contaminantes orgánicos persistentes en granjas pecuarias en la región del Caribe y se concluye que la leche es inocua, según la regulación de la Unión Europea y los pastos son de bajo riesgo para la salud de los animales.

Palabras clave: *contaminación, CGMS, Cuba, ganadería*

La ganadería en Cuba constituye un objetivo estratégico para la producción lechera, donde el primer eslabón se relaciona con el manejo sostenible de la tierra (Cuella *et al.* 2015), seguido del uso de gramíneas mejoradas, en el pastoreo o en asociación con árboles forrajeros, maderables y otros, que cubran al menos el 80 % de los requerimientos energéticos de los animales en un sistema de producción semi-intensivo (Milera *et al.* 2018) que contribuya al incremento de la producción de leche. Pero, garantizar un producto con calidad e inocuo también es un interés de los productores y del Ministerio de la Agricultura.

La inocuidad de la leche se asocia principalmente a la presencia de antibióticos (Panigrahi *et al.* 2017) y de plaguicidas (Gao y Sun 2018). Sin embargo, es cada vez más importante el análisis de otros compuestos orgánicos persistentes (COPs) e inorgánicos en la cadena alimentaria (Cuesta *et al.* 2017). Entre los COPs se

polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs), due to the toxic and carcinogenic effects they have, the US Environmental Agency (EPA) has showed a list of the 16 PAHs that should be studied (Li and Ma 2016).

The presence of PAHs in the atmosphere has been reported in Africa, Australia, the Pacific, Europe, Asia, Latin and North America and even in the Arctic, in a range of 1 to 7281 pg/m<sup>3</sup> (Bogdal *et al.* 2013). These can be deposited in the soil and in the plants, so in those places where lactation animals may appear residues of PAHs in milk (Grova *et al.* 2005 and Costera *et al.* 2010).

In Latin America, studies on PAHs in grass and milk are limited. It can mention the research carried out on commercialized milks from Argentina and Brazil (García-Londoño *et al.* 2013) and in grasses and milks from agricultural areas close to petrogenic contaminating sources in the Veracruz, Mexico (Pérez 2012).

In Cuba there is no previous information about the presence of PAHs in grass and milk that allows evaluating the impact of these products in their safety. The objective of this study was to evaluate the concentration of PAHs in grass and milk in livestock areas and the relation between their concentration in food and those reported in the soil.

### Materials and Methods

*Location of the study area.* Previously, a monitoring network was carried out in the Mayabeque and Havana soils, where 69 sites were studied for the analysis of PAHs in soils (Sosa *et al.* 2017). Of them a total of 25 resulted to be breeders and of them 15 sites were selected (1, 3, 11, 15, 16, 17, 23, 26, 31, 32, 34, 38, 52 and 59). For its selection, the proximity to the polluting sources and the PAHs concentrations in the soils were considered (Sosa *et al.* 2017). In these sites the grass species that were present were the star grass (*Cynodon nlemfuensis*), n=9 and guinea (*Megathrysus maximus*), n=6. Of the 15 sites selected to evaluate the grass, in 10 sites had milk producer cattle (1, 3, 11, 15, 28, 31, 32, 38, 52 and 59) of which one corresponds to buffalo cattle (water buffalo). The cows of the evaluated sites were characterized as being of Creole breed, Siboney de Cuba, zebu and crossbreeding (figure 1).

*Sampling, processing and analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons from samples of grass and milk.* The samples of grass and soil were taken in the same quadrant of 100 m<sup>2</sup> (Sosa *et al.* 2017) with the objective of finding relations about the contamination between both matrices of the agroecosystem. A 1 kg sample was taken, packed in polyethylene nylon envelopes covered with aluminum foil and sealed with Teflon tape, and stored at 4 °C until laboratory analysis (Nadal *et al.* 2004). The grass was dried at 40 °C until constant weight, subsequently ground and passed through a sieve with an opening of 2 mm. Next,

encuentran los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs), debido a los efectos tóxicos y carcinogénicos que presentan, la Agencia Ambiental de los Estados Unidos (EPA) ha presentado una lista de los 16 HAPs que deben ser estudiados (Li y Ma 2016).

La presencia de HAPs en la atmósfera ha sido informada en África, Australia, el Pacífico, Europa, Asia, Latino y Norte América e incluso en el Ártico, en un rango de 1 a 7281 pg/m<sup>3</sup> (Bogdal *et al.* 2013). Estos pueden ser depositados en el suelo y en las plantas, por lo que en aquellos lugares donde se encuentran pastando animales en lactación pueden aparecer residuos de HAPs en la leche (Grova *et al.* 2005 y Costera *et al.* 2010).

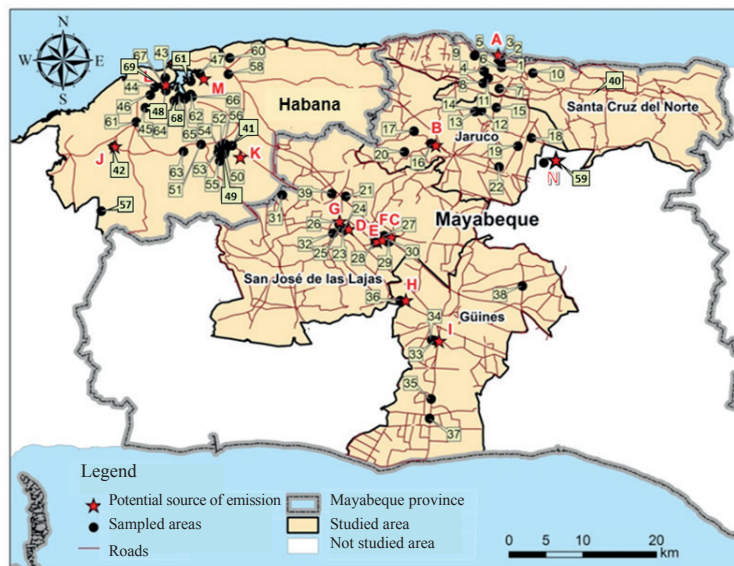
En América Latina los estudios sobre HAPs en pasto y leche son escasos. Se puede citar la investigación llevada a cabo en leches comercializadas procedentes de Argentina y Brasil (García-Londoño *et al.* 2013) y en pastos y leches de zonas agrícolas cercanas a fuentes contaminantes petrogénicas en el estado de Veracruz, México (Pérez 2012).

En Cuba no se dispone de información previa acerca de la presencia de HAPs en pasto y leche que permita evaluar el impacto de estos productos en la inocuidad de los mismos. Este estudio tuvo como objetivo evaluar la concentración de los HAPs en pasto y leche en zonas pecuarias y la relación entre su concentración en los alimentos y las reportadas en el suelo.

### Materiales y Métodos

*Localización de la zona de estudio.* Previamente se realizó una red de monitoreo en los suelos de Mayabeque y La Habana, donde se estudiaron 69 sitios para el análisis de los HAPs en los suelos (Sosa *et al.* 2017). De los mismos 25 resultaron ser ganaderos y de ellos se seleccionaron 15 sitios (1, 3, 11, 15, 16, 17, 23, 26, 31, 32, 34, 38, 52 y 59). Para su selección se consideró la cercanía a las fuentes contaminantes y las concentraciones de los HAPs en los suelos (Sosa *et al.* 2017). En estos sitios las especies de pasto que estuvieron presente fueron el pasto estrella (*Cynodon nlemfuensis*), n=9 y guinea (*Megathrysus maximus*), n=6. De los 15 sitios seleccionados para evaluar el pasto, en 10 sitios había ganado productor de leche (1, 3, 11, 15, 28, 31, 32, 38, 52 y 59) de los cuales uno corresponde a ganado bufalino (búfalo de agua). Las vacas de los sitios evaluados se caracterizaron por ser de raza criolla, Siboney de Cuba, cebú y cruzamiento (figura 1).

*Muestreo, procesamiento y análisis de los hidrocarburos aromáticos policíclicos de las muestras de pasto y leche.* Las muestras de pasto y de suelo se tomaron en el mismo cuadrante de 100 m<sup>2</sup> (Sosa *et al.* 2017) con el objetivo de encontrar relaciones acerca de la contaminación entre ambas matrices del agroecosistema. Se tomó una muestra de 1 kg, se envasaron en sobres de nailon de polietileno recubierto con papel aluminio y sellado con cinta teflón, y se conservaron a 4 °C hasta su análisis en el laboratorio (Nadal *et al.* 2004). El pasto se secó a 40 °C hasta peso constante, posteriormente se molió y se pasó por un tamiz con una abertura de



Note: The main emission sources are represented by a red star. The red capital letters specify the types of emission sources: Thermoelectric (A), Zeolite production (B), Asphalt factory (C), Cable industry (D), Rum factory (E), Paint factory (F), Smelting factory (G), Refractory bricks factory (H), Electric groups (I), Steel factory (K), Refinery Níco López (M), Thermoelectric Talla Piedra (L), Electric groups (J) and Sugar cane factory Boris Luis Santa Coloma (N).

Figure 1. Research area within Havana and Mayabeque

the sample was divided by the quartering procedure and the samples were taken diagonally, for analysis. Sampling was done in the dry season (March, 2016, December, 2016 and January, 2017), since according to Cabrerizo *et al.* (2011) and Rychen *et al.* (2008) is the time of highest concentration of pollutants in the grass and soil.

Samples of 500 mL of milk were collected from the collector tank of each dairy in the same period in which the grass samplings were made, as established by the Federación Internacional de Lechería (FIL/IDF 1995) and the general sampling guidelines established by the Codex Alimentarius (CODEX 2004). Once the milk arrived at the laboratory, the fat percentage was determined by infrared spectrophotometry using the Milko-Scan model Minor-6, A/S (Foss Electric, Denmark) (FIL/IDF 141C: 2000) with an accuracy lower than 1.5 %. This equipment was validated and fitted according to ISO 8196-2 (2009). The milk was stored at -20°C and the extraction of fat was done before a week of storage, which is the recommended time for the technique reliability (Grova *et al.* 2000).

For the analysis of PAHs, the 16 PAHs taken into account by the Environmental Protection Agency were used: naphthalene (NAP), acenaphthylene (ANY), acenaphthene (ACE), fluorene (FLU), phenanthrene (PHE), anthracene (ANT), fluoranthene (FLT), pyrene (PYR), benzo [a] anthracene (BaA), chrysene (CHR), benzo [b] fluoranthene (BbF), benzo [k] fluoranthene (BkF), benzo [a] pyrene (BaP), indene [1,2,3-cd] pyrene (IPY), dibenzo [a,h] anthracene (DBA), and benzo [ghi] perylene (BPE) from the commercial house Promochem

2 mm. Seguidamente, se dividió la muestra por el procedimiento de cuarteo y se tomaron las muestras en forma diagonal, para su análisis. El muestreo se hizo en época de seca (marzo, 2016; diciembre, 2016 y en enero, 2017), ya que según Cabrerizo *et al.* (2011) y Rychen *et al.* (2008) es el momento de mayor concentración de los contaminantes en el pasto y el suelo

Se recolectaron muestras de 500 mL de leche del tanque colector de cada vaquería en el mismo período en que se realizaron los muestreos de pasto, según lo establecido por la Federación Internacional de Lechería (FIL/IDF 1995) y las guías generales de muestreos establecidas por el Codex Alimentarius (CODEX 2004). A la leche, una vez que llegó al laboratorio, se le determinó el porcentaje de grasa por espectrofotometría infrarroja, mediante el equipo Milko-Scan modelo Minor-6, A/S (Foss Electric, Dinamarca) (FIL/IDF 141C:2000) con una precisión menor al 1,5%. Este equipo se validó y se ajustó según la norma ISO 8196-2 (2009). La leche se guardó a -20 °C y la extracción de la grasa se hizo antes de una semana de almacenamiento, que es el tiempo recomendado para la fiabilidad de la técnica (Grova *et al.* 2000).

Para el análisis de HAPs se emplearon los 16 HAPs que tiene en cuenta la Agencia de Protección del Medio Ambiente: naftaleno (NAP), acenaftileno (ANY), acenafteno (ACE), fluoreno (FLU), fenantreno (PHE), antraceno (ANT), fluoranteno (FLT), pireno (PYR), benzo[a]antraceno (BaA), criseno (CHR), benzo[b]fluoranteno (BbF), benzo[k]fluoranteno (BkF), benzo[a]pireno (BaP), indeno[1,2,3-cd]pireno (IPY), dibenzo[a,h]antraceno (DBA), y benzo[ghi]perileno (BPE) procedentes de la casa comercial Promochem



(Wesel, Germany). The deuterated compounds of PAHs (d8-NAP, d8-ANY, d10-ANA, d10-FLU, d10-PHE, d10-ANT, d10-FLT, d10-PYR, d12-BaA, d12-CHR, d12-BbF, d12-BkF, d12-BaP, d12-IPY, d14-DBA and d12-BPE) were obtained from the Cambridge isotope laboratory (Andover, MA, USA). The Indeno [1,2,3-cd] -fluoranthene (99.7 % purity) comes from the commercial house Promochem (Wesel, Germany). The rest of the reagents used in the analytical techniques are of high quality from well-known commercial companies such as Fluka, Merck and Schleicher & Schuell (Bucheli *et al.* 2004).

For the extraction, purification and identification of PAHs in the grass samples, 5 g were weighed and transferred to a thimble for extraction by Soxhlet, after a solution of internal recovery standard of 20 µg/kg of the 16 deuterated PAHs was added, subsequently was extracted for 36 h with n-hexane and concentrated to 1-2 mL. The concentrated extract was purified by partition and column purification for further analysis by gas chromatography (Agilent 6890) (Gubler *et al.* 2015 and Bucheli *et al.* 2004).

In the case of milk, 150 mL were taken and a liquid-liquid partition was carried out in the following order: 1) 150 mL methanol, 2) 150 mL diethyl ether and 3) 150 mL petroleum ether. The obtained extract was rotoevaporated almost to dryness. Then the fat content was determined by gravimetry (AOAC 2005). A column purification of silica and a selective extraction with n-hexane (F1) were carried out; hexane: dichloromethane (9:1 v/v) and n-hexane: dichloromethane (1:1 v/v) (F2) (Gutiérrez *et al.* 2015). The detection and quantification was performed by gas/ mass chromatography (Bucheli *et al.* 2004).

*Parameters of the performance of analytical technique to determine polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in grasses and milk.* The quantification of PAHs was performed by the internal standard method with their respective labeled compounds (Bucheli *et al.* 2004).

**Grasses:** The calibration curve was linear showing a regression coefficient higher than 0.99 for the PAHs. The detection limit (DL) and quantification limit (QL) of individual PAHs ranged between 0.01 and 0.12 µg/kg and 0.04 and 0.39 µg/kg, respectively. The recoveries of the native PAHs added were higher than 83 % (five replications containing 40 µg/kg of the 16 deuterated PAHs). The corresponding coefficients of variation of the individual analytes for the repeatability and reproducibility study ranged between 4.5-23 % and 5.5-23 %, respectively in all cases the Horrat index was less than 2. All the results were in accordance with the Nordic Standard (NMKL 2010).

**Milk:** The calibration curve was linear showing a regression coefficient higher than 0.99 for the PAHs. The detection limit of methods (DL) and quantification (QL) of the individual PAHs ranged between 0.36 and 2.34 ng/mL and 1.9 and 7.5 ng/mL, respectively. The

(Wesel, Germany). Los compuestos deuterados de HAPs (d8-NAP, d8-ANY, d10-ANA, d10-FLU, d10-PHE, d10-ANT, d10-FLT, d10-PYR, d12-BaA, d12-CHR, d12-BbF, d12-BkF, d12-BaP, d12-IPY, d14-DBA y d12-BPE) se obtuvieron del laboratorio de isótopos de Cambridge (Andover, MA, USA). El Indeno [1,2,3-cd]-fluoranteno (99.7% pureza) procede de la casa comercial Promochem (Wesel, Alemania). El resto de los reactivos empleados en las marchas analíticas son de alta calidad de reconocidas casas comerciales como Fluka, Merck y Schleicher & Schuell (Bucheli *et al.* 2004).

Para la extracción, purificación e identificación de los HAPs en las muestras de pasto, se pesaron 5g y se traspasó a un dedal para su extracción por Soxhlet, después se le adicionó una solución de estándar interno de recobrado de 20 µg/kg de los 16 HAPs deuterados, posteriormente se extrajo durante 36 h con n-hexano y se concentró hasta 1-2 mL. El extracto concentrado se purificó por partición y purificación en columna para su posterior análisis por cromatografía de gases (Agilent 6890) (Gubler *et al.* 2015 y Bucheli *et al.* 2004).

En el caso de la leche se tomaron 150 mL y se realizó una partición líquido-líquido en el siguiente orden: 1) 150 mL metanol, 2) 150 mL éter dietílico y 3) 150 mL de éter de petróleo. El extracto obtenido se rotoevaporó casi hasta sequedad. Después se determinó el contenido de grasa por gravimetría (AOAC 2005). Se realizó una purificación en columna de sílica y una extracción selectiva con n-hexano (F1); hexano:diclorometano (9:1 v/v) y n-hexano:diclorometano (1:1 v/v) (F2) (Gutiérrez *et al.* 2015). La detección y cuantificación se realizó por cromatografía gaseosa/masa (Bucheli *et al.* 2004).

*Parámetros del desempeño de la técnica analítica para determinar hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs) en pastos y leche.* La cuantificación de los HAPs se realizó por el método estándar interno con sus respectivos compuestos marcados (Bucheli *et al.* 2004).

**Pastos:** La curva de calibración fue lineal mostrando un coeficiente de regresión mayor de 0.99 para los HAPs. Los límites de detección (LD) y cuantificación (LQ) de los HAPs individuales oscilaron entre 0.01 y 0.12 µg/kg y 0.04 y 0.39 µg/kg, respectivamente. Las recuperaciones de los HAPs nativos añadidos fueron mayores de 83% (cinco réplicas que contienen 40 µg/kg de los 16 HAPs deuterados). Los coeficientes de variación correspondientes de los analitos individuales para el estudio de repetibilidad y reproducibilidad oscilaron entre 4.5-23 % y 5.5-23 %, respectivamente en todos los casos el índice de Horrat fue menor de 2. Todos los resultados estuvieron acorde a la norma nórdica (NMKL 2010).

**Leche:** La curva de calibración fue lineal mostrando un coeficiente de regresión mayor de 0.99 para los HAPs. Los límites de detección de los métodos (LD) y cuantificación (LQ) de los HAPs individuales oscilaron entre 0.36 y 2.34 ng/mL y 1.9 y 7.5 ng/mL, respectivamente. Los recobrados de los

recoveries of the native PAHs are above 80 % (five replications containing 800 µg/kg of the 16 deuterated PAHs). The corresponding variation coefficients of the individual analytes for the repeatability and reproducibility study ranged between 2.65-12.66 % and 3.60-22.68 %, respectively in all cases the Horrat index was lower than 2. All the parameters are in accordance with the specifications of the Nordic validation standard (NMKL 2010).

*Statistical analysis.* Linear regression analysis was performed with the use of Excel Office 2013. Descriptive statistics and ANOVA analysis were applied with Tukey's multiple means comparison method (Miller 1981), carried out with the InfoStat program version 2012 (Di Rienzo *et al.* 2012).

### Results and Discussion

The sum of the 16 PAHs in the selected grass samples ranged between 29 and 157 µg/kg (mean 67 µg/kg, median 45 µg/kg). The mean value of the PAHs in the evaluated grasses is in the range of the contamination that has been reported in grasses (25-900 µg/kg) and is lower than the one reported (142-3989 µg/kg) in industrialized areas (Crépineau *et al.* 2003, Grova *et al.* 2000 and Rychen *et al.* 2008). This corresponds to the location of the studied sites, since they were all in rural areas (Mayabeque); except site 52, which despite being considered as an urban site (Cotorro, Havana) showed similar concentrations to the rest.

The PAHs of 2 to 3 rings presented a range of 0.58-14.04 µg/kg; those with 4 rings of 1.55- 5.83 µg/kg and those with 5 to 6 rings of 0.14- 3.84 µg/kg. As the sum of the 16 PAHs increases, the sum of PAHs of 2-3 rings, 4 rings and 5-6 rings increases, but in the case of PAHs with 2 to 3 rings and 4 rings it is much more pronounced (figure 2). This corresponds to the PAHs that most contributed to the total sum: NAP (11 %), PHE (30 %), FLT (10 %), PYR (10 %) (figure 3). This performance is in agreement with other reports, in which PAHs have predominated such as: FLT, PYR and PHE (Crépineau *et al.* 2003 and Grova *et al.* 2000). It has been reported that the PAH-BPM adhere to the intracuticular wax of the plant and those of high molecular weight to the epicuticular wax and are therefore more exposed to photodegradation and washing, so it is common that in the leaves of the plants tend to abound the HAP-BPM (Bakker *et al.* 2001).

Only when the contaminating source is powerful, constant and the grasses are very close to it (distance lower than 50 m), the tendency to predominance of PAHs of high molecular weight (PAHs-HMW) can be observed. On the other hand, if they are far from this, the PAHs-LMW will be abundant (Crépineau *et al.* 2003). In our case, the sampling sites were found more than 50 m from the contaminating sources, so the observed performance is logical. Only one site had a different performance (site 23 near the cable factory)

HAPs nativos están por encima de 80 % (cinco réplicas que contienen 800 µg/kg de los 16 HAPs deuterados). Los coeficientes de variación correspondientes de los analitos individuales para el estudio de repetibilidad y reproducibilidad oscilaron entre 2.65-12.66% y 3.60-22.68 %, respectivamente en todos los casos el índice de Horrat fue menor de 2. Todos los parámetros están acordes con las especificaciones de la normativa de validación nórdica (NMKL 2010).

*Análisis estadístico.* Se realizó el análisis de regresión lineal con el uso del Excel Office 2013. Se aplicó la estadística descriptiva y análisis de ANOVA con el método de comparación múltiple de medios Tukey (Miller 1981), llevado a cabo con el programa InfoStat versión 2012 (Di Rienzo *et al.* 2012).

### Resultados y Discusión

La suma de los 16 HAPs en las muestras de pasto seleccionadas osciló entre 29 y 157 µg/kg (media 67 µg/kg, mediana 45 µg/kg). El valor de la media de los HAPs en los pastos evaluados se encuentra en el intervalo de la contaminación que se ha reportado en pastos (25-900 µg/kg) y es inferior a la informada (142-3989 µg/kg) en áreas industrializadas (Crépineau *et al.* 2003, Grova *et al.* 2000 y Rychen *et al.* 2008). Esto corresponde con la ubicación de los sitios estudiados, pues todos se encontraban en áreas rurales (Mayabeque); excepto el sitio 52, el cual a pesar de haberse considerado como un sitio urbano (Cotorro, Habana) presentó concentraciones similares al resto.

Los HAPs de 2 a 3 anillos presentaron un rango de 0.58-14.04 µg/kg; los de 4 anillos de 1.55- 5.83 µg/kg y los de 5 a 6 anillos de 0.14- 3.84 µg/kg. En la medida que aumenta la suma de los 16 HAPs incrementa la suma de HAPs de 2-3 anillos, 4 anillos y 5-6 anillos, pero en el caso de los HAPs de 2 a 3 anillos y 4 anillos es mucho más pronunciado (figura 2). Esto se corresponde con los HAPs que más contribuyeron a la sumatoria total: NAP (11 %), PHE (30 %), FLT (10%), PYR (10 %) (figura 3). Este comportamiento está en concordancia con otros reportes, en los que han predominado HAPs como: FLT, PYR y PHE (Crépineau *et al.* 2003 y Grova *et al.* 2000). Se ha informado que los HAP-BPM se adhieren a la cera intracuticular de la planta y los de alto peso molecular a la cera epicuticular y por tanto están más expuestos a la fotodegradación y el lavado, por eso es común que en las hojas de las plantas tiendan a abundar los HAP-BPM (Bakker *et al.* 2001).

Solamente cuando la fuente contaminante es potente, constante y los pastos se encuentran muy cerca de ella (distancia menor de 50 m), se puede observar la tendencia al predominio de los HAPs de alto peso molecular (HAP-APM). Por el contrario, si se encuentran alejados de esta van a abundar los HAP-BPM (Crépineau *et al.* 2003). En nuestro caso los sitios de muestreo se encontraron a más de 50 m de las fuentes contaminantes por lo que el comportamiento observado es lógico. Solamente un sitio tuvo un comportamiento diferente (sitio 23 cerca de la

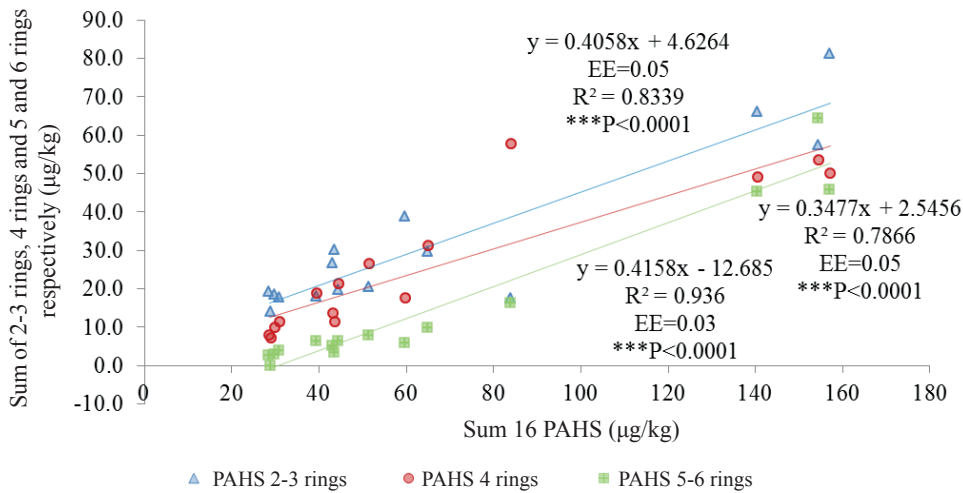


Figure 2. Performance of polycyclic aromatic hydrocarbons (PHHs) in the grass vs. the sum of PAHs of 2-3; 4; 5-6 rings.

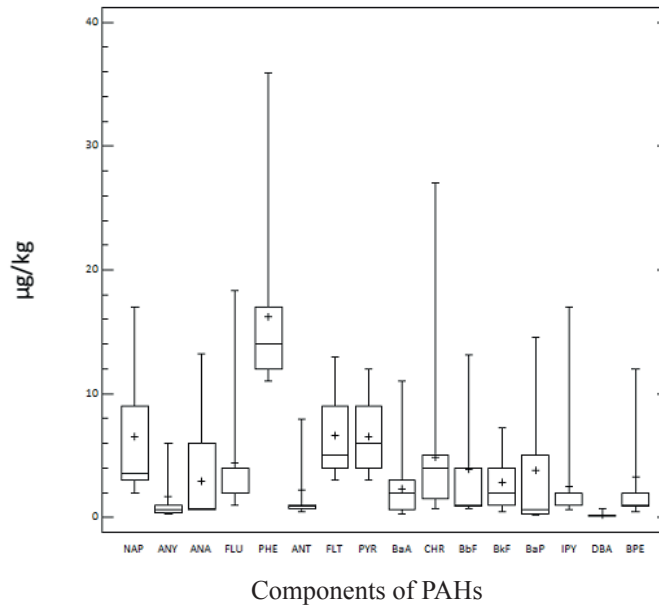


Figure 3. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in grasses from the 15 selected sites.

and it is because it is very close to the contaminating source (figure 1). It should be noted that, although they do not predominate, in the studied grasses, there is PAH-HMW, which indicates the influence of industrial sources or the emission of vehicles. In addition, it has been reported that grasses from rural areas that have little influence from the emitting sources do not have PAHS-HMW, but only PAHS-LMW (Tankari *et al.* 2007). It should be highlighted that there is no legislation for PAHs in grass at the international level and therefore, Cuba does not have regulations in this regard, hence the importance of having preliminary results that allow regulators to know the current problems of each area.

Figure 4 (a and b) shows the molecular relations of BaA/(BaA + CHRY) vs FLU/(FLU + PYR) and IPY/(IPY + BPE) vs. FLU/(FLU + PYR), respectively,

fábrica del cable) y es porque se encuentra muy cerca de la fuente contaminante (figura 1). Cabe destacar que, aunque no predominan, en los pastos estudiados, hay presencia de los HAP-APM, lo que indica la influencia de fuentes industriales o de la emisión de los vehículos. Además, se ha reportado que pastos de zonas rurales que tienen poca influencia de las fuentes emisoras no presentan los HAP-APM, sino sólo se encuentran los HAP-BPM (Tankari *et al.* 2007). Cabe destacar que no existe una legislación para los HAPs en pasto a nivel internacional y por tanto, tampoco Cuba cuenta con regulaciones al respecto, de ahí la importancia de contar con resultados preliminares que le permitan a los organismos reguladores conocer las problemáticas actuales de cada zona.

En la figura 4 (a y b) se muestran las relaciones moleculares de BaA/(BaA+CHRY) vs FLU/(FLU+PYR) y IPY/(IPY+BPE) vs. FLU/(FLU+PYR),

as established by Buchelli *et al.* (2004) to indicate the origin of the contamination. The sites 16, 23 and 38 have a molecular relation that shows that the contamination is from the petroleum combustion, which is related to emissions from vehicles and industries. In the rest of the sampled places the pollution comes from the burning of wood, grass or carbon. In the case of the BaA/(BaA + CHRY) relation there are 4 sites that denote that the source of contamination is by combustion (4, 12, 32 and 38), the first two are under the influence of industrial action, the third by the biomass burning and the fourth by traffic. In the other evaluated grasses, the origin of the contamination is mixed (pyrogenic and petrogenic). The contamination is by combustion in the IPY/(IPY + BPE) ratio in sites 16, 17, 23 and 28, which receive emissions from vehicles and industries. It can be summarized that the contamination in the grasses is of pyrogenic origin (combustion) and by mixed sources (pyrogenic and petrogenic).

respectivamente según establece Buchelli *et al.* (2004) para indicar el origen de la contaminación. Los sitios 16, 23 y 38 tienen una relación molecular que indica que la contaminación es por la combustión del petróleo, lo cual está relacionado con las emisiones de los vehículos y las industrias. En el resto de los lugares muestreados la contaminación procede de la quema de madera, pasto o carbón. En el caso de la relación BaA/(BaA+CHRY) hay 4 sitios que denotan que la fuente de contaminación es por combustión (4, 12, 32 y 38), los dos primeros están bajo la influencia de la acción industrial, el tercero por la quema de biomasa y el cuarto por el tráfico. En los otros pastos evaluados el origen de la contaminación es mixto (pirogénico y petrogénico). La contaminación es por combustión en la relación IPY/(IPY+BPE) en los sitios 16, 17, 23 y 28, los cuales reciben las emisiones de vehículos e industrias. Se puede resumir que la contaminación en los pastos es de origen pirogénico (combustión) y por fuentes mixtas (pirogénico y petrogénico).

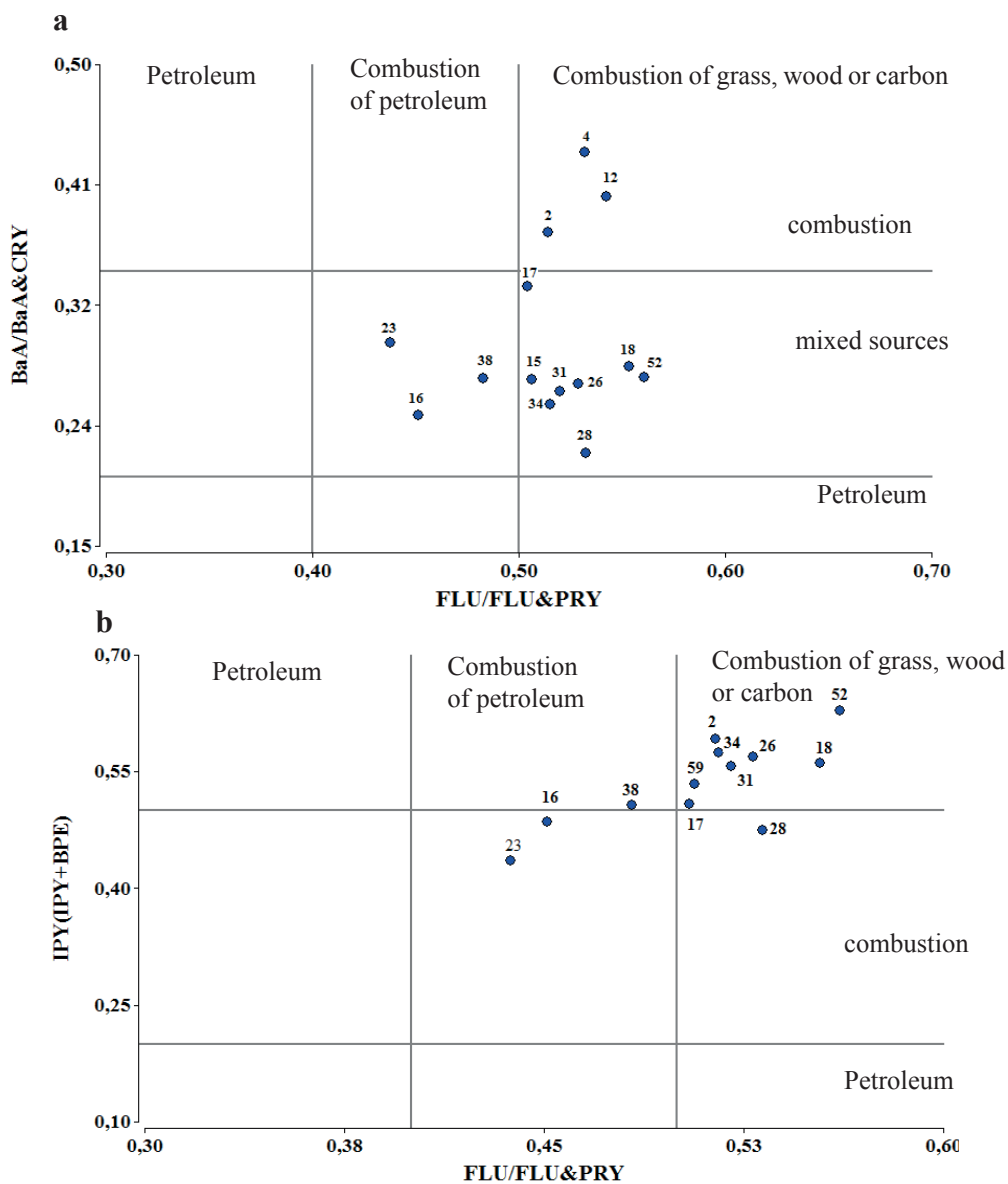


Figure 4. Relations of the polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) that indicate possible origins of the contamination in the grasses. (a) BaA / (BaA + CHRY) vs FLU/(FLU + PYR); (b) IPY / (IPY + BPE).



Although there is no significant difference between the concentration of the 16 PAHs of the grasses and the soils of the 15 studied sites ( $P > 0.05$ ), it can be observed that in 53 % of the samples the relation is higher than 1 and in 47 % lower than 1. Since 1983, it has been reported that the concentration of PAHs is higher in the soil than in the plants that are grown in it. However, in a study in the tropical region of China (Shunde) it was found that there was a relation in the concentration of PAHs between the plant and the soil of 0.53-4.23 with a mean of 2.2 (Li *et al.* 2008). In our case, the range was between 0.13-3.02, with an average of 1.3, there being no significant correlation between them ( $y = -0.009 + 67.65$ ,  $SE = 0.11$ ,  $R^2 = 0.0005$ ,  $P > 0.05$ ). This effect of bioconcentration and poor correlation can be explained by the high atmospheric deposition and the loss of PAHs in tropical soils. The factors that can influence that there is a lower concentration of these compounds are: high temperatures, higher microbial degradation, photo-oxidation, volatilization and leachate (Wikle *et al.* 1999).

When two groups according to the value of the relation between the concentration of the 16 PAHs between the grass (dependent variable) and the soil (independent variable) ( $> 0 < \text{than } 1$ ) were made a positive and significant correlation was observed. The sites which showed a value of the ratio higher than 1, which indicates that the atmospheric deposition predominates ( $y = 2.4109x - 11.073$ ,  $R^2 = 0.8444$ ,  $SE = 0.42$ ,  $P < 0.01$ ), and the sites that had a ratio lower than 1 ( $y = 0.0682x + 30.284$ ,  $R^2 = 0.7388$ ,  $SE = 0.02$ ,  $P \leq 0.05$ ). The strong associations between the variables showed that the PAHs concentrations in the soil influences on the grass.

In this research in the studied sites two grass species predominates: star (*Cynodon nlemfuensis*) and guinea (*Megathyrsus maximus*). These two species have different botanical characteristics. The surface of the star grass leaves is semi-succulent, with smooth margin and medium and long size. On the other hand, the guinea grass is characterized by having long and wide leaves, very well distributed in the stems, with a high ratio of leaf/stem and regrowth rate.

Each plant species has different levels of long chain hydrocarbons (n-alkane) that are part of the cuticular wax, so they have their own "fingerprint" (Cesa and Bakker 2007). Higher n-alkane values are reported in the literature for the species *Panicum maximum* (385 mg/kg of dw) in relation to *Cynodon nlemfuensis* (213.7 mg/kg of dw) (Molina *et al.* 2004), therefore, it was expected to find a difference in the concentration of PAHs in the analyzed species (Srogi 2007). Aspect that was not evident, not finding significant difference with respect to the 16 PAHs, nor in the majority compound (PHE) in both species. It must also taking into account that these analyzes were carried out in real conditions, and the contamination is multifactorial, the sites were

A pesar de que no existe diferencia significativa entre la concentración de los 16 HAPs de los pastos y los suelos de los 15 sitios estudiados ( $P > 0.05$ ), se puede observar que en el 53 % de las muestras la relación es mayor que 1 y en el 47% menor que 1. Desde 1983, se ha informado que la concentración de HAPs es mayor en el suelo que en los vegetales que en él se cultivan. Sin embargo, en un estudio en la región tropical de China (Shunde) se encontró que existía una relación en la concentración de HAPs entre el vegetal y el suelo de 0.53-4.23 con una media de 2.2 (Li *et al.* 2008). En nuestro caso el rango se encontró entre 0.13-3.02, con un promedio de 1.3, no existiendo una correlación significativa entre ellos ( $y = -0.009 + 67.65$ ,  $EE = 0.11$ ,  $R^2 = 0.0005$ ,  $P > 0.05$ ). Este efecto de bioconcentración y pobre correlación puede explicarse por la alta deposición atmosférica y la pérdida de los HAPs en los suelos tropicales. Los factores que pueden influir en que exista una menor concentración de estos compuestos son: las altas temperaturas, la mayor degradación microbiana, foto-oxidación, volatilización y lixiviado (Wikle *et al.* 1999).

Cuando se hicieron dos grupos según el valor de la relación entre la concentración de los 16 HAPs entre el pasto (variable dependiente) y el suelo (variable independiente) ( $> 0 < \text{que } 1$ ) se observó una correlación positiva y significativa. Los sitios que presentaron un valor de la relación mayor que uno, lo cual indica que la deposición atmosférica es la que predomina ( $y = 2.4109x - 11.073$ ,  $R^2 = 0.8444$ ,  $EE = 0.42$ ,  $P < 0.01$ ), y los sitios que tuvieron una relación menor que 1 ( $y = 0.0682x + 30.284$ ,  $R^2 = 0.7388$ ,  $EE = 0.02$ ,  $P \leq 0.05$ ). Las fuertes asociaciones entre las variables indicaron que la concentración de HAPs en el suelo influye en el pasto.

En este trabajo en los sitios estudiados predominaron dos especies de pasto: estrella (*Cynodon nlemfuensis*) y guinea (*Megathyrsus maximus*). Estas dos especies tienen características botánicas diferentes. La superficie de las hojas del pasto estrella es semiescabrosa, de bordes lisos y tamaño mediano y largo. Por otra parte, el pasto guinea se caracteriza por tener hojas largas y anchas, muy bien distribuidas en los tallos, con una alta relación de hoja/tallo y tasa de rebrote.

Cada especie vegetal presenta diferentes niveles de hidrocarburos de cadena largas (n-alcano) que forman parte de la cera cuticular, por lo que tienen su propia "huella dactilar" (Cesa y Bakker 2007). Se reportan en la literatura valores de n-alcános superiores para la especie *Panicum maximum* (385 mg /kg de ps) en relación con *Cynodon nlemfuensis* (213,7 mg/kg de ps) (Molina *et al.* 2004), por lo que se esperaba encontrar diferencia en la concentración de los HAPs en las especies analizadas (Srogi 2007). Aspecto que no se evidenció, al no encontrar diferencia significativa respecto a los 16 HAPs, ni en el compuesto mayoritario (PHE) en ambas especies. También hay que tener en cuenta que estos análisis se realizaron en condiciones reales, y la contaminación es multifactorial, los sitios estaban en diferentes actividades antropogénicas, lo que pudo haber



in different anthropogenic activities, which could have influenced on obtained result.

There are few studies related to the phytotoxic power of PAHs. It has been shown that the presence of PHE in soil and in two plant species significantly induced a lower development of new biomass shoots (Desalme *et al.* 2011).

It can be thought that the predominance of PHE in the soil in our climatic conditions can affect the yields of the grasslands, an aspect that has not been studied and is of great importance in the livestock feeding strategy at present. If it is considered that in the tropics it is impossible to aspire to sustainable milk or meat production without the use of grasses and forages as the main livestock food base. The results of this study constitute a precedent for future researches in which different experimental designs can be performed.

The concentration values of PAHs in milk ranged from 6.86 to 13.49  $\mu\text{g}/\text{kg}$  of milk, with a mean and median of 10.24  $\mu\text{g}/\text{kg}$  and 10.22  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , respectively. Only PAHs with 2 to 4 rings were detected and PHE (56 %) and FLU (21 %) predominated (figure 5).

influido en el resultado obtenido.

Un aspecto poco estudiado y que llama la atención está relacionado con el poder fitotóxico de los HAPs. Se ha demostrado que la presencia de PHE en el suelo y en dos especies de plantas indujo de manera significativa en un menor desarrollo de nuevos brotes de biomasa (Desalme *et al.* 2011).

Se puede pensar que el predominio del PHE en el suelo en nuestras condiciones climáticas pueden afectar los rendimientos de los pastizales, aspecto que no se ha estudiado y es de gran importancia en la estrategia de la alimentación del ganado en la actualidad. Si se considera que en el trópico es imposible aspirar a una producción de leche o carne sostenible sin el empleo de los pastos y forrajes como la principal base alimenticia del ganado. Los resultados de este estudio constituyen un antecedente para investigaciones futuras en las que se puedan llevar a cabo diferentes diseños experimentales.

Los valores de concentración de HAPs en la leche oscilaron entre 6.86 a 13.49  $\mu\text{g}/\text{kg}$  de leche, con una media y mediana de 10.24  $\mu\text{g}/\text{kg}$  y 10.22  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , respectivamente. Se detectaron solamente los HAPs de 2 a 4 anillos y predominaron el PHE (56 %) y el FLU (21 %) (figura 5).

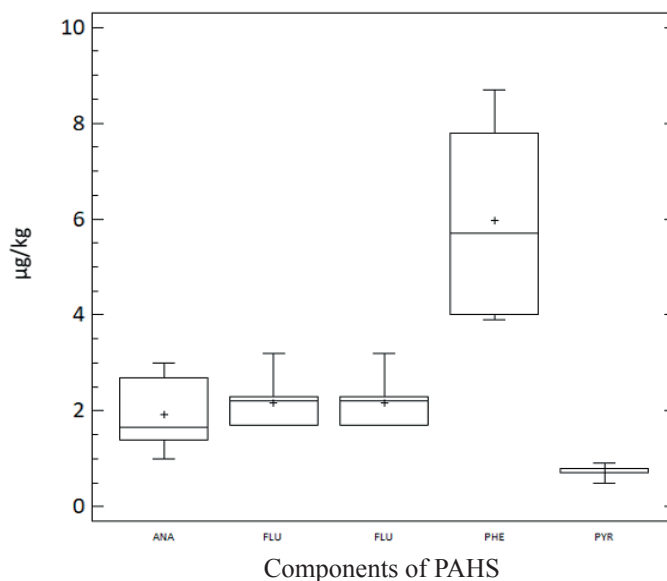


Figure 5. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) presents in the milk from livestock areas of Mayabeque province and Site # 52 of Havana

The obtained results are in the same order of magnitude than those reported by other authors (Aguinaba *et al.* 2007 and Naccari *et al.* 2011) (where the individual values of PAHs are compared). However, they are two orders of magnitude lower than the concentrations found in milk from industrial zones in Hidalgo, Mexico (Gutiérrez *et al.* 2015). Studies have shown that in milk the PAH-BPM are excreted with more easily and more quantity, such as PHE and PYR, and those of high molecular weight such as BaP are excreted mainly in faeces (Lapole *et al.* 2007 and Grova *et al.* 2005). In our study only HAP-

Los resultados obtenidos están en el mismo orden de magnitud que los reportados por otros autores (Aguinaba *et al.* 2007 y Naccari *et al.* 2011) (donde se comparan los valores individuales de los HAPs). Sin embargo, son dos órdenes de magnitud inferior respecto a las concentraciones encontradas en leche procedente de zonas industriales en Hidalgo, México (Gutiérrez *et al.* 2015). Hay estudios que han demostrado que en la leche se excreta con mayor facilidad y cantidad los HAP-BPM como el PHE y el PYR, y los de alto peso molecular como el BaP se excretan fundamentalmente en las heces (Lapole *et al.* 2007 y Grova *et al.* 2005). En nuestro estudio se detectaron solamente los

BPM were detected, which is in accordance with the theory that the absorption of PAHs decreases with the increase of molecular weight (Grova *et al.* 2005), in addition to these milks come, fundamentally, of rural areas with the action of few contaminating sources. Similar results in relation to the presence of PAHs in milk were found in a study in rural areas, while in milks from urban areas near the emission sources in France, appear HAP-APM such as the BaA and CHR (Grova *et al.* 2000).

At present not only attention is paid to native PAHs, but also the biotransformation process of these ones in the organism is taken into account; where the hydrolyzed metabolites of PHE and PYR (1-OH-PYR and 3-OH-PHE) and their native compounds appear at a higher rate than the hydrolysed metabolite of BaP (3-OH-BaP) (Lapole *et al.* 2007). On the other hand, the secondary metabolites have a 10 times higher excretion than their original compounds (Jurjanz *et al.* 2008).

In this study it was observed that as the sum of the 16 PAHs increases, the concentration of PHE, FLU and PYR increases (figure 6). The PHE is the one with the highest concentration as the 16 PAHs increase. This is due to the fact that the PHE easily dissolves in an aqueous medium (rumen), from leaves with a wax surface (example: grass), rapidly metabolizing (Costera *et al.* 2010) and excreting in milk (Grova *et al.* 2005).

HAP-BPM, lo cual está en concordancia con la teoría de que la absorción de los HAPs decrece con el aumento del peso molecular (Grova *et al.* 2005), sumado a que estas leches proceden, fundamentalmente, de zonas rurales con la acción de pocas fuentes contaminantes. Resultados similares en relación con la presencia de HAPs en leche se encontraron en un estudio en zonas rurales, mientras en leches procedentes de zonas urbanas cercanas a las fuentes de emisión en Francia, aparecen HAP-APM como el BaA y CHR (Grova *et al.* 2000).

En la actualidad no sólo se presta atención a los HAPs nativos, sino que se tiene en cuenta el proceso de biotransformación de estos en el organismo; donde los metabolitos hidrolizados de PHE y PYR (1-OH-PYR y 3-OH-PHE) y sus compuestos nativos aparecen con mayor velocidad que el metabolito hidrolizado del BaP (3-OH-BaP) (Lapole *et al.* 2007). Por otra parte, los metabolitos secundarios tienen una excreción 10 veces mayor que la de sus compuestos originales (Jurjanz *et al.* 2008).

En el presente trabajo se observó que en la medida que aumenta la suma de los 16 HAPs se incrementa la concentración del PHE, FLU y PYR (figura 6). El PHE es el que mayor concentración presenta en la medida que aumentan los 16 HAPs. Esto se debe a que el PHE se divide fácilmente en un medio acuoso (rumen), a partir de hojas con superficie de cera (ejemplo: pasto), metabolizándose rápidamente (Costera *et al.* 2010) y excretándose en la leche (Grova *et al.* 2005).

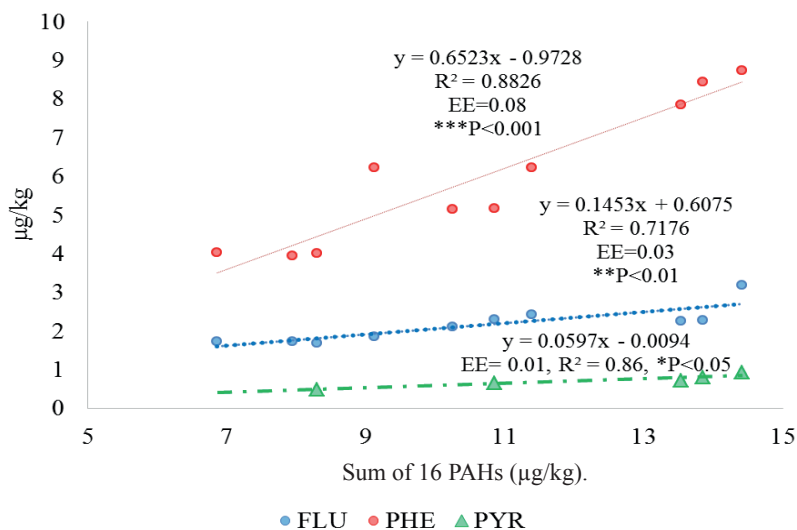


Figure 6. Concentration of FLU, PHE and PYR ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) vs. sum of 16 PAHs ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ ).

The scientific opinion of the Panel of Contaminants in the Food Chain (EFSA 2008) determined that the BaP alone is not an indicator of the occurrence of PAHs in food and have established as markers the set of 2 PAHs (BaP + CHR), 4 PAHs (2 PAH + BaA + BbF) and 8 PAHs (4 PAH + BkF + BPE + DBA + IPY). In August 2011, the current regulation 835/2011 (UE 2011) was established, which became effective on September 1, 2012 and established the maximum permissible limits of these compounds at 1.00  $\mu\text{g}/\text{kg}$  of BaP and the sum

La opinión científica del Panel de Contaminantes en la Cadena Alimentaria (EFSA 2008) determinó que el BaP solo no es un indicador de la ocurrencia de HAPs en alimentos y se han establecido como marcadores el conjunto de 2 HAPs (BaP + CHR), 4 HAPs (2 HAP + BaA + BbF) y 8 HAPs (4 HAP + BkF + BPE + DBA + IPY). En agosto de 2011, se estableció la actual regulación 835/2011 (UE 2011), la cual entró en vigencia el 1ro de septiembre del año 2012 y establecieron los límites máximos permisibles de estos compuestos en

of the 4 PAHs (CHR, BaA, BaP, BbF) in fat and foods with fat such as milk (Purcaro *et al.* 2013).

A study conducted on milk marketed in Argentina and Brazil reported correlations between 2 PAHs and 4 PAHs of 0.95 (even higher than those obtained by EFSA), between 2 PAHs and 8 PAHs of 0.71 and between 4 PAHs and 8 PAHs of 0.83 (García-Londoño *et al.* 2013). In our case, high molecular weight compounds were not found, so the respective correlations were not established, being necessary to emphasize that the milks analyzed have a lower risk for human health. But these data are of great importance because PAH-LMW are barely legislated in food globally and there is a regulation in Germany that has paid attention to them. It has established food limits for PAH-HMW (> 5 rings) of 5 mg/kg and for the total content of PAH-LMW (<3 and 4 rings) of 25 mg/kg of oil or fat (Barra *et al.* 2007). Canadian legislation only covers PAH-HMW (maximum limit, 3 mg/kg) (BaP, DBA, BaA, BbF, BkF, CHR, and BPE), calculated on the basis of the equivalent toxic factor (TEF) (Gutiérrez *et al.* 2015). The concentrations detected in this study also do not exceed these values.

In this research the presence of the 16 PAHs was observed (except in milk, which was not reported the NAP and the PAH-HMW were not observed) in the three matrices: soil (Sosa *et al.* 2017), grass and milk. Although it is very difficult to find correlations between them because the contamination is multifactorial; it was observed in sites 1, 3, 11 that they had in common the contamination source (thermoelectric, SC) a good significant correlation between the concentration of PAHs in the grass (independent variable) and in milk (dependent variable) ( $y = 0.1848x - 17.675$ ,  $SE = 3.9E-03$ ,  $R^2 = 0.9996$ ,  $p < 0.05$ ).

### Conclusions

The presence of PAHs was characterized in grasses and milk, fundamentally from Mayabeque province. It is considered that these foods have a low risk to animal and human health, where milk is considered safe according to European regulations for PAHs. There is a relation in the concentrations of PAHs between soil, grass and milk. This study constitutes the first antecedent that guides that the PAH-LMW are the ones that predominate in grasses and analyzed milks, being the PHE the compound that is in greater proportion.

### Acknowledgments

Thanks to the Fundación de Ciencia de Suiza (SNSF) for the financial support for obtaining these results. Also to the Swiss embassy and to the Swiss cooperation office in Havana for logistical and financial support.

1.00 µg/kg de BaP y la suma de los 4 HAPs (CHR, BaA, BaP, BbF) en grasa y alimentos con grasa como la leche (Purcaro *et al.* 2013).

Un estudio realizado en leche comercializada de Argentina y Brasil reportó correlaciones entre 2 HAPs y 4 HAPs de 0.95 (incluso mayores que las obtenidas por la EFSA), entre 2 HAPs y 8 HAPs de 0.71 y entre 4 HAPs y 8 HAPs de 0.83 (García-Londoño *et al.* 2013). En nuestro caso no se encontraron compuestos de alto peso molecular, por lo que no se establecieron las respectivas correlaciones, siendo necesario destacar que las leches analizadas presentan un menor riesgo para la salud humana. Pero estos datos son de gran importancia pues los HAP-BPM apenas se encuentran legislados en los alimentos a nivel global y existe una regulación en Alemania que sí les ha prestado atención. Ha establecido límites en alimentos para los HAP-APM (> 5 anillos) de 5 mg/kg y para el contenido total de los HAP-BPM (< 3 y 4 anillos) de 25 mg/kg de aceite o de grasa (Barra *et al.* 2007). La legislación de Canadá solo contempla los HAP-APM (límite máximo, 3 mg/kg) (BaP, DBA, BaA, BbF, BkF, CHR, and BPE), calculado en base al factor tóxico equivalente (TEF) (Gutiérrez *et al.* 2015). Las concentraciones detectadas en este estudio tampoco sobrepasan estos valores.

En esta investigación se observó la presencia de los 16 HAPs (excepto en leche, que no se reportó el NAP y no se observaron los HAP-APM) en las tres matrices: suelo (Sosa *et al.* 2017), pasto y leche. Aunque es muy difícil encontrar correlaciones entre ellas debido a que la contaminación es multifactorial; se observó en los sitios 1, 3, 11 que tenían en común la fuente de contaminación (termoeléctrica, SC) una buena correlación significativa entre la concentración de los HAPs en el pasto (variable independiente) y en leche (variable dependiente) ( $y = 0.1848x - 17.675$ ,  $EE = 3.9E-03$ ,  $R^2 = 0.9996$ ,  $p < 0.05$ ).

### Conclusiones

Se caracterizó la presencia de HAPs en pastos y leche fundamentalmente de la provincia de Mayabeque. Se considera que estos alimentos presentan bajo riesgo para la salud animal y humana, donde la leche se considera inocua de acuerdo con las regulaciones europeas para HAPs. Existe una relación en las concentraciones de HAPs entre el suelo, el pasto y la leche. Este estudio constituye el primer antecedente que orienta que los HAP-BPM son los que más predominan en los pastos y las leches analizadas, siendo el PHE el compuesto que se encuentra en mayor proporción.

### Agradecimientos

Se le agradece a la Fundación de Ciencia de Suiza (SNSF, según sus siglas en inglés) por el apoyo financiero para la obtención de estos resultados. También a la embajada Suiza y a la Oficina de Cooperación Suiza en La Habana por el apoyo logístico y financiero.

## References

- Aguinaga, N., Campillo, N., Vinas, P. & Hernandez-Cordoba, M. 2007. Determination of 16 polycyclic aromatic hydrocarbons in milk and related products using solid-phase microextraction coupled to gas chromatography-mass spectrometry. *Anal Chim Acta*. 596:285-290.
- AOAC. 2005. AOAC Official Method 989.05 Fat in Milk Modified Mojonnier Ether Extraction Method First Action 1989 Final Action 1992 IDF-ISO-AOAC Method.
- Bakker, M.I., Koerselman, J.W., Tolls, J. & K. C. 2001. Localization of deposited polycyclic aromatic hydrocarbons in leaves of plantago. *Environ. Toxicol. Chem.* 20:1112-1116.
- Barra, R., Castillo, C. & Torres, J.P. 2007. Polycyclic aromatic hydrocarbons in the South American environment. *Rev Environ Contam Toxicol.* 191:1-22.
- Bogdal, C., Scheringer, M., Abad, E., Abalos, M., Van Bavel, B., Hagberg, J., & Fiedler, H. 2013. Worldwide distribution of persistent organic pollutants in air, including results of air monitoring by passive air sampling in five continents. *TrAC Trends in Analytical Chemistry.* 46:150-161.
- Bucheli, T.D., Blum, F., Desaulles, A. & Gustafsson, Ö. 2004. Polycyclic aromatic hydrocarbons, black carbon, and molecular markers in soils of Switzerland. *Chemosphere* 56:1061-1286.
- Cabrerizo, A., Dachs, J., Moeckel, C., Ojeda, M.J., Caballero, G., Barceló, D. & Jones, K. 2011. Ubiquitous Net Volatilization of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons from Soils and Parameters Influencing Their Soil-Air Partitioning. *Environmental Science & Technology.* 45:4740-4747.
- Cesa, A. & Bakker, M. 2007. Estudio inicial del contenido y patrón de alcanos en especies forrajeras con diferente nivel de preferencia por los ovinos en la estepa patagónica, Santa Cruz, Argentina. XXX Reunión de la Asociación Latinoamericana de Producción Animal (ALPA), XXX Reunión de la Asociación Peruana de Producción Animal (APPA) y Congreso Internacional de Ganadería de Doble Propósito. p. 22.
- CODEX. 2004. General Guidelines on Sampling. Normas Oficiales del CODEX CAC/GL 50-2004.
- Costera, A., Rychen, G.O., Feidt, C., Sligo, Cl. & Jurjan, S. 2010. Ruminal disappearance of PAHs in contaminated grass using the nylon bag technique. *Agronomy for Sustainable Development.* 30:769-775.
- Crépineau, C., Rychen, G., Feidt, C., Le Roux, Y., Lichtfouse, E. & Laurent, F. 2003. Contamination of pastures by polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in the vicinity of a highway. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* 51:4841-4845.
- Cuellar, de la C., Fresneda, E., Rivero C., Thompson, C.J., Sánchez, M.G. & González, Y. 2015. Plan de manejo sostenible de tierra para la producción de leche en la UBPC Aguadita, Cienfuegos, Cuba. *Pastos y Forrajes.* 38:448-456.
- Cuesta, O. C., Pérez, C. S., Ramirez, C. I., Jaime, Y. G., Caraballo, V. N., Hernández, A. F., Imbert, C., Barcia S., Gómez, Y. & Castillo, D. P. 2017. Inventario nacional de emisiones atmosféricas de las principales fuentes fijas. *Revista Cubana de Meteorología,* 23:178-190.
- Desalme, D., Binet, P.H., Bernard, N., Gilbert, D., Toussaint, M.L. & Chiapusio, G. 2011. Atmospheric phenanthrene transfer and effects on two grassland species and their root symbionts: A microcosm study. *Environmental & Experimental Botany* 71:146-151.
- Di Rienzo, J. A., Casanoves, F., Balzarini, M. G., González, L., Tablada, M. & Robledo, C. W. 2012. InfoStat ver 2012. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. Available: <http://www.infostat.com.ar>.
- EFSA. 2008. Findings of the EFSA Data Collection on Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Food. En A Report from the Unit of Data Collection and Exposure on a Request from the European Commission. European Food Safety Authority. EFSA/DATEX/002 (revision1) Available: <<http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/pub/33r.htm>> [Consulted: March 10, 2018].
- FIL/IDF. 1995. Milk and milk products. Guidance sampling: FIL-IDF Standard 50C. I. D. Federation. Brussels, Belgium: 19. FIL/IDF:141C: 2000. Whole milk—Determination of milk fat, protein and lactose content. Guide for the operation of midinfrared instruments. I. S. Organization.
- Gao, Y. L., & Sun, P. 2018. Determination of five pyrethroid pesticides residue in liquid milk by gas chromatography using multi-walled carbon nanotubes as dispersion solid phase extraction sorbent. *Acta Chromatographica,* 30:141-146.
- García-Londoño, V., García, L., Scussel, V. & Resnik, S. 2013. Polycyclic aromatic hydrocarbons in milk powders marketed in Argentina and Brazil. *Food Additives & Contaminants: Part A* 30:1573-1580.
- Grova, N., Laurent, C., Feidt, C., Rychen, G., Laurent, F., & Lichtfouse, E. 2000. Gas chromatography-mass spectrometry study of polycyclic aromatic hydrocarbons in grass and milk from urban and rural farms. *European Journal of Mass Spectrometry,* 6: 457-460.
- Grova, N., Monteau, F., Le Bizec, B., Feidt, C., Andre, F. & Rychen, G. 2005. Determination of phenanthrene and hydroxyphenanthrenes in various biological matrices at trace levels using gas chromatography-mass spectrometry. *J Anal Toxicol* 29:175-181.
- Gubler, A., Wächter, D., Blum, F. & B, T.D. 2015. Remarkably constant PAH concentrations in Swiss soils over the last 30 years. *Environ Sci Process Impacts* 14:1816-1828.
- Gutiérrez, R., Vega, S., Ortiz, R., Pérez, J. & Schettino, B. 2015. Presence of PAHs in milk of industrial farms from Tizayuca, Hidalgo, México. *Journal of Environmental Science and Health, Part B.* 50:317-321.
- ISO:8196-1:2009. Milk. Definition and evaluation of the overall accuracy of alternative methods of milk analysis. Part 1: Analytical attributes of alternative methods. I. S. Organization. Edición 2, Suiza, pp. 13.
- Jurjan, S., Rychen, G. & Feidt, C. 2008. Dairy livestock exposure to persistent organic pollutants and their transfer to milk: A review. *Impact and Pollution on Animal Products.* 63-86.



- Lapole, D., Rychen, G., Grova, N., Monteau, F., Le Bizec, B. & Feidt, C. 2007. Milk and urine excretion of polycyclic aromatic hydrocarbons and their hydroxylated metabolites after a single oral administration in ruminants. *Journal of dairy science*. 90:2624-2629.
- Li, H. & Ma, Y. 2016. Field study on the uptake, accumulation, translocation and risk assessment of PAHs in a soil-wheat system with amendments of sewage sludge. *Science of the Total Environment*. 55:560-561.
- Li, Y.T., Li, F. B., Chen, J.J., Yang, G.Y., Wan, H.F., Zhang, T.B., Zeng, X.D. & Liu, J.M. 2008. The concentrations, distribution and sources of PAHs in agricultural soils and vegetables from Shunde, Guangdong, China. *Environmental Monitoring and Assessment*. 139:61-76.
- Milera, M., López, O. & Alonso, O. 2018. Principios generados a partir de la evolución del manejo en pastoreo para la producción de leche bovina en Cuba. *Pastos y Forrajes*, 37: 382- 391.
- Miller, R.G. 1981. *Simultaneous Statistical Inference*. 2nd Ed. Springer-Verlag, Heidelberg and Berlin.
- Molina, D.O., Matamoros, I., Almeida, Z., Tedeschi, L. & Pell, A.N, 2004. Evaluation of the dry matter intake predictions of the Cornell Net Carbohydrate and Protein System with Holstein and dual-purpose lactating cattle in the tropics. *Animal Feed Science and Technology* 114:261-278.
- Naccari, C., Cristani, M., Giofrè, F., Ferrante, M., Siracusa, L. & Trombetta, D. 2011. PAHs concentration in heat-treated milk samples. *Food Research International*. 44:716-724.
- Nadal, M., Schuhmacher, M., & Domingo, J. L. 2004. Levels of PAHs in soil and vegetation samples from Tarragona County, Spain. *Environmental Pollution*, 132:1-11.
- NMKL. 2010. Procedimiento No 4 Validación de métodos analíticos. Editor Ole Bjørn Jensen , países nórdicos, 1-47.
- Panigrahi, S., Sheoran, M. S., & Ganguly, S. 2017. Antibiotic residues in milk-a serious public health hazard. *Journal of Environment and Life Sciences*. 2:99-102.
- Pérez, J. 2012. Ocurrencia y distribución de hidrocarburos policíclicos aromáticos y bifenilos policlorados en ecosistemas agropecuarios en Tuxpan, Veracruz, México. PhD Thesis. Universidad Autónoma Metropolitana de Xochimilco, México.
- Purcaro, G., Moret, S. & Conte, L.S. 2013. Overview on polycyclic aromatic hydrocarbons: Occurrence, legislation and innovative determination in foods. *Talanta*. 105:292-305.
- Rychen, G., Jurjanz, S., Toussaint, H. & Feidt, C. 2008. Dairy ruminant exposure to persistent organic pollutants and excretion to milk. *Animal*. 2:312-323.
- Sosa, D., Hilber, I., Faure, R., Bartolomé, N., Fonseca, O., Keller, A. & Bucheli, T.D. 2017. Polycyclic aromatic hydrocarbons and polychlorinated biphenyls in soils of Mayabeque, Cuba. *Environ Sci Pollut Res Int*. 24:12860-12870.
- Srogi, K. 2007. Monitoring of environmental exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons: a review. *Environmental Chemistry Letters*. 5:169-195.
- Tankari, A., Crépineau, C., Soligot, C., Feidt, C. & Rychen, G. 2007. Deposition of platinum group elements and polycyclic hydrocarbons on ryegrass exposed to vehicular traffic. *Agron. Sustain. Dev*. 27:261-266.
- UE: 2011. Reglamento de la (UE) No 835/2011 de la Comisión de 19 de agosto de 2011 que modifica el Reglamento (CE) no 1881/2006 por lo que respecta al contenido máximo de hidrocarburos aromáticos policíclicos en los productos alimenticios. D. O. d. I. U. E. L. 215/4.
- Wilcke, W., Müller, S., Kanchanakool, N., Niamskul, C. & Zech, W. 1999. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in hydromorphic soils of the tropical metropolis Bangkok. *Geoderma*. 91:297-309.

**Received: April 25, 2018**