UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE MEDICINA

IMPLEMENTACION DE UN METODO DE EXTRACCION PARA LA DETERMINACION DE DIOXINAS EN CARNES

Por

Q. C. B. ANABEL TORRES CIRIO

Como requisito parcial para obtener el Grado de
MAESTRIA EN CIENCIAS con Orientación Terminal
en Química Biomédica

Julio, 2006

Q. C. B. ANABEL TORRES CIRIO

TM
RA1242
.D55
T67
2006
c.1

1080146379

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE MEDICINA

IMPLEMENTACIÓN DE UN MÉTODO DE EXTRACCIÓN PARA LA DETERMINACIÓN DE DIOXINAS EN CARNES

Por

Q. C. B. ANABEL TORRES CIRIO.

Como requisito parcial para obtener el Grado de
MAESTRÍA EN CIENCIAS con Orientación Terminal
en Química Biomédica

Julio, 2006

Rangel Frias
FONDO
TESIS MAESTRIA

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE MEDICINA

IMPLEMENTACIÓN DE UN MÉTODO DE EXTRACCIÓN PARA LA DETERMINACIÓN DE DIOXINAS EN CARNES

Por

Q. C. B. ANABEL TORRES CIRIO.

Como requisito parcial para obtener el Grado de
MAESTRÍA EN CIENCIAS con Orientación Terminal
en Química Biomédica

Julio, 2006

IMPLEMENTACIÓN DE UN MÉTODO DE EXTRACCIÓN PARA LA DETERMINACIÓN DE DIOXINAS EN CARNES

Aprobación de la Tesis:

M.C. LIDIA RUNIA NACCHA TORRES
Director de Tesis

DRA. NOEMÍ WAKSMAN DE TORRES
Co – Director de Tesis

M.C. NORMA CECILIA CAVAZOS ROCHA
Co – Director de Tesis

DR. DIONICIO A. GALARZA DELGADO
Subdirector de Estudios de Posgrado

IMPLEMENTACIÓN DE UN MÉTODO DE EXTRACCIÓN PARA LA DETERMINACIÓN DE DIOXINAS EN CARNES

Presentado por:

Q. C. B. ANABEL TORRES CIRIO.

Este trabajo se realizó en el Departamento de Química Analítica de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León, bajo la Dirección de la M.C. Lidia Runia Naccha Torres y la Co-Dirección de la Dra. Noemí Waksman de Torres y de la M.C. Norma Cecilia Cavazos Rocha.

FIRMAS

DIRECTOR

M.C. Lidia Runia Naccha Torres

CO – DIRECTOR

Dra. Noemí Waksman de Torres

CO – DIRECTOR

M.C. Norma Cecilia Cavazos Rocha

Dedico esta tesis con todo mi amor a mis padres y hermanos por su apoyo incondicional, ya que en todo momento, sé que puedo contar ellos.

En el camino del éxito, siempre hay obstáculos, pero lo primordial es poder avanzar en él a pesar de todas las adversidades, lo más importante es alcanzarlo y disfrutarlo. El sonreír abre puertas y la fe mueve montañas.

Anónimo.

AGRADECIMIENTOS

Deseo expresar mi más sincera gratitud, a todas las personas que me ayudaron en la realización de éste trabajo, por sus consejos, sus conocimientos y su tiempo, gracias.

En primer lugar, a **Dios** por darme la vida y la sabiduría para poder salir adelante en mis proyectos y llegar a la terminación de mi tesis, además de guiarme por el buen camino.

A mis padres **Manuel Alfonso Torres González y María del Socorro Cirio Mendoza,** que me otorgaron la más valiosa de las herencias consistente en una buena educación para afrontar las vicisitudes de la vida.

A mis hermanos **Manuel Alfonso Torres Cirio e Israel de Jesús Torres Cirio,** por sus enseñanzas, paciencia y cariño en todos los momentos importantes de mi vida.

A mis **abuelos, tías y primos,** que siempre estuvieron conmigo, gracias por sus oraciones y por todo el cariño que me brindan todos los días.

A la asesora de esta tesis **M. C. Lidia R. Naccha Torres,** por compartir sus conocimientos y su tiempo conmigo. Que Dios la bendiga en compañía de su familia.

A la **Dra. Noemí Waksman de Torres,** por brindarme la oportunidad de terminar mi tesis y tener la confianza de que podría seguir adelante, ayudándome a seguir avanzando.

A la **M. C. Norma C. Cavazos Rocha,** por su apoyo y dedicación para la realización de esta tesis. Gracias por todos los momentos compartidos en las largas jornadas de trabajo.

A todos **mis amigos,** en especial a los que me han acompañado en éste proyecto, que me han apoyado en las buenas y en las malas. Gracias por brindarme esa sonrisa que me ha ayudado a seguir adelante.

A **Alejandra, Bricehidy, Judith y Ricardo** porque no me dejaron rendirme y me alentaron a seguir adelante, ayudándome a tomar las mejores decisiones. Gracias por su sincera amistad.

A **Rocío Castro, Paula Cordero, Maribel Esparza, Aurora Garza, Rosalba Ramírez y Ma. de la Luz Salazar,** por su apoyo en los momentos en que más las he necesitado. Gracias por sus consejos y llamadas de atención, ya que por eso he llegado a mi meta y que Dios me las llene de salud y amor.

A **Gloria Martínez, Martha Ortiz y Graciela Peña** por las atenciones brindadas para poder realizar éste trabajo.

A mis **maestros y compañeros de trabajo del Departamento de Química Analítica,** por compartir sus experiencias y enseñanzas. Gracias.

A la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (**SAGARPA – CONACYT 2002-C01-1140**) y al Programa de Apoyo a la Investigación Científica y Tecnología de la UANL (**PAICYT CA440 – 04**) por su apoyo financiero al proyecto.

Al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología** (CONACYT) por la beca de manutención con registro No. 172010 otorgada para la realización de mis estudios de Maestría en Ciencias con Orientación Terminal en Química Biomédica.

A todas aquellas personas que no mencioné, pero que en algún momento han estado conmigo apoyándome y brindándome su amistad, les agradezco sinceramente su interés en que yo terminará mi tesis, muchas gracias.

RESUMEN

Q.C.B. Anabel Torres Cirio
Universidad Autónoma de Nuevo León
Facultad de Medicina

Fecha de graduación: Julio de 2006

Título del estudio: **IMPLEMENTACIÓN DE UN MÉTODO DE EXTRACCIÓN PARA LA DETERMINACIÓN DE DIOXINAS EN CARNES**

Número de páginas: 80

Candidato para el grado de Maestría en Ciencias con Orientación Terminal en Química Biomédica

Área de estudio: Química Analítica.

Propósito y Método de Estudio:

Las Policlorodibenzo-*p*-dioxinas (PCDDs) y los Policlorodibenzofuranos (PCDFs) son comúnmente conocidos como "dioxinas". Las dioxinas han sido consideradas como los compuestos más tóxicos producidos por el hombre. Dentro de este grupo, la 2,3,7,8-tetraclorodibenzo-p-dioxina (TCDD) es conocida como la más tóxica y peligrosa. La exposición de la población a estos compuestos se produce a través del ambiente, pero principalmente a través de la cadena alimenticia, sobre todo de tejido graso animal. En México no se tiene establecida una metodología analítica que permita la detección rápida y sensible de estos compuestos en alimentos.

En este trabajo se presenta la implementación y validación del proceso de extracción para la determinación de dioxinas en carnes.

El proceso de extracción de los PCDDs y PCDFs se realizó en cuatro etapas: 1) pretratamiento de la muestra, 2) extracción de dioxinas, 3) purificación y fraccionamiento y 4) separación y detección. El pretratamiento consistió en la congelación de la muestra, su liofilización y la extracción de grasa. La extracción de dioxinas se realizó con ataque ácido. La purificación y fraccionamiento se llevó a cabo con las sustancias adsorbentes sílica gel, florisil y alúmina. La separación y detección se realizó empleando el GC/LRMS. Las muestras fueron identificadas con la solución EPA–1613LCS y cuantificadas con el estándar EPA–1613ISS. Para determinar la recuperación se usó el estándar EPA-1613PAR.

El trabajo desarrollado se validó empleando los criterios recomendados por el método USEPA 1613, el cual considera los porcentajes de recuperación y precisión. Los porcentajes de recuperación para los 17 congéneres estuvieron dentro de los límites establecidos, al igual que los de precisión; los cuales fueron menores que 20%. Se analizaron muestras de carne y los resultados se compararon con los obtenidos en un equipo de Alta Resolución (HRGC/HRMS) del Laboratorio de Dioxinas del Instituto de Investigaciones Químicas y Ambientales del Centro Superior de Investigaciones Científicas (IIQAB-CSIC), Barcelona, España. Los resultados fueron sustancialmente equivalentes.

Conclusiones y contribuciones:

Se cuenta con un método de extracción exacto y preciso para la determinación de dioxinas en carnes. El método desarrollado permite analizar muestras de carne y detectar muestras contaminadas. Los resultados obtenidos con el equipo de GC/LRMS permitirán realizar el rastreo de dioxinas en carne de res.

FIRMA DEL DIRECTOR

M.C. Lidia Runia Naccha Torres

ÍNDICE

CAPÍTULO	Página
1. INTRODUCCIÓN	**1**
1.1 Compuestos orgánicos persistentes	1
1.1.1 Definición	1
1.1.2 Propiedades	2
1.1.3 Clasificación	3
1.2 Dioxinas	4
1.2.1 Definición	4
1.2.2 Propiedades físicas y químicas	5
1.2.3 Fuentes de generación de PCDDs y PCDFs	6
1.2.4 Fuentes de exposición humana	7
1.2.5 Efectos tóxicos sobre la salud	8
1.2.6 Niveles de Toxicidad	9
1.2.7 Legislación	11
1.3 Carne	14
1.3.1 Definición	14
1.4 Métodos para la determinación de dioxinas	15
1.4.1 Toma de muestras	16
1.4.2 Extracción	16
1.4.3 Purificación y Fraccionamiento	17
1.4.4 Separación y detección	18
1.5 Justificación	20
1.6 Objetivos	20
1.6.1 Objetivo General	20
1.6.2 Objetivos Específicos	21
2. MATERIAL Y MÉTODOS	**22**
2.1 Equipo, material y reactivos	22
2.1.1 Equipo	22
2.1.2 Materiales	23
2.1.3 Reactivos	24

2.1.4 Solventes 25
2.2 Soluciones estándares EPA 1613 26
2.3 Establecimiento de las condiciones de análisis de PCDDs/PCDFs por GC/LRMS 30
2.4 Validación del sistema cromatográfico 33
2.4.1 Ventanas de tiempo de retención 33
2.4.2 Valle de isómeros específicos 34
2.4.3 Nivel mínimo cuantificable 34
2.4.4 Relación de abundancia de iones isotópicos 34
2.4.5 Linearidad 36
2.5 Implementación de un método de extracción de los PCDDs/PCDFs para las muestras de carne 37
2.5.1 Toma de muestras 38
2.5.2 Extracción de dioxinas 38
2.5.3 Purificación y fraccionamiento 39
2.5.3.1 Preparación de los adsorbentes para la etapa de purificación y fraccionamiento de los PCDDs/PCDFs 39
2.5.3.2 Columna de sílica gel modificada 40
2.5.3.3 Columna de florisil 42
2.5.3.4 Columna de alúmina 43
2.5.4 Separación y detección 44
2.6 Validación del método de extracción para la determinación de PCDDs/PCDFs en carnes 44
2.6.1 Porcentaje de recuperación 45
2.6.2 Precisión 46
2.7 Aplicación del método validado en muestras de carne 46
2.7.1 Selección de muestras 46
2.7.2 Procesamiento de las muestras 46
2.7.3 Niveles de PCDDs/PCDFs de acuerdo a su Toxicidad 47

3. RESULTADOS **48**
3.1 Condiciones cromatográficas 48
3.2 Extracción y purificación de la muestra 49
3.3 Validación del método desarrollado 54
3.3.1 Porcentajes de recuperación 54
3.3.2 Precisión 55
3.4 Niveles de PCDDs/PCDFs en muestras de carne 56
3.5 Niveles de PCDDs/PCDFs de acuerdo a su Toxicidad 58
3.6 Comparación de Concentraciones de Equivalentes Tóxicos de PCDDs/PCDFs en muestras de carne 60

4. DISCUSIÓN **62**
4.1 Condiciones cromatográficas 62
4.2 Extracción y purificación de la muestra 65
4.3 Validación del método desarrollado 67
4.3.1 Porcentaje de recuperación 67
4.3.2 Precisión 68
4. 4 Niveles de PCDDs/PCDFs en muestras de carne 69
4.5 Niveles de PCDDs/PCDFs de acuerdo a su Toxicidad 70
4.6 Comparación de Concentraciones de Equivalentes Tóxicos de PCDDs/PCDFs en muestras de carne 71

5. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS **73**
5.1 Conclusiones 73
5.2 Perspectivas 74

BIBLIOGRAFÍA **75**

LISTA DE TABLAS

Tabla		Página
I.	Factores de Equivalencia Tóxica de los PCDDs/PCDFs.	10
II.	Contenidos máximos de dioxinas y furanos en alimentos.	13
III.	Análisis químico aproximado de la mayoría de las carnes.	15
IV.	Fases estacionarias utilizadas y la clase de compuestos que remueven en cada fase.	17
V.	Métodos analíticos para la determinación de dioxinas en carne.	19
VI.	Concentración de las mezclas de los estándares EPA – 1613CS de PCDDs/PCDFs.	27
VII.	Composición de las mezclas de los estándares indicados por el método USEPA 1613.	29
VIII.	Masas exactas y las relaciones de abundancias de iones isotópicos teóricos (método USEPA 1613).	35
IX.	Criterios de validación obtenidos por GC/LRMS de los 17 congéneres PCDDs/PCDFs.	49
X.	Resultados de los porcentajes de recuperación para determinar los congéneres de PCDDs/PCDFs.	55
XI.	Resultados de la precisión del método para determinar los 17 congéneres de PCDDs/PCDFs.	56

XII. Niveles de PCDDs/PCDFs en muestras de carne en pg/g de grasa. 58

XIII. Resultados de las muestras de carne expresados como TEQ. 59

XIV. Comparación de Concentraciones de Equivalentes Tóxicos de PCDDs/PCDFs en muestras de carne. 61

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1.	(a) Fórmula general de los PCDFs y las PCDDs. (b) 2, 3, 7, 8- Tetraclorodibenzo -p-dioxina (2, 3, 7, 8 - TCDD).	4
2.	Columna de sílica gel modificada.	41
3.	Columna de florisil.	42
4.	Columna de alúmina.	43
5.	Cromatograma del estándar de 10 a 100 ng/mL de los 17 congéneres PCDDs/PCDFs analizados por GC/LRMS.	48
6.	Cromatograma de la muestra adicionada con el estándar EPA – 1613PAR, sin control de la temperatura del laboratorio.	50
7.	Cromatograma de la muestra adicionada con el estándar EPA – 1613PAR, a una temperatura de laboratorio de 24 °C.	51
8.	Cromatograma de la muestra adicionada con el estándar EPA – 1613PAR, con una cantidad de grasa entre 5 a 10 g de grasa.	52
9.	Cromatograma de la muestra adicionada con el estándar EPA – 1613PAR, con control de la velocidad de flujo.	52
10.	Cromatograma de una muestra de carne.	57

ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

Abreviatura o Símbolo	
$A1l + A2l$	Suma de las áreas de los iones primario y secundario de los PCDDs/PCDFs marcados isotópicamente con $^{13}C_{12}$
$A1n + A2n$	Suma de las áreas de los iones primario y secundario de los PCDDs/PCDFs nativos
$AgNO_3$	Nitrato de plata
°C	Grados Celsius
Cax	Concentración añadida
CCAH	Comité Científico de la Alimentación Humana
CDD	Chlorinated Dibenzo-p-dioxin (Dibenzo-p-dioxina clorinado)
CDF	Chlorinated Dibenzofuran (Dibenzofurano clorinado)
CE	Comunidad Europea
Cex	Concentración encontrada
Cl	Concentración de los compuestos marcados isotópicamente con $^{13}C_{12}$
Cn	Concentración de los compuestos nativos
COPs	Contaminantes Orgánicos Persistentes
CS	Calibration Standard (Solución de Calibración y Verificación)
CV	Coeficiente de Variación
DCDDs	Diclorodibenzo-p-dioxinas
DCDFs	Diclorodibenzofuranos
DCM	Diclorometano
DDE	Diclorodifeniléter
DDT	Diclorodifeniltricloroetano
EI	Impacto Electrónico
EM	Espectrometría de Masas
EPA	Environmental Protection Agency (Agencia de Protección del Medio Ambiente)
FMS	Fluid Management Systems (Sistema Automatizado de

	Purificación)
g	Gramo
GC	Cromatógrafo de Gases
GC/LRMS	Cromatografía de Gases acoplada a un detector de Espectrometría de Masas de Baja Resolución
h	Hora
H_2SO_4	Ácido sulfúrico
HCB	Hexaclorobenzeno
HpCDD	Heptaclorodibenzo-p-dioxina
HpCDF	Heptaclorodibenzofurano
HPLC	Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución
HRGC	Cromatografía de Gases de Alta Resolución
HRGC/HRMS	Cromatografía de Gases de Alta Resolución acoplada a un detector de Espectrometría de Masas de Alta Resolución
HRMS	Espectrometría de Masas de Alta Resolución
HxCDD	Hexaclorodibenzo-p-dioxina
HxCDF	Hexaclorodibenzofurano
IARC	International Agency for Research on Cancer (Agencia International para la Investigación del Cáncer)
ID	Incide Diameter (Diámetro interno)
IDT	Ingestión Diaria Tolerable
IIQAB-CSIC	Instituto de Investigaciones Químicas y Ambientales del Centro Superior de Investigaciones Científicas
ISS	Internal Standard Spiking Solution (Solución Estándar Interno)
K – D	Concentrador Kuderna – Danish
L	Litro
LCS	Labelled Compound Stock Solution (Solución Stock de Compuestos Marcados Isotópicamente con $^{13}C_{12}$)
M	ion Molecular
<	Menor que
>	Mayor que
m/z	Mass-to-charge-ratio (Masa/carga)

MgO	Óxido de Magnesio
mg	Miligramo
min	Minuto
mL	Mililitro
mm	Milímetro
MS	Mass Spetrometry (Espectrometría de Masas)
N	Concentración Normal
N	Tamaño de muestra
N. D.	No Detectable
Na_2SO_4	Sulfato de sodio
NaOH	Hidróxido de sodio
Ng	Nanogramo
ng/Kg	Nanogramo por kilogramo
ng/mL	Nanogramo por mililitro
NOM	Norma Oficial Mexicana
OCDD	Octaclorodibenzo-p-dioxina
OCDF	Octaclorodibenzofurano
OMS	Organización Mundial de la Salud
ONU	Organización de las Naciones Unidas
PAHs	Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos
PAR	Precision and Recovery Stock Solution (Solución Stock de Recuperación y Precisión)
PCBPEs	Bencil fenil eterpoliclorados
PCBs	Polychlorinated Biphenyls (Bifenilos policlorados)
PCDD	Policlorodibenzo-p-dioxina
PCDE	Polychlorinated Diphenylethers (Policlorodifenil éteres)
PCDF	Policlorodibenzofurano
PCDPEs	Policlorodifenil esters
PCNs	Polychlorinated Naphthalenes (Policloronaftalenos)
PCSt	Polychlorinated Styroles (Policloroestiroles)
PeCDD	Pentaclorodibenzo-p-dioxina
PeCDF	Pentaclorodibenzofurano
pg	Picogramo

pg/g grasa	Picogramo por gramo de grasa
pg/Kg	Picogramo por kilogramo
POPs	Persistent Organic Pollutants (Contaminantes Orgánicos Persistentes)
%	Porcentaje
$\bar{x}$	Promedio
% R	Recuperación en porcentaje
RR	Relative Response (Respuesta Relativa)
RSD	Relative Standard Deviation (Desviación Estándar Relativa)
SAGARPA	Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación
S/N	Señal/Ruido
SD	Standard Deviation (Desviación Estándar)
SIM	Selected Ion Monitoring (Modo Selectivo de Iones)
SiO_2	Sílica gel
TCDD	Tetraclorodibenzo-p-dioxina
TCDF	Tetraclorodibenzofurano
TEF	Toxic Equivalency Factor (Factor de Equivalencia Tóxica)
TEQ	Toxic Equivalent Concentration (Concentración de Equivalente Tóxica)
TEQ-OMS	Equivalentes Tóxicos de la Organización Mundial de la Salud
UNEP	United Nations Environment Programme (Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente)
USEPA	United States Environmental Protection Agency (Agencia de Protección Medioambiental de Estados Unidos)
UV	Ultravioleta
μg/mL	Microgramo por militro
μL	Microlitro
μm	Micrómetro
WHO	World Health Organization (Organización Mundial de la Salud)
Ws	Peso de la grasa de la muestra

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN

1.1 Compuestos orgánicos persistentes

1.1.1 Definición

La mayor parte de las sustancias químicas potencialmente tóxicas se encuentran en el medio ambiente, donde los seres vivos llevan a cabo sus actividades cotidianas, pudiendo ser el hogar, el lugar de trabajo y aún los sitios de recreo. Entre los efectos adversos que se producen por el manejo de sustancias químicas peligrosas se tienen:

- Contaminación y deterioro de la calidad del agua, aire, suelo y alimentos.
- Intoxicaciones y enfermedades que ocurren en la biosfera.
- Daños a los materiales que entran en contacto con ellas.
- Accidentes que involucran explosiones, incendios, fugas o derrames.

En los últimos 40 años se ha tomado mayor conciencia de las amenazas provocadas a la salud humana y al ambiente representadas por la liberación cada vez mayor de sustancias químicas de origen sintético. La acumulación de evidencias ha hecho que los esfuerzos se concentren en una categoría de sustancias denominadas contaminantes orgánicos persistentes, mejor conocidos en español como COPs (en inglés se denominan POPs: Persistent Organic Pollutants), que son compuestos químicos resistentes a la degradación fotolítica, biológica y química, que actúan como potentes plaguicidas y sirven para una gama de fines industriales. Algunos COPs también son emitidos como productos no intencionales de la combustión y de algunos procesos industriales (Yarto, 2003).

1.1.2 Propiedades

Mientras que el nivel de riesgo varía de un COP a otro, por definición todos tienen las siguientes propiedades (Swackhamer, 2004):

1) Altamente tóxicos.
2) Persistentes, es decir, duran varios años o décadas antes de degradarse a formas menos dañinas.
3) Se evaporan y viajan grandes distancias en el aire y en el agua.
4) Se acumulan en los tejidos grasos de los organismos vivos, incluyendo al ser humano.

Los efectos de estos contaminantes en los ecosistemas son variados y nocivos e incluyen defectos al nacer, cáncer, alteraciones del sistema

inmunológico y problemas reproductivos en diferentes especies. En los humanos, la evidencia sugiere que los efectos son similares a los observados en los animales, es decir, cáncer, problemas de fertilidad, mayor susceptibilidad a enfermedades y alteraciones neurológicas (Yarto, 2003).

1.1.3 Clasificación

La Convención de Estocolmo en 2001 clasificó a los COPs de la siguiente manera:

- Plaguicidas: Mirex, Toxáfeno, Clordano, Heptacloro, DDT, Endrín, Aldrín y Dieldrín.
- Sustancias químicas industriales: Bifenilos policlorados (PCBs) y Hexaclorobenceno (HCB).
- Subproductos no intencionales: Dioxinas y Furanos.

Algunos de estos compuestos son plaguicidas conocidos y se han utilizado ampliamente durante largo tiempo para diversos propósitos; varios se emplean como aditivos o auxiliares en variadas aplicaciones industriales, mientras que las dioxinas y los furanos, son generados como subproductos no intencionales en procesos de combustión, la quema de basura, o en incendios involuntarios (Yarto, 2003).

1.2 Dioxinas

1.2.1 Definición

Las dioxinas son contaminantes ambientales, policlorados, ubicuos, persistentes y lipofílicos. El término dioxinas abarca dos clases de compuestos: las Policlorodibenzo-p-dioxinas (PCDDs) y los Policlorodibenzofuranos (PCDFs); presentan estructuras moleculares muy similares que se caracterizan por la planaridad que confiere la unión de dos anillos bencénicos, a través de dos átomos de oxígeno en el caso de las dioxinas, o de un átomo de oxígeno en el caso de los furanos (Figura 1a) (Baron, 2005; UNEP, 1999).

Dibenzofuranos policlorados (PCDFs) Dibenzo-p-dioxinas policlorados (PCDDs)

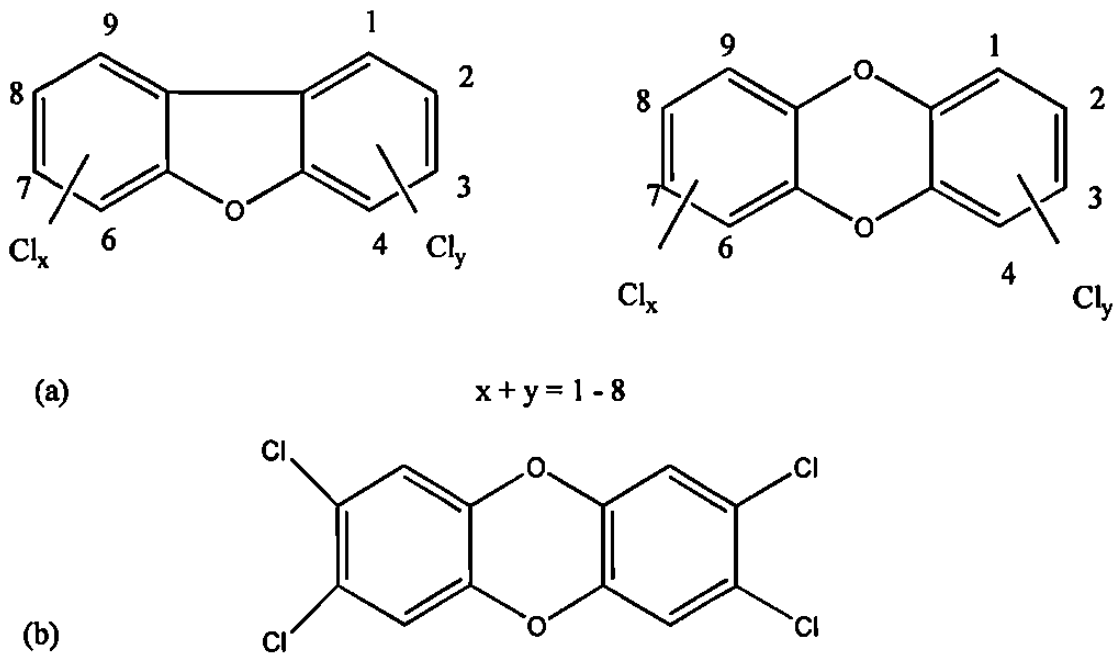

Figura 1. (a) Fórmula general de los PCDFs y las PCDDs.

(b) 2, 3, 7, 8- Tetraclorodibenzo-p-dioxina (2, 3, 7, 8 - TCDD).

Dependiendo del grado de cloración y la posición de los átomos de cloro en los anillos bencénicos se genera un total de 210 compuestos diferentes llamados "congéneres", 135 son PCDFs y 75 son PCDDs.

Los compuestos que se consideran tóxicos son aquellos que se encuentran sustituidos en la posición 2, 3, 7, 8. Solamente 10 congéneres de furanos y 7 congéneres de dioxinas se consideran de riesgo toxicológico. El congénere más tóxico es la 2, 3, 7, 8 - tetraclorodibenzo-*p*-dioxina o TCDD (Figura 1b) (Baron, 2005).

1.2.2 Propiedades físicas y químicas

En general, las dioxinas son compuestos sólidos cristalinos e incoloros que se caracterizan por poseer:

- Elevados puntos de fusión y de ebullición.
- Baja volatilidad.
- Baja solubilidad en agua. Elevada solubilidad en disolventes orgánicos y grasas.
- Elevado índice de partición n-octanol/agua.
- Gran resistencia a la degradación biológica.
- Gran tendencia a ser fuertemente absorbidos sobre la superficie de diferentes matrices.
- Estables frente al calor.
- Químicamente estables en medio ácido y básico.
- Sensibles a la luz UV y a la luz solar.

Las dioxinas son extremadamente resistentes a la degradación química y biológica, persistentes en el medio ambiente y se acumulan en las cadenas alimentarias humana y animal (Abad, 1999).

1.2.3 Fuentes de generación de PCDDs y PCDFs

Las dioxinas no son producidas comercialmente, ni se les conoce ninguna utilidad o aplicación, aunque se forman de manera espontánea en un gran número de procesos industriales, de los cuales los principales son (McKay, 2002):

Procesos de incineración y combustión:

Incineración de basuras y de otros residuos sólidos, tales como medicamentos, restos biológicos y otros elementos peligrosos.

Procesos metalúrgicos, tales como la producción de acero a alta temperatura, recuperación de metales en altos hornos.

Combustión de carbón, madera, productos petrolíferos y neumáticos usados.

Industria química:

Producción de cloro y derivados clorados orgánicos que se pueden emplear como: insecticidas, herbicidas, catalizadores y productos intermedios para la síntesis de otras sustancias.

Producción de papel y depuración de aguas:

El blanqueado del papel mediante el empleo de cloro puede conducir a la formación de dioxinas a partir de los derivados polifenólicos presentes de forma natural en la pulpa de la madera empleada en la producción de pasta

de papel. De igual manera se consideran los lodos empleados en los procesos de depuración de aguas residuales.

Reservorios naturales:

La notable estabilidad química y la intensa lipofilia de las dioxinas facilitan su acumulación en los suelos, sedimentos y en la materia orgánica.

1.2.4 Fuentes de exposición humana

La principal vía de exposición a las dioxinas en los seres humanos es la ingestión de alimentos contaminados, principalmente de origen animal, especialmente carne y productos lácteos. La presencia de dioxinas en estos alimentos, se debe a que el ganado consume forraje vegetal contaminado con estos compuestos, provenientes principalmente de la deposición y transporte atmosférico a grandes distancias desde las fuentes de emisiones atmosférica (Cohen, 1997).

Otra vía de exposición es la que se produce en el feto, lactantes y niños. Durante el desarrollo del feto la exposición a dioxinas puede ser mayor y los efectos más dañinos, las dioxinas pasan de la madre al feto a través de la placenta. En el caso del lactante la exposición es a través de la leche materna (Weisglas, 1998).

Otras vías de exposición importantes en ciertas poblaciones incluyen (ATSDR, 1999):

a) El consumo de pescado contaminado, directamente por las descargas de dioxinas o por el depósito en aguas superficiales a partir de la atmósfera.

b) La inhalación de dioxinas en lugares próximos a las fuentes de emisión atmosférica.

c) Ciertas exposiciones ocupacionales, por ejemplo de trabajadores de las industrias que producen compuestos clorados.

1.2.5 Efectos tóxicos sobre la salud

Los efectos producidos por la exposición a dioxinas son (IARC, 1991):

- Alteraciones cutáneas
  - cloracné
  - hiperpigmentación
  - hirsutismo
  - elastosis
- Cambios metabólicos y hormonales
  - aumento del riesgo de diabetes
  - pérdida de peso
  - cambios en las hormonas tiroideas
- Sistema reproductor masculino
  - disminución del número de espermatozoides
  - atrofia testicular
  - alteraciones en los niveles hormonales

  - feminización
- Sistema reproductor femenino
  - cambios hormonales
  - disminución de la fertilidad
  - abortos
  - endometriosis
- Efectos en fetos
  - alteraciones en el sistema reproductor
  - problemas neurológicos y de desarrollo
- Daño en el sistema nervioso
  - aumento de la irritabilidad
  - disminución del desarrollo intelectual
- Daños hepáticos
- Alteraciones del sistema inmunitario
- Teratogenicidad
- Carcinogenicidad

En 1997 la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC), declaró a la 2, 3, 7, 8 – TCDD como perteneciente al grupo 1 donde se le considera como carcinógeno para humanos (UNEP, 1999).

1.2.6 Niveles de Toxicidad

Cada congénere del grupo de las dioxinas muestra un nivel de toxicidad diferente. La toxicidad de las diferentes mezclas de dioxinas ha sido determinada usando un estándar comparativo conocido como Factor de

Equivalencia Tóxica (TEF, por sus siglas en inglés: Toxic Equivalency Factor), que relaciona la toxicidad de todas las dioxinas a la de la TCDD como referencia, asignándole el valor de 1 a esta última (Tabla I) (Van Der Berg, 1998).

De este modo se ha desarrollado una unidad cuantificable única que facilita la determinación de los riesgos y el control regulatorio sobre la exposición de estas mezclas. Este concepto es conocido como Concentración Equivalente Tóxica (TEQ, del inglés: Toxic Equivalent Concentration), que combina los correspondientes valores TEF para cada uno de los congéneres individuales presentes en la mezcla y su concentración en la misma (Comunidad Europea, 2001).

En 1999 la Agencia Medioambiental y el Ministerio de Salud y Bienestar de Japón recomienda que la Ingestión Diaria Tolerable (IDT) de la dioxina no sea mayor a 4 pg de equivalente tóxico (TEQ), por Kg de peso corporal al día (Hori, 2005).

Tabla I. Factores de Equivalencia Tóxica de los PCDDs/PCDFs.

PCDFs	TEF	PCDDs	TEF
2, 3, 7, 8 – TCDF	0.1	2, 3, 7, 8 – TCDD	1
1, 2, 3, 7, 8 – PeCDF	0.05	1, 2, 3, 7, 8 – PeCDD	0.5
2, 3, 4, 7, 8 – PeCDF	0.5		
1, 2, 3, 4, 7, 8 – HxCDF	0.1	1, 2, 3, 4, 7, 8 – HxCDD	0.1
1, 2, 3, 6, 7, 8 – HxCDF	0.1	1, 2, 3, 6, 7, 8 – HxCDD	0.1
2, 3, 4, 6, 7, 8 - HxCDF	0.1	1, 2, 3, 7, 8, 9 – HxCDD	0.1
1, 2, 3, 7, 8, 9 – HxCDF	0.1		
1, 2, 3, 4, 6, 7, 8 – HpCDF	0.01	1, 2, 3, 4, 7, 8, 9 – HpCDD	0.01
1, 2, 3, 4, 7, 8, 9 – HpCDF	0.01		
OCDF	0.001	OCDD	0.001

Van Der Berg, 1998

1.2.7 Legislación

La Organización Mundial de la Salud (OMS) estimó que el 90% de los casos de exposición humana a las dioxinas se dá a través de la ingesta de alimentos contaminados de origen animal (WHO, 1998).

El Comité Científico de la Alimentación Humana (CCAH), concluyó que la ingesta humana media de dioxinas en los países europeos se estimaba en 1.2 a 3.0 pg/Kg de peso corporal/día.

La tabla II muestra los límites de dioxinas expresados en equivalentes tóxicos de la OMS (TEQ-OMS) en alimentos, utilizando los factores de equivalencia tóxica.

Tanto científicos como diversas organizaciones han señalado que es importante reducir la exposición de los seres humanos a las dioxinas, a través del consumo de alimentos, de modo que quede garantizada la protección de los consumidores. En algunos grupos de alimentos, como las carnes, se ha observado niveles elevados de dioxinas.

Dado que la contaminación de los alimentos para seres humanos está directamente relacionada con la contaminación de los alimentos para animales, se debe adoptar una política preventiva que busque la reducción de la incidencia de las dioxinas a lo largo de la cadena alimentaria, es decir desde las materias primas usadas en la alimentación animal hasta los seres

humanos, pasando por los animales destinados a la producción de alimentos (Comunidad Europea, 2001).

En México se carece de la capacidad de análisis especializada para determinar con seguridad la presencia de dioxinas y furanos en muestras biológicas y ambientales, por lo que no existen datos de la presencia de estos contaminantes en la población, el ambiente o los alimentos y no ha sido posible establecer niveles comparativos con otros países. Sin embargo, el que no haya datos, no quiere decir que los problemas de salud o medio ambiente que puedan ser provocados por dioxinas o compuestos similares no existan.

A nivel Internacional las dioxinas se encuentran en la lista de prioridades de la ONU para su eventual eliminación mundial y son parte de la Agenda del Convenio sobre Contaminantes Orgánicos Persistentes en la Convención de Estocolmo, 2001.

Tabla II. Contenidos máximos de dioxinas y furanos en alimentos.

Productos	Contenidos máximos (PCDDs + PCDFs) (pg TEQ-OMS PCDD/PCDF /g de grasa o producto)
Carne y productos a base de carne procedentes de	
Rumiantes (bovinos y ovinos)	3 pg TEQ-OMS PCDD/F /g grasa
Aves de corral y caza de cría	2 pg TEQ-OMS PCDD/F /g grasa
Cerdos	1 pg TEQ-OMS PCDD/F /g grasa
Hígado y productos derivados	6 pg TEQ-OMS PCDD/F /g grasa
Carne de pescado y productos de la pesca y derivados	4 pg TEQ-OMS PCDD/F /g peso en fresco
Leche y productos lácteos, incluida la grasa láctea	3 pg TEQ-OMS PCDD/F /g grasa
Huevo de gallina y ovoproductos	3 pg TEQ-OMS PCDD/F /g grasa
Aceites y grasas	
Grasas animales:	
De rumiantes	3 pg TEQ-OMS PCDD/F /g grasa
De aves de coral y caza de cría	2 pg TEQ-OMS PCDD/F /g grasa
De cerdos	1 pg TEQ-OMS PCDD/F /g grasa
Grasas animales mezcladas	2 pg TEQ-OMS PCDD/F /g grasa
Aceites vegetales	0.75 pg TEQ-OMS PCDD/F /g grasa
Aceite de pescado destinado al consumo humano	2 pg TEQ-OMS PCDD/F /g grasa

Comunidad Europea, 2001

1.3 Carne

1.3.1 Definición

El término carne se aplica a las partes comestibles de mamíferos domésticos como el ganado vacuno, ovino, caprino, porcino y diversas especies de aves de corral y de caza (Kirk, 2002). Las definiciones de carne difieren entre sí dependiendo del objetivo de las mismas. Así por ejemplo, desde el punto de vista legal, el concepto de carne incluye todas las partes de los animales de sangre caliente utilizadas por el hombre para su alimentación, mientras que en el lenguaje utilizado normalmente carne es solamente el tejido muscular esquelético acompañado de más o menos grasa (Belitz, 1992).

Desde el punto de vista estructural, la carne está formada por fibra muscular estriada, acompañada o no de tejido conjuntivo elástico, grasa, fibras nerviosas, vasos linfáticos y sanguíneos de las especies animales autorizadas para consumo humano, que no han sido sometidas a ningún proceso que modifique de modo irreversible sus características organolépticas y fisicoquímicas (NOM-158-SCFI-2003).

La carne es un alimento nutritivo que contiene gran cantidad de aminoácidos esenciales en forma de proteínas. La carne contiene también grasa, vitaminas del grupo B (en especial niacina y riboflavina), hierro,

fósforo y calcio. Ciertas carnes, especialmente el hígado, contienen vitaminas A y D (Tabla III).

Tabla III. Análisis químico aproximado de la mayoría de las carnes.

Componentes	%
Agua	70
Proteínas	20
Grasa	6
Sustancias nitrogenadas no proteínicas	1.5
Hidratos de carbono y sustancias no nitrogenadas	1.5
Sales inorgánicas	0.7

Badui, 1999

1.4 Métodos para la determinación de dioxinas

Debido a la alta toxicidad y actividad biológica de los PCDDs y PCDFs se requieren métodos analíticos con alta sensibilidad, selectividad y especificidad para la determinación en muestras ambientales y biológicas.

La Cromatografía de Gases de Alta Resolución acoplada a un detector de Espectrometría de Masas de Alta Resolución (HRGC/HRMS) permite la determinación específica de varios congéneres con una detección a niveles de ng/Kg (IARC, 1991).

Las etapas fundamentales consideradas en la metodología analítica para la determinación de dioxinas son:

1) Toma de muestra.

2) Extracción.

3) Purificación y fraccionamiento.

4) Separación y detección por HRGC/HRMS.

La determinación de dioxinas se basa en el método USEPA 1613.

1.4.1 Toma de muestras

Las muestras destinadas al análisis de dioxinas, se toman de acuerdo al tipo de matriz, ya sea sólida o líquida (Abad, 1999). El diario oficial de la Comunidad Europea, indica que el peso de una muestra de carne debe ser entre 100 a 1000 gramos, y depende del tamaño de las partículas del lote. Cada muestra debe triturarse finamente y mezclarse minuciosamente utilizando un procedimiento que garantice una homogenización completa.

1.4.2 Extracción

El método de extracción aplicado para el análisis de dioxinas depende también del tipo de muestra. La extracción de dioxinas se realiza en 2 etapas: en el caso de muestras sólidas como la carne, primero se extrae la grasa y después las dioxinas. Para la extracción de grasa de la carne se emplea el método Soxhlet. La muestra debe ser secada, antes de someterse

a la extracción Soxhlet, para esto se emplea la liofilización, y la extracción se realiza de 18 a 24 horas usando diclorometano:hexano (1:1) en el extractor Soxhlet, según el método USEPA 1613.

Para la extracción de dioxinas, a la grasa obtenida se le realiza un ataque con ácido sulfúrico concentrado.

1.4.3 Purificación y Fraccionamiento

La purificación y fraccionamiento de los extractos se lleva a cabo para remover materiales coextraídos, que podrían interferir en el análisis final. Para este propósito, se utilizan columnas tipo sándwich o columnas en serie que pueden contener sílica gel, florisil, alúmina o adsorbentes químicamente modificados como sílica gel con H_2SO_4, NaOH o $AgNO_3$. La tabla IV muestra las fases estacionarias utilizadas y la clase de compuestos que se remueven en cada fase (IARC, 1991).

Tabla IV. Fases estacionarias utilizadas y la clase de compuestos que remueven en cada fase.

Fase estacionaria	Impurezas removidas	Literatura
Sílica gel (SiO_2)	Impurezas polares, lípidos.	Smith (1984)
SiO_2/ H_2SO_4	PAH (2 a 4 anillos), lípidos, compuestos que pueden ser oxidados o sulfonados.	Lamparski/Nestrick (1980, 1989)
SiO_2/NaOH	Ácidos fenólicos y carboxílicos, sulfonamidas, PCBs hidroxilados y PCDPEs hidroxilados.	Lamparski/Nestrick (1980, 1989)

(Continúa)

Fase estacionaria	Impurezas removidas	Literatura
SiO_2/ $AgNO_3$	Compuestos que contienen azufre.	Lamparski (1979) Lamparski/Nestrick (1989)
Florisil (SiO_2 – MgO)	PAH, PCBs, PCN, PCDE, PCSt, DDE.	Harless (1980) Ballschmiter (1986)
Alúmina básica	PCBs, PCDPEs, PCN, lípidos y fenoles. Separación de la fracción de PCDDs/PCDFs de PCBs.	Busser (1975)

1.4.4 Separación y detección

El método oficial para la determinación de dioxinas es la cromatografía de gases acoplada a un detector de espectrometría de masas (GC/MS) y los métodos de confirmación son métodos de cromatografía de gases de alta resolución acoplada a un detector de espectrometría de masas de alta resolución (HRGC/HRMS).

Se recomienda que se debe realizar de acuerdo al método USEPA 1613, revisión B: Dioxinas y furanos tetra a octaclorados por dilución de isótopos con HRGC/HRMS u otro método con criterios de realización equivalentes.

La tabla V presenta los métodos empleados por varios laboratorios para la determinación de dioxinas en donde se muestra que en todos se llevan a cabo las etapas de extracción, purificación y fraccionamiento y análisis.

Como se mencionó anteriormente, en México no existe una metodología adecuada para la determinación y cuantificación de Dioxinas en alimentos, como es la carne, que es un alimento que representa una importante fuente de contaminación. En este trabajo nos enfocaremos en la etapa de extracción y en la etapa de purificación y fraccionamiento.

Tabla V. Métodos analíticos para la determinación de dioxinas en carne.

Autor	Extracción	Purificación	Análisis
E. Petroske (1998)	Aparato Soxhlet con diclorometano:hexano (1:1). Extracción con H_2SO_4.	Sistema automatizado Fluid Management Systems (FMS) SiO_2, SiO_2/ H_2SO_4, SiO_2/NaOH, Alúmina básica y Carbón activado.	HRGC/HRMS
Kumar (2001)	Aparato Soxhlet con diclorometano. Extracción con H_2SO_4.	SiO_2, Alúmina, SiO_2 impregnada y Carbón activado.	HRGC/HRMS
Janice K. Huwe (2002)	40 mL de H_2SO_4 y 2.2 L de solvente orgánico.	SiO_2, SiO_2/ H_2SO_4, SiO_2/NaOH, Alúmina básica y Carbón activado.	HRGC/HRMS
Janice K. Huwe y Gerald L. Larsen (2005)	Extractor automatizado usando 2-propanol/ hexano/ diclorometano (35:30:35) a 125 °C y 1500psi.	Sistema automatizado (FMS) Sílica trifásica, Sílica trifásica regular, Alúmina básica, Carbón activado y Celite.	HRGC/HRMS

1.5 Justificación

A nivel internacional existe un gran interés en la determinación de dioxinas tanto en alimentos como en el medio ambiente, debido al alto riesgo por exposición a estos tóxicos cancerígenos.

México no cuenta con un método oficial para el control de dioxinas en carnes.

Por estas razones consideramos necesario establecer un método de extracción de dioxinas en carnes, que nos permita la determinación de estos analitos en dicho alimento.

1.6 Objetivos

1.6.1 Objetivo General

Implementar y Validar un método de extracción para la determinación de dioxinas en carnes.

1.6.2 Objetivos Específicos

1. Establecer un método para la extracción de dioxinas en carnes.
2. Validar el método de extracción para la determinación de dioxinas en carnes.
3. Aplicar el método validado en muestras de carne.

CAPÍTULO 2

MATERIAL Y MÉTODOS

2.1 Equipo, material y reactivos

2.1.1 Equipo

a) Cromatógrafo de Gases 6890N con un Detector Selectivo de Masas 5973 INERT Agilent Technologies, fuente de ionización impacto de electrones y analizador de cuadrupolo.

b) Cabina de Seguridad Biológica clase II tipo B2 ESCO modelo EQU/04 EBC-2B2.

c) Liofilizadora Labconco Freeze Dry system/freezone 4.5 modelo 77500.

d) Extractor Soxhlet de 200 mL, 50 mm ID.

e) Balanza analítica AND GR-202.

f) Balanza semianalítica AND GX-200.

g) Baño de ultrasonido ULTRASonik modelo 208H.

h) Bomba de vacío GAST modelo 1HAB – 26 M100X.

i) Congelador MYTAG modelo CFU2046ARM.

j) Estufa bacteriológica She – Lab.

k) Mini – evaporadores Supelco.

l) Rotaevaporador YAMATO modelo RE 200 con baño de agua YAMATO modelo BM 200.

m) Vortex GENIE 2 Scientific Industries modelo G560.

2.1.2 Materiales

a) Columna capilar HP-5ms, 60 m x 0.25 mm ID x 0.25 μm (5% fenil, 95% dimetilpolisiloxano).

b) Viales de vidrio de 12 x 32 mm de 1.5 mL con tapón de rosca transparente y septum de PTFE/silicón Chromacol.

c) Agitadores de vidrio.

d) Aros para soporte.

e) Columnas de vidrio de 200 mm x 15 mm.

f) Columnas de vidrio de 200 mm x 10 mm.

g) Dedal de vidrio de fondo poroso.

h) Desecador.

i) Embudos de separación de 1000 mL.

j) Espátulas.

k) Jeringas de vidrio para Cromatografía de Gases de 10μL, HAMILTON 701N.

l) Matraces bola de 50, 100, 250 y 500 mL.

m) Matraces erlenmeyer de 25, 50, 125 y 250 mL.

n) Matraz de aforación de 100 mL.

o) Pinzas para soporte.

p) Pipeta volumétrica de 2 mL.

q) Pipetas pasteur, Fisher Scientific.

r) Probetas de 50, 100 y 400 mL.

s) Soportes universales.

t) Termómetro de -20 °C a 110 °C.

u) Vasos de precipitado de 50, 600 y 1000 mL.

v) Vasos para liofilizadora de 900 mL.

2.1.3 Reactivos

a) Estándares EPA - 1613CS (Soluciones de Calibración y Verificación) que son mezclas de los 17 congéneres nativos y los correspondientes marcados isotópicamente con $^{13}C_{12}$ en concentraciones que van desde 0.5 hasta 200 ng/mL.

b) Estándar EPA – 1613LCS (Solución Stock de Compuestos Marcados Isotópicamente con $^{13}C_{12}$) que contiene concentraciones de 100 a 200 ng/mL.

c) Estándar EPA - 1613ISS (Solución Estándar Interno) que contiene $^{13}C_{12}$-1, 2, 3, 4, – TCDD y el $^{13}C_{12}$-1, 2, 3, 7, 8, 9 – HxCDD en concentraciones de 200 ng/mL.

d) Estándar EPA - 1613PAR (Solución Stock de Recuperación y Precisión), contiene la mezcla de los 17 congéneres nativos en concentraciones de 40 a 400 ng/mL.

e) Alúmina básica super I para análisis de dioxinas, Sorbent Technologies.

f) Florisil para Cromatografía de Gases, EMD.

g) Hidróxido de sodio grado ACS, J. T. Baker.

h) Nitrato de plata grado ACS, J. T. Baker.

i) Sílica gel 60 tamaño de partícula 0.063 – 0.2mm, Merck.

j) Sulfato de sodio anhidro grado ACS, J. T. Baker.

2.1.4 Solventes

a) Ácido sulfúrico 95 – 97% grado pro análisis, MERCK.

b) Agua Bidestilada Plus, Laboratorios Monterrey S.A. de C.V.

c) Acetona para Cromatografía de Gases, MERCK.

d) Ciclohexano grado análisis de residuos, FLUKA.

e) Diclorometano grado biosíntesis, EM SCIENCE.

f) Éter etílico grado ACS, EMD.

g) Hexano para Cromatografía de Gases, MERCK.

h) Nonano para Cromatografía de Gases, FLUKA.

i) Tolueno para Cromatografía de Gases, MERCK.

j) Acetona grado ACS, Jalmek.

k) Diclorometano grado HPLC/SPECTRO, M TEDIA.

2.2 Soluciones estándares EPA 1613

Estándares EPA – 1613CS

Para construir la curva de calibración, se emplearon los Estándares de Calibración y Verificación EPA – 1613CS, con 5 niveles de concentración en ng/mL. La tabla VI muestra los rangos de concentración para los 17 congéneres de PCDDs/PCDFs.

Preparación del estándar EPA – 1613LCS

Este estándar se empleó como estándar subrogado. De la mezcla de 1613LCS se tomaron 5 μL y se diluyeron en 1 mL de acetona en un matraz erlenmeyer de 25 mL, luego se distribuyó homogéneamente en la muestra en concentraciones de 100 y 200 ng/mL (Tabla VII).

Estándar EPA - 1613ISS

Es el estándar interno que se empleó para la cuantificación. Es una mezcla que contiene el $^{13}C_{12}$ - 1, 2, 3, 4 – TCDD y el $^{13}C_{12}$ - 1, 2, 3, 7, 8, 9 – HxCDD en concentraciones de 200 ng/mL. Se midieron 5 μL y se adicionaron al extracto de la muestra obtenida al final del proceso (Tabla VII).

Preparación del Estándar EPA - 1613PAR

Este estándar se empleó para determinar el porcentaje de recuperación. De la mezcla que contiene los 17 congéneres nativos en concentraciones de 40 a 400 ng/mL, se tomaron 5 μL, se diluyeron en 1 mL de acetona en un

matraz erlenmeyer de 25 mL y se distribuyeron homogéneamente en la muestra durante el proceso de extracción de la grasa (Tabla VII).

Tabla VI. Concentración de las mezclas de los estándares EPA – 1613CS de PCDDs/PCDFs.

PCDDs/PCDFs NATIVOS	1613CS1 (ng/mL)	1613CS2 (ng/mL)	1613CS3 (ng/mL)	1613CS4 (ng/mL)	1613CS5 (ng/mL)
2,3,7,8 – TCDD	0.5	2	10	40	200
2,3,7,8 – TCDF	0.5	2	10	40	200
1,2,3,7,8 – PeCDD	2.5	10	50	200	1000
1,2,3,7,8 – PeCDF	2.5	10	50	200	1000
2,3,4,7,8 – PeCDF	2.5	10	50	200	1000
1,2,3,4,7,8 – HxCDD	2.5	10	50	200	1000
1,2,3,6,7,8 – HxCDD	2.5	10	50	200	1000
1,2,3,7,8,9 – HxCDD	2.5	10	50	200	1000
1,2,3,4,7,8 – HxCDF	2.5	10	50	200	1000
1,2,3,6,7,8 – HxCDF	2.5	10	50	200	1000
1,2,3,7,8,9 – HxCDF	2.5	10	50	200	1000
2,3,4,6,7,8 – HxCDF	2.5	10	50	200	1000
1,2,3,4,6,7,8 – HpCDD	2.5	10	50	200	1000
1,2,3,4,6,7,8 – HpCDF	2.5	10	50	200	1000
1,2,3,4,7,8,9 – HpCDF	2.5	10	50	200	1000
OCDD	5.0	20	100	400	2000
OCDF	5.0	20	100	400	2000
PCDDs/PCDFs MARCADOS					
$^{13}C_{12}$ - 2,3,7,8 – TCDD	100	100	100	100	100
$^{13}C_{12}$ - 2,3,7,8 – TCDF	100	100	100	100	100
$^{13}C_{12}$ - 1,2,3,7,8 – PeCDD	100	100	100	100	100

(Continúa)

PCDDs/PCDFs MARCADOS	1613CS1 (ng/mL)	1613CS2 (ng/mL)	1613CS3 (ng/mL)	1613CS4 (ng/mL)	1613CS5 (ng/mL)
$^{13}C_{12}$ - 1,2,3,7,8 – PeCDF	100	100	100	100	100
$^{13}C_{12}$ - 2,3,4,7,8 – PeCDF	100	100	100	100	100
$^{13}C_{12}$ - 1,2,3,4,7,8 – HxCDD	100	100	100	100	100
$^{13}C_{12}$ - 1,2,3,6,7,8 – HxCDD	100	100	100	100	100
$^{13}C_{12}$ - 1,2,3,4,7,8 – HxCDF	100	100	100	100	100
$^{13}C_{12}$ - 1,2,3,6,7,8 – HxCDF	100	100	100	100	100
$^{13}C_{12}$ - 1,2,3,7,8,9 – HxCDF	100	100	100	100	100
$^{13}C_{12}$ - 1,2,3,4,6,7,8 – HpCDD	100	100	100	100	100
$^{13}C_{12}$ - 1,2,3,4,6,7,8 – HpCDF	100	100	100	100	100
$^{13}C_{12}$ - 1,2,3,4,7,8,9 – HpCDF	100	100	100	100	100
$^{13}C_{12}$ - OCDD	200	200	200	200	200
ESTÁNDAR DE LIMPIEZA CLEANUP STANDARD					
$^{37}C_4$ – 2,3,7,8 – TCDD	0.5	2	10	40	200
ESTÁNDAR INTERNO					
$^{13}C_{12}$ - 1,2,3,4 – TCDD	100	100	100	100	100
$^{13}C_{12}$ - 1,2,3,7,8,9 – HxCDD	100	100	100	100	100

Tabla VII. Composición de las mezclas de estándares indicados por el método USEPA 1613.

PCDDs/PCDFs	1613LCS (ng/mL)	1613ISS (ng/mL)	1613PAR (ng/mL)
2,3,7,8 – TCDD	—	—	40
2,3,7,8 – TCDF	—	—	40
1,2,3,7,8 – PeCDD	—	—	200
1,2,3,7,8 – PeCDF	—	—	200
2,3,4,7,8 – PeCDF	—	—	200
1,2,3,4,7,8 – HxCDD	—	—	200
1,2,3,6,7,8 – HxCDD	—	—	200
1,2,3,7,8,9 – HxCDD	—	—	200
1,2,3,4,7,8 – HxCDF	—	—	200
1,2,3,6,7,8 – HxCDF	—	—	200
1,2,3,7,8,9 – HxCDF	—	—	200
2,3,4,6,7,8 – HxCDF	—	—	200
1,2,3,4,6,7,8 – HpCDD	—	—	200
1,2,3,4,6,7,8 – HpCDF	—	—	200
1,2,3,4,7,8,9 – HpCDF	—	—	200
OCDD	—	—	400
OCDF	—	—	400
$^{13}C_{12}$ - 2,3,7,8 – TCDD	100	—	—
$^{13}C_{12}$ - 2,3,7,8 – TCDF	100	—	—
$^{13}C_{12}$ - 1,2,3,7,8 – PeCDD	100	—	—
$^{13}C_{12}$ - 1,2,3,7,8 – PeCDF	100	—	—
$^{13}C_{12}$ - 2,3,4,7,8 – PeCDF	100	—	—
$^{13}C_{12}$ - 1,2,3,4,7,8 – HxCDD	100	—	—
$^{13}C_{12}$ - 1,2,3,6,7,8 – HxCDD	100	—	—
$^{13}C_{12}$ - 1,2,3,4,7,8 – HxCDF	100	—	—

(Continúa)

PCDDs/PCDFs	1613LCS (ng/mL)	1613ISS (ng/mL)	1613PAR (ng/mL)
$^{13}C_{12}$ - 1,2,3,6,7,8 – HxCDF	100	—	—
$^{13}C_{12}$ - 1,2,3,7,8,9 – HxCDF	100	—	—
$^{13}C_{12}$ - 2,3,4,7,8,9 – HxCDF	100	—	—
$^{13}C_{12}$ - 1,2,3,4,6,7,8 – HpCDD	100	—	—
$^{13}C_{12}$ - 1,2,3,4,6,7,8 – HpCDF	100	—	—
$^{13}C_{12}$ - 1,2,3,4,7,8,9 – HpCDF	100	—	—
$^{13}C_{12}$ – OCDD	200	—	—
$^{13}C_{12}$ – 1,2,3,4 – TCDD	—	200	—
$^{13}C_{12}$ - 1,2,3,7,8,9 – HxCDD	—	200	—

2.3 Establecimiento de las condiciones de análisis de PCDDs/PCDFs por GC/LRMS

Se ha trabajado en un cromatógrafo de gases acoplado a un espectrómetro de masas de baja resolución (GC/LRMS). Para el establecimiento de las diferentes condiciones de análisis cromatográfico, se trabajó con las mezclas de los estándares EPA – 1613CS de PCDDs/PCDFs de 0.5 a 200 ng/mL.

Las condiciones iniciales de operación fueron:

CROMATÓGRAFO DE GASES

- Detector Selectivo de Masas 5973 INERT Agilent Technologies, fuente de ionización impacto de electrones y analizador de cuadrupolo.
- Columna Capilar HP-5ms, 60 m x 0.25 mm ID x 0.25 μm (5% fenil, 95% dimetilpolisiloxano).

INYECTOR

- Temperatura del inyector: 250 °C.
- Gas acarreador: Helio 99.999% pureza.
- Modo: Splitless.
- Volumen de inyección: 1 μL.

HORNO

- Programa de temperatura de la columna:

  Inicial 150 °C por 5 min.

  Rampa 1: 25 °C/min hasta 200 °C.

  Rampa 2: 3 °C/min hasta 270 °C.
- Tiempo de corrida: 69.13 min.
- Velocidad de flujo: 1 mL/min.

DETECTOR DE MASAS

- Temperatura de la fuente de ionización: 200 °C.

- Intervalo de masas: 304 – 472 m/z.
- Temperatura de la interfase: 270 °C.
- Temperatura del cuadrupolo: 120 °C.
- Modo de adquisición de datos: SIM.
- Solvent delay: 9 min.

A las condiciones iniciales de operación del GC/LRMS se le realizaron las siguientes modificaciones: cambios en la temperatura del inyector, el volumen de inyección, velocidad de flujo y en el programa de temperatura del horno, de modo que las condiciones de operación finales para GC/LRMS fueron las siguientes:

INYECTOR

- Temperatura del inyector: 300 °C.
- Gas acarreador: Helio 99.999% pureza.
- Modo: Splitless.
- Volumen de inyección: 2 μL.

HORNO

- Programa de temperatura de la columna:

  Inicial 180 °C por 1 min.

  Rampa 1: 25 °C/min hasta 200 °C.

  Rampa 2: 3 °C/min hasta 270 °C por 44 min.
- Tiempo de corrida: 79.13 min.
- Velocidad de flujo: 3.4 mL/minuto.

DETECTOR DE MASAS

- Temperatura de la fuente de ionización: 200 °C.
- Intervalo de masas: 304 – 472 m/z
- Temperatura de la interfase: 270 °C.
- Temperatura del cuadrupolo: 120 °C.
- Modo de adquisición de datos: SIM.
- Solvent delay: 9 min.

2.4 Validación del sistema cromatográfico

Una vez establecidas las condiciones de trabajo, se validó el sistema cromatográfico con los criterios recomendados por el método USEPA 1613. Los criterios de validación son los siguientes:

1. Ventanas de tiempo de retención.
2. Valle de isómeros específicos.
3. Nivel mínimo cuantificable.
4. Relación de abundancia de iones isotópicos.
5. Linearidad.

2.4.1 Ventanas de tiempo de retención

Para realizar el análisis de PCDDs/PCDFs se obtuvo un cromatograma en modo SCAN para poder definir los tiempos de retención de los

congéneres y así construir las ventanas cromatográficas. Una vez hecho esto, se obtuvo el cromatograma en modo selectivo de iones (SIM).

2.4.2 Valle de isómeros específicos

Es la relación, multiplicada por 100, entre la altura del valle (x) que forman isómeros que eluyen consecutivamente y la altura del pico (y) del congénere sustituido en la posición 2,3,7,8. El método USEPA 1613 recomienda que debe ser menor del 25%.

Valle de isómeros específicos = $\frac{(x)}{y} * 100$ (ecuación 1)

2.4.3 Nivel mínimo cuantificable

Es la relación Señal/Ruido (S/N) de la concentración más baja de la mezcla de los estándares de calibración y verificación, la que debe ser superior a 10 para ser aceptada.

2.4.4 Relación de abundancia de iones isotópicos

Es la relación que presentan dos de los iones moleculares: ion primario (M), ion secundario (M+2) ó (M+4) de los nativos y sus correspondientes marcados isotópicamente con $^{13}C_{12}$.

En el caso de los congéneres tetraclorados la relación de abundancias de iones isotópicos se obtuvo a partir de la abundancia de su ion primario (M) respecto a la abundancia del ion secundario M+2. Para los demás congéneres se determinó a partir de la abundancia de M+2 respecto a la abundancia de M+4. La tabla VIII muestra las relaciones de abundancias aceptadas por el método USEPA 1613.

Tabla VIII. Masas exactas y las relaciones de abundancias de iones isotópicos teóricos (método USEPA 1613).

Congénere	M_1	M_2	M_1 / M_2	Relación de abundancia
TCDF	304	306	M / (M+2)	0.65 – 0.89
$^{13}C_{12}$ – TCDF	316	318		
TCDD	320	322		
$^{13}C_{12}$ – TCDD	332	334		
PeCDF	340	342	(M+2) / (M+4)	1.32 – 1,78
$^{13}C_{12}$ – PeCDF	352	354		
PeCDD	356	358		
$^{13}C_{12}$ – PeCDD	368	370		
HxCDF	374	376	(M+2) / (M+4)	1.05 – 1.43
$^{13}C_{12}$ – HxCDF	384	386	M / (M+2)	0.43 – 0.59
HxCDD	390	392	(M+2) / (M+4)	1.05 – 1.43
$^{13}C_{12}$ – HxCDD	402	404	(M+2) / (M+4)	1.05 – 1.43
HpCDF	408	410	(M+2) / (M+4)	0.88 – 1.20
$^{13}C_{12}$ – HpCDF	418	420	M / (M+2)	0.37 – 0.51
HpCDD	424	426	(M+2) / (M+4)	0.88 – 1.20
$^{13}C_{12}$ – HpCDD	436	438	(M+2) / (M+4	0.88 – 1.20
OCDF	442	444	(M+2) / (M+4)	0.76 – 1.02
OCDD	458	460		
$^{13}C_{12}$ – OCDD	470	472		

2.4.5 Linearidad

Para evaluar la linearidad se analizaron los cinco niveles de concentración por triplicado en el GC/LRMS. Una vez obtenidas las respuestas del detector que corresponden a las áreas de los iones primario y secundario y los correspondientes marcados isotópicamente con $^{13}C_{12}$ (Tabla VII), se calcularon las respuestas relativas mediante la ecuación 2.

$$RR = \frac{(A1n + A2n)Cl}{(A1l + A2l)Cn} \qquad \text{(ecuación 2)}$$

Donde:

$A1n + A2n$ = Suma de las áreas de los iones primario y secundario de los PCDDs/PCDFs nativos.

$A1l + A2l$ = Suma de las áreas de los iones primario y secundario de los PCDDs/PCDFs marcados isotópicamente con $^{13}C_{12}$.

Cl = Concentración de los compuestos marcados isotópicamente con $^{13}C_{12}$.

Cn = Concentración de los compuestos nativos.

RR = Respuesta relativa.

Con las respuestas relativas obtenidas, se calculó el coeficiente de variación según la ecuación 3.

$$CV = (SD * 100)/x \qquad \text{(ecuación 3)}$$

Donde:

CV = Porciento del coeficiente de variación.

SD = Desviación estándar de las respuestas relativas.

$\bar{x}$ = Promedio de las respuestas relativas.

Para establecer la linearidad se determinó el coeficiente de variación (CV) de las respuestas relativas. El criterio de aceptación establece que el CV debe ser menor del 20%.

2.5 Implementación de un método de extracción de los PCDDs/PCDFs para las muestras de carne

Se implementó el método USEPA 1613 con modificaciones realizadas por el Laboratorio de Dioxinas del Instituto de Investigaciones Químicas y Ambientales del Centro Superior de Investigaciones Científicas en Barcelona, España (IIQAB-CSIC).

El desarrollo del proceso de extracción de los PCDDs/PCDFs se realizó en cuatro etapas:

1. Toma de la muestra.
2. Extracción de dioxinas.
3. Purificación y fraccionamiento.
4. Separación y detección de los congéneres de interés por GC/LRMS.

2.5.1 Toma de muestras

Las muestras de carne de res fueron proporcionadas por el Centro de Investigación Regional del Noreste de la Sociedad Ganadera.

Las muestras se congelaron antes de ser liofilizadas con la finalidad de eliminar totalmente el agua, este proceso duró de 4 a 7 días.

Una vez obtenida la muestra liofilizada se procedió a la extracción de la grasa, éste se realizó por el método Soxhlet, con 400mL de tolueno:ciclohexano (1:1), durante 24 horas. En este paso se adicionó el estándar EPA 1613LCS marcado isotópicamente con $^{13}C_{12}$ (estándar subrogado). Luego se procedió a evaporar el solvente por medio de presión reducida y el extracto graso se dejó en la estufa a 105 °C por 12 horas.

2.5.2 Extracción de dioxinas

La muestra de grasa se transfirió a un embudo de separación de 1000 mL, con ayuda de 30 mL de hexano y después se realizaron lavados del matraz, hasta obtener un volumen final de 100 mL. Posteriormente, se agregó 50 mL de ácido sulfúrico concentrado, se agitó suavemente por un minuto y se dejó reposar durante 24 horas para la separación de las dos fases. Este proceso se repitió hasta obtener una fase acuosa de color pardo claro. El extracto orgánico se recolectó en un matraz bola de 500 mL, se le agregó sulfato de sodio anhidro para eliminar el agua y después se evaporó

el solvente por medio de evaporación a presión reducida hasta obtener un volumen de 3 mL.

2.5.3 Purificación y fraccionamiento

La etapa de purificación y fraccionamiento del extracto, se realizó con adsorbentes de diversa naturaleza: sílica gel, florisil y alúmina.

2.5.3.1 Preparación de los adsorbentes para la etapa de purificación y fraccionamiento de los PCDDs/PCDFs

a) Preparación del adsorbente sílica gel

- Preparación de la sílica gel neutra

La sílica gel se lavó en un vaso de precipitado con 3 porciones de 15 mL de diclorometano, sonicándose por 5 minutos en cada lavado, se decantó y se dejó secar a temperatura ambiente durante 24 horas.

- Preparación de la sílica gel ácida

En un matraz erlenmeyer con tapa se pesaron 39.2 g de sílica gel neutra y se agregaron 30.8 g de ácido sulfúrico concentrado, se agitó constantemente hasta obtener una mezcla homogénea.

- Preparación de la sílica gel básica

En un matraz erlenmeyer con tapa se pesó 26.5 g de sílica gel neutra y se agregó 13.2 g de hidróxido de sodio 1 Molar, se agitó constantemente hasta que la mezcla resultó homogénea.

- Preparación de sílica gel con nitrato de plata

En un matraz erlenmeyer con tapa se pesó 9 g de sílica gel neutra y se le agregó 1 g de nitrato de plata disuelto en 3.84 g de agua destilada, después se agitó constantemente hasta que la mezcla resultó homogénea.

b) Preparación del adsorbente florisil

En un vaso de precipitado se pesaron 5 g y se activó en una mufla a 600 °C durante 8 horas.

c) Preparación del adsorbente alúmina

En un vaso de precipitado se pesaron 6 g y se activó en la mufla a 300 °C durante 8 horas.

2.5.3.2 Columna de sílica gel modificada

Para esta columna, se empleó una columna de vidrio de 200 mm de longitud, con un diámetro interno de 15 mm. La columna de sílica gel modificada está formada por una primera fracción de 2 g de sílica gel tratada

con $AgNO_3$, seguida de una capa de 5 g de sílica gel modificada con NaOH y por último una capa de 10 g de sílica gel modificada con ácido sulfúrico, separadas todas ellas entre sí por 0.5 g de sílica gel neutra. Por último, en la cabeza de columna se dispuso 2 g de Na_2S0_4 anhidro, que sirve para eliminar la posible humedad presente en el extracto (Figura 2).

Una vez preparada la columna de sílica gel modificada se unió a la columna de florisil y se realizó una elución previa con 50 mL de hexano que, aparte de acondicionar la columna, ayuda a obtener una buena compactación. Luego se introdujo el extracto y se eluyó con 250 mL de hexano.

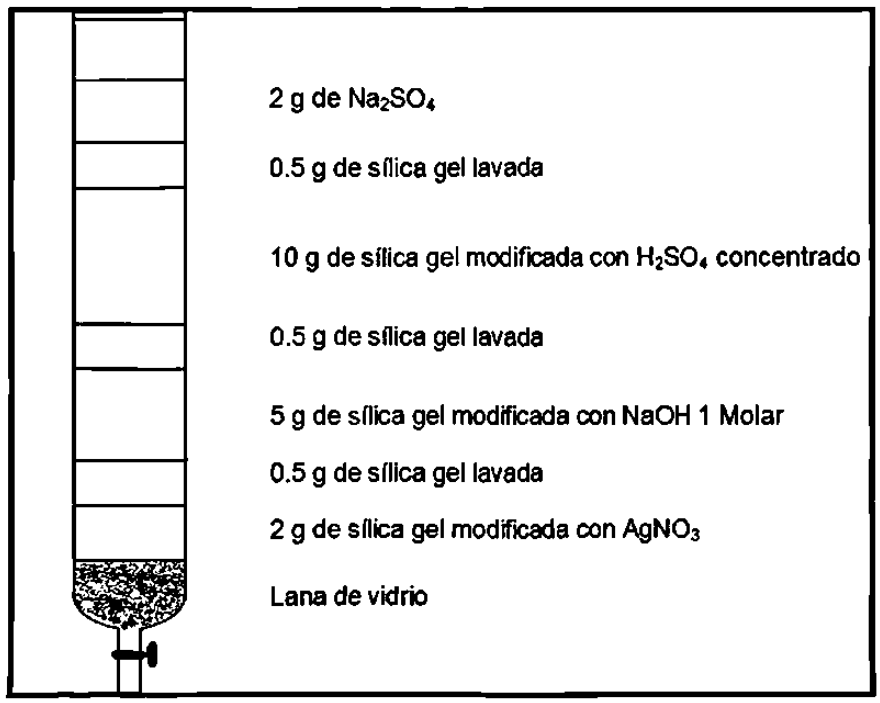

Figura 2. Columna de sílica gel modificada.

2.5.3.3 Columna de florisil

Se empleó una columna de vidrio de 200 mm con un diámetro interno de 10mm, se introdujeron 5 g de florisil seguidos de 1g de Na_2S0_4 anhidro (Figura 3).

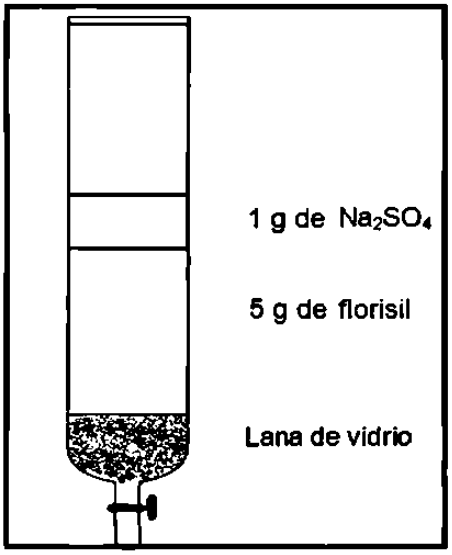

Figura 3. Columna de florisil.

La primera fracción de la elución con 250 mL de hexano se descartó y se retiró la columna de sílica gel modificada. Después la columna de florisil se eluyó con una mezcla de tolueno:éter etílico (90:10) para recuperar las dioxinas. Esta fracción, que fue recolectada, se concentró por medio de evaporación a presión reducida hasta obtener un volumen de 1 a 3 mL, luego se añadió 100 mL de hexano y se volvió a concentrar hasta un volumen de 3 a 5 mL. Este proceso se realizó con el fin de evitar que el tolueno presente en el extracto no pudiera provocar variaciones importantes en la elución, por lo que fue necesario eliminarlo al máximo.

2.5.3.4 Columna de alúmina

Está columna es también una columna de vidrio de 200 mm con un diámetro interno de 10mm, donde se introdujo 6 g de alúmina seguidos de 3 g de Na_2SO_4 anhidro (Figura 4).

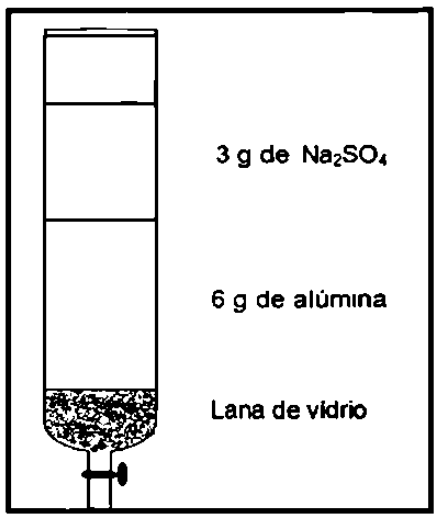

Figura 4. Columna de alúmina.

La columna de alúmina se eluyó con 50 mL de hexano, luego se introdujo el extracto y eluyó con 25 mL de hexano, después se efectúo una segunda elución con 20 mL de una mezcla hexano:diclorometano (98:2). Estas dos fracciones fueron descartadas. Una tercera elución con 50 mL de hexano:diclorometano (50:50) nos permitió recuperar los PCDDs/PCDFs y para asegurarnos de su total recuperación, se agregó una última fracción de 20 mL de diclorometano.

Posteriormente, el extracto se reconcentró mediante la evaporación a presión reducida hasta sequedad total, luego se transfirió a un vial con ayuda de 4 porciones de 1 mL de diclorometano, cada vez que se agregó el

diclorometano se evaporó con una corriente de nitrógeno, después se resuspendió con 5 μL de nonano, y se adicionó 5 μL del estándar EPA 1613ISS para la cuantificación.

2.5.4 Separación y detección

Por último, para la evaluación de la eficiencia de la extracción, se realizó el análisis de los extractos por Cromatografía de Gases con un detector de Espectrometría de Masas de Baja Resolución.

2.6 Validación del método de extracción para la determinación de PCDDs/PCDFs en carnes

Una vez implementado el método de extracción se procedió a la validación con los siguientes parámetros:

- Porcentaje de recuperación.
- Precisión.

Para evaluar el porcentaje de recuperación y la precisión se realizó la metodología ya descrita, con una modificación, en el momento en que se agregó el estándar EPA 1613 LCS también se adicionó el estándar EPA 1613 PAR. Luego se continuó con el procedimiento establecido.

2.6.1 Porcentaje de recuperación

Para el cálculo del porcentaje de recuperación se requiere el dato de la concentración encontrada (ecuación 4), que se obtiene de la relación entre la suma de las áreas de los iones de los isómeros nativos y los correspondientes marcados, así como los factores de respuesta relativa determinados en la validación y la concentración de los compuestos marcados.

$$Cex(ng/mL) = \frac{(A1n + A2n)Cl}{(A1l + A2l)RR} \qquad \text{(ecuación 4)}$$

Donde:

$A1n + A2n$ = Suma de las áreas de los iones primario y secundario de los PCDDs/PCDFs nativos.

$A1l + A2l$ = Suma de las áreas de los iones primario y secundario de los PCDDs/PCDFs marcados isotópicamente con $^{13}C_{12}$.

Cl = Concentración de los compuestos marcados isotópicamente con $^{13}C_{12}$.

RR = Respuesta relativa.

Cex = Concentración encontrada.

El porcentaje de recuperación es la relación entre la concentración encontrada y la concentración añadida x 100, según la ecuación 5.

$$\%R = \frac{Cex(\mu g/mL)}{Cax(\mu g/mL)} * 100 \qquad \text{(ecuación 5)}$$

Donde:

Cex = Concentración encontrada.

Cax = Concentración añadida.

$\%R$ = Porcentaje de recuperación.

2.6.2 Precisión

Para evaluar la precisión, se procesaron 5 muestras consecutivas y a partir de los porcentajes de recuperación se calculó el promedio, la desviación estándar y el porcentaje de desviación estándar. Se utilizó el programa Microsoft Excel.

2.7 Aplicación del método validado en muestras de carne

2.7.1 Selección de muestras

Se seleccionaron muestras al azar de carnes de res para determinar los niveles de PCDDs/PCDFs aplicando el método validado.

2.7.2 Procesamiento de las muestras

Las muestras se procesaron aplicando el método de extracción validado, se analizaron en Cromatografía de Gases con un detector de Espectrometría de Masas de Baja Resolución.

Los niveles de PCDDs y PCDFs se reportaron en pg/g de grasa, mediante la relación entre la concentración encontrada y el peso de la grasa obtenida de la muestra por el método Soxhlet (ecuación 6).

$$Concentración = \frac{Cex}{Ws} \qquad \text{(ecuación 6)}$$

Donde:

Cex = Concentración encontrada (pg).

Ws = Peso de la grasa de la muestra (g).

2.7.3 Niveles de PCDDs/PCDFs de acuerdo a su Toxicidad

El TEQ resulta de multiplicar la concentración (pg/g grasa) de cada congénere por su TEF, según la ecuación 7.

$$TEQ = Concentración * TEF \qquad \text{(ecuación 7)}$$

Donde:

$Concentración$ = pg/g grasa de la ecuación 6.

TEF = Factor de equivalencia tóxica correspondiente a cada congénere (Tabla I).

CAPÍTULO 3

RESULTADOS

3.1 Condiciones cromatográficas

La figura 5 muestra un cromatograma obtenido con las condiciones finales de operación empleando un cromatógrafo de gases acoplado a un detector de espectrometría de masas de baja resolución. La tabla IX muestra los resultados de los criterios de validación.

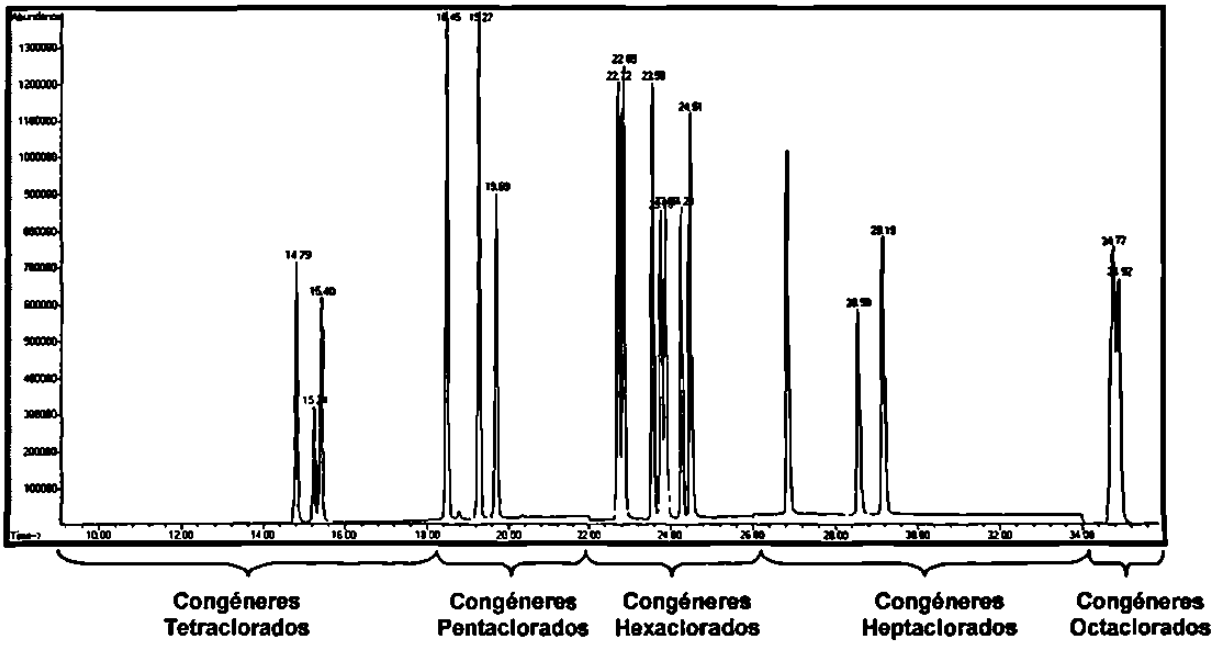

Figura 5. Cromatograma del estándar de 10 a 100 ng/mL de los 17 congéneres PCDDs/PCDFs analizados por GC/LRMS.

Tabla IX. Criterios de validación obtenidos por GC/LRMS de los 17 congéneres PCDDs/PCDFs.

Criterio	PCDDs	PCDFs	Método USEPA 1613
Valle de isómeros específicos	16%	——	≤ 25%
Nivel mínimo cuantificable	2.0 ng/mL S/N > 10	0.5 ng/mL S/N > 10	S/N ≥ 10
Relación de abundancia de iones isotópicos	0.84	0.73	M / M+2 = 0.65 – 0.89
Linearidad % Coeficiente de Variación	16.69%	11.58%	≤ 20%

L. Naccha

3.2 Extracción y purificación de la muestra

La figura 6 muestra el cromatograma obtenido de una muestra adicionada con el estándar EPA - 1613PAR, que contiene la mezcla de los 17 congéneres nativos en concentraciones de 40 a 400 ng/mL sin control de la temperatura del laboratorio. La separación y cuantificación se realizó por Cromatografía de Gases con un detector de Espectrometría de Masas.

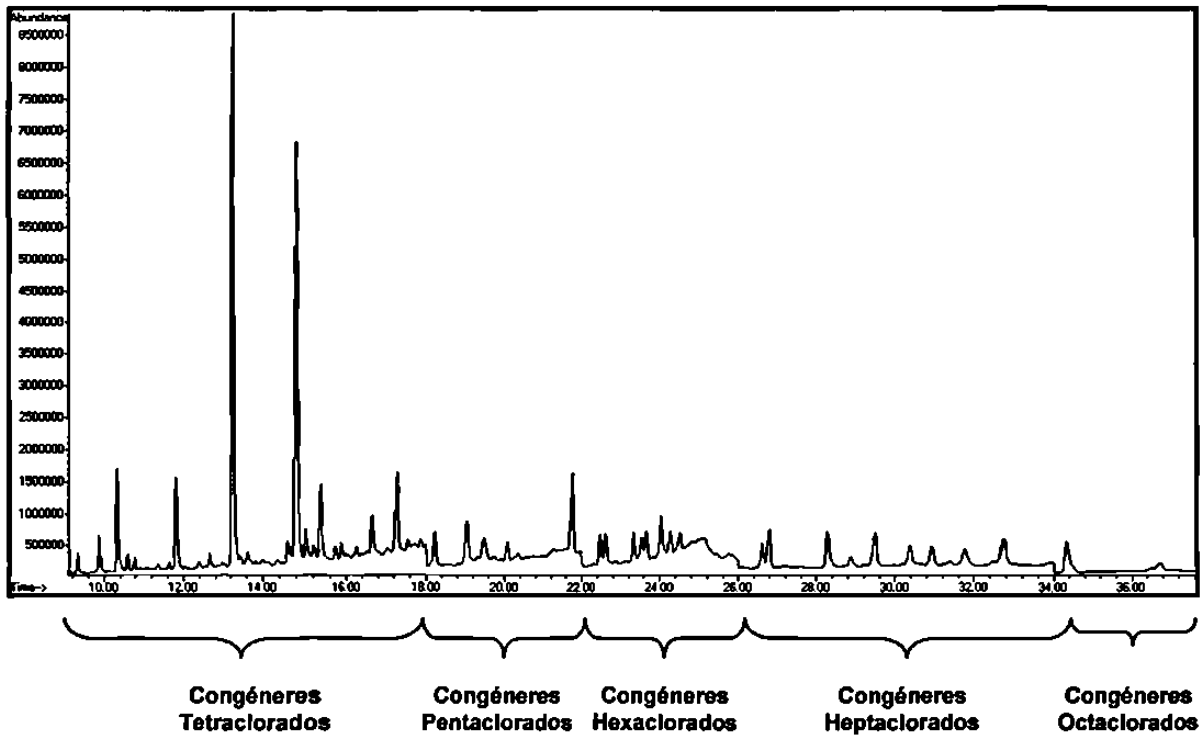

Figura 6. Cromatograma de la muestra adicionada con el estándar EPA – 1613PAR, sin control de la temperatura del laboratorio.

El cromatograma no mostró ninguna señal de los analitos de interés, debido a que la temperatura del laboratorio estuvo por encima de 25 °C. Por esta razón se tuvo que controlar la temperatura de laboratorio de modo que fuese menor o igual que 25 °C.

En la figura 7 se muestra el cromatograma obtenido de una muestra adicionada con el estándar EPA – 1613PAR, procesada a una temperatura de laboratorio de 24° C y con 13 g de grasa.

El cromatograma muestra que no se alcanzan a recuperar los 17 congéneres, solo se recuperaron 8 de ellos. Si bien es cierto que se observó mayor número de congéneres, no fue el total.

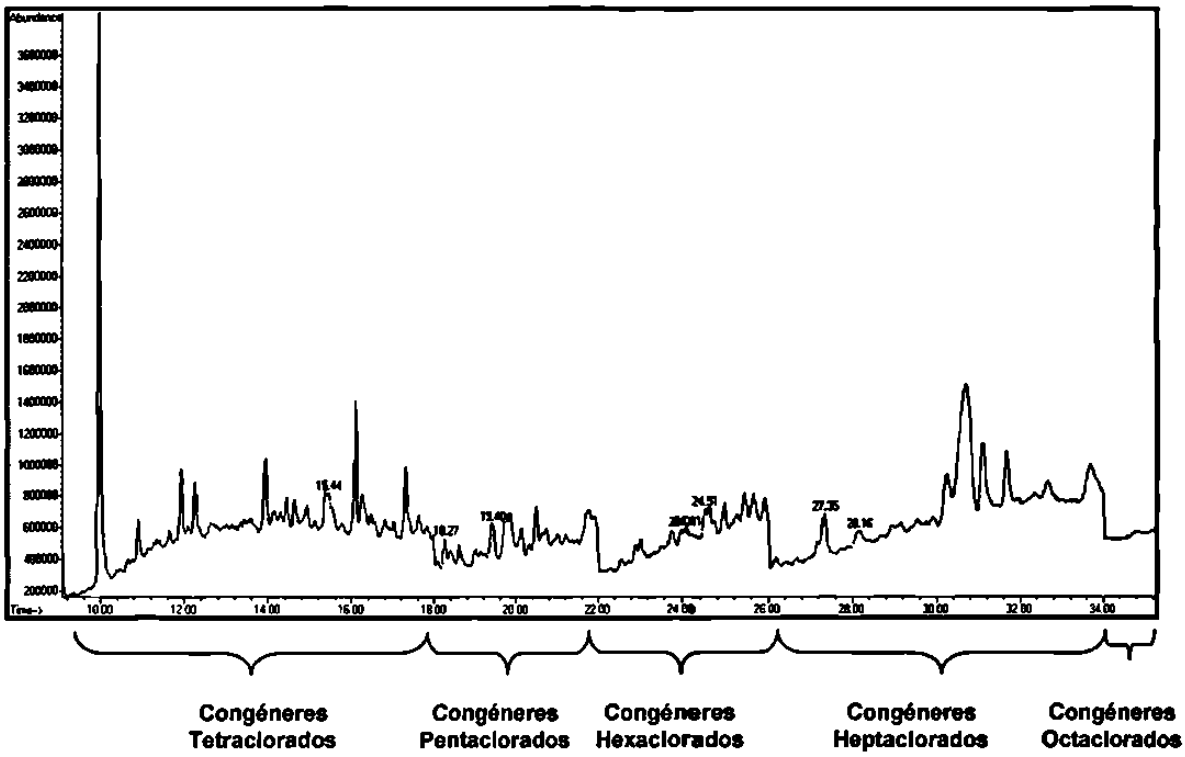

Figura 7. Cromatograma de la muestra adicionada con el estándar EPA – 1613PAR, a una temperatura de laboratorio de 24 °C.

La figura 8 muestra el cromatograma de una muestra adicionada con el estándar EPA – 1613PAR, con una cantidad de grasa entre 5 y 10 g.

Con las condiciones de temperatura del laboratorio de 24 °C y la grasa extraída entre 5 y 10 g se alcanzaron a detectar los 17 congéneres. Bajo estas condiciones se obtuvo un porcentaje de recuperación del 34%, en el caso del 2,3,7,8 – Tetraclorodibenzofurano y resultados similares para los demás congéneres. Para mejorar este resultado se tuvo que hacer un mejor control en la velocidad de flujo de los extractos.

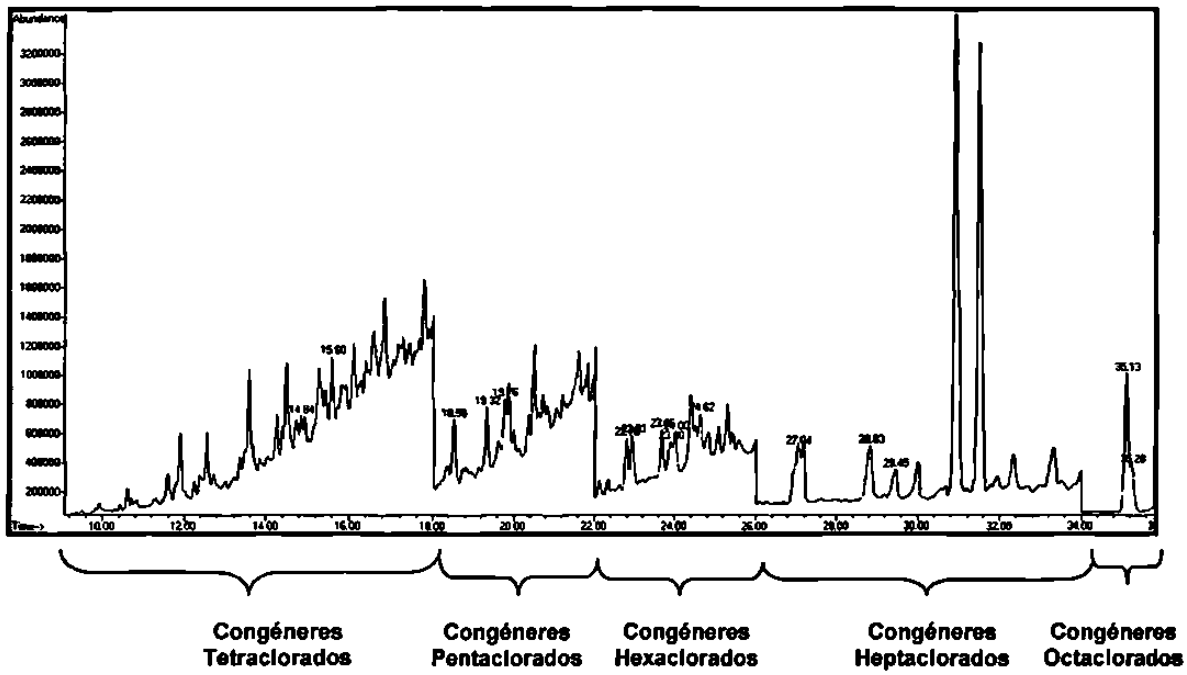

Figura 8. Cromatograma de la muestra adicionada con el estándar EPA – 1613PAR, con una cantidad de grasa entre 5 y 10 g de grasa.

La figura 9 muestra el cromatograma obtenido de la muestra adicionada con el estándar EPA – 1613PAR, donde se controló la velocidad de flujo en la etapa de purificación y fraccionamiento. Bajo esta condición se obtuvo un aumento en los porcentajes de recuperación de todos los analitos.

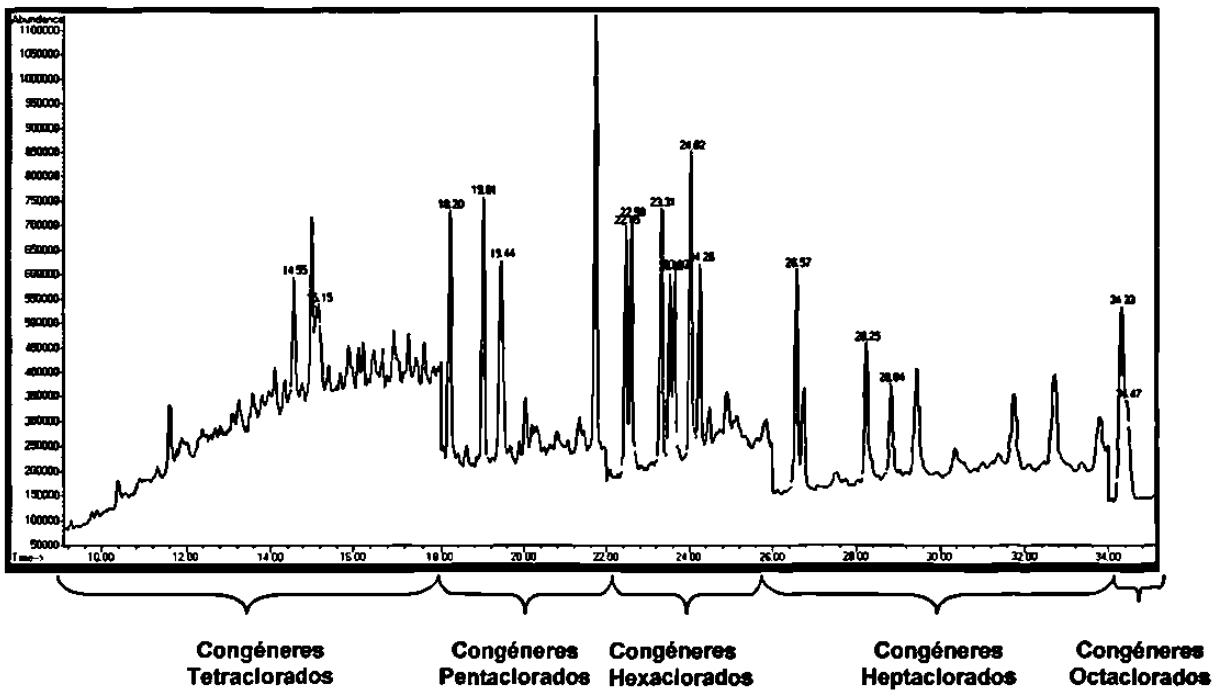

Figura 9. Cromatograma de la muestra adicionada con el estándar EPA – 1613PAR, con control de la velocidad de flujo.

Considerando estos resultados, el método desarrollado de extracción y purificación de la muestra resultó ser el siguiente:

a) Tratamiento previo de la muestra

- Congelar la muestra para después ser liofilizada.
- Triturar y homogenizar en un mortero la muestra liofilizada.
- Pesar 15 g de muestra liofilizada para obtener entre 5 a 10 g de grasa.
- Transferir a un dedal de vidrio y colocarlo en el aparato Soxhlet.
- Agregar el estándar EPA – 1613LCS.
- Añadir 400 mL de tolueno:ciclohexano (1:1) en el aparato Soxhlet y extraer la grasa durante 24 horas.
- Evaporar en el rotaevaporador hasta eliminar todo el solvente.
- Dejar en la estufa a 105 °C por 12 horas.
- Enfriar y pesar la grasa obtenida.

b) Extracción de las dioxinas

- Transferir a un embudo de separación de 1000 mL lavando las paredes con un total de 100 mL de hexano.
- Añadir 50 mL de ácido sulfúrico concentrado.
- Agitar suavemente por 1 minuto.
- Reposar durante 24 horas.
- Repetir la operación de agregar ácido sulfúrico hasta obtener una fase acuosa parda clara.
- Evaporar la fase orgánica hasta un volumen de 3 mL.

c) Purificación y fraccionamiento

- Activar los adsorbentes florisil y alúmina a temperaturas de 600 y 300 °C respectivamente durante 8 horas.
- Preparar las columnas de sílica gel, florisil y alúmina.
- Pasar la muestra por las columnas de sílica gel, florisil y alúmina con sus respectivos solventes.
- Evaporar y resuspender la muestra con nonano.
- Añadir 5µL del estándar EPA – 1613ISS.
- Inyectar en el Cromatógrafo de Gases con detector selectivo de Espectrometría de Masas.

3.3 Validación del método desarrollado

3.3.1 Porcentaje de recuperación

La exactitud del método se determinó en base al porcentaje de recuperación. En la tabla X se muestran los porcentajes de recuperación para los congéneres de PCDDs/PCDFs.

Tabla X. Resultados de los porcentajes de recuperación para determinar los congéneres de PCDDs/PCDFs. (n=19)

Congéneres	Porcentaje de recuperación GC/LRMS	Porcentaje de recuperación Método USEPA 1613 HRGC/HRMS
2, 3, 7, 8 – TCDF	70 – 116%	24 – 169%
1, 2, 3, 7, 8 – PeCDF	95 – 164%	24 – 185%
2, 3, 4, 7, 8 – PeCDF	80 – 166%	21 – 178%
1, 2, 3, 4, 7, 8 – HxCDF	107 – 150%	26 – 152%
1, 2, 3, 6, 7, 8 – HxCDF	97 – 137%	26 – 123%
2, 3, 4, 6, 7, 8 – HxCDF	96 – 137%	29 – 147%
1, 2, 3, 7, 8, 9 – HxCDF	90 – 130%	28 – 136%
1, 2, 3, 4, 6, 7, 8 – HpCDF	77 – 121%	28 – 143%
1, 2, 3, 4, 7, 8, 9 – HpCDF	97 – 147%	26 – 138%
2, 3, 7, 8 – TCDD	87 – 144%	25 – 164%
1, 2, 3, 7, 8 – PeCDD	97 – 170%	25 – 181%
1, 2, 3, 4, 7, 8 – HxCDD	96 – 137%	32 – 141%
1, 2, 3, 6, 7, 8 – HxCDD	94 – 122%	28 – 130%
1, 2, 3, 4, 7, 8, 9 – HpCDD	74 – 135%	23 – 140%
OCDD	80 – 123%	17 – 157%

3.3.2 Precisión

Los resultados de la precisión del método se muestran en la tabla XI, los cuales se calcularon en función del porcentaje de desviación estándar relativa (%RSD).

Tabla XI. Resultados de la precisión del método para determinar los 17 congéneres de PCDDs/PCDFs. (n=19)

Congéneres	Promedio	Desviación Estándar	% RSD
2, 3, 7, 8 – TCDF	95.87	15.07	15.72
1, 2, 3, 7, 8 – PeCDF	122.14	23.64	19.35
2, 3, 4, 7, 8 – PeCDF	107.15	18.65	17.40
1, 2, 3, 4, 7, 8 – HxCDF	125.70	13.40	10.66
1, 2, 3, 6, 7, 8 – HxCDF	114.73	12.43	10.83
2, 3, 4, 6, 7, 8 – HxCDF	118.40	14.16	11.96
1, 2, 3, 7, 8, 9 – HxCDF	122.20	14.26	11.67
1, 2, 3, 4, 6, 7, 8 – HpCDF	97.57	19.40	19.88
1, 2, 3, 4, 7, 8, 9 – HpCDF	119.42	21.41	17.92
OCDF	55.11	9.59	17.40
2, 3, 7, 8 – TCDD	116.42	19.44	16.70
1, 2, 3, 7, 8 – PeCDD	128.47	25.56	19.89
1, 2, 3, 4, 7, 8 – HxCDD	112.28	10.10	8.99
1, 2, 3, 6, 7, 8 – HxCDD	102.23	8.23	8.05
1, 2, 3, 7, 8, 9 – HxCDD	38.92	5.79	14.88
1, 2, 3, 4, 7, 8, 9 – HpCDD	112.67	16.07	14.26
OCDD	115.19	19.36	16.81

3. 4 Niveles de PCDDs/PCDFs en muestras de carne

La figura 10 muestra un cromatograma representativo de una muestra de carne. Se puede observar que se detectaron 10 señales correspondientes a los congéneres de PCDDs/PCDFs, cuyos tiempos de retención fueron verificados con un estándar de dioxinas de 10 ng/mL, que contenía la mezcla

de los 17 congéneres. El 2,3,7,8 – TCDF apareció a 14.62 min., el 2,3,7,8 – TCDD a 15.05 min., el 1,2,3,7,8 – PeCDF a 18.20 min., el 2,3,4,7,8 – PeCDF a 19.74 min., el 1,2,3,7,8 – PeCDD a 19.52 min., el 1,2,3,4,7,8 – HxCDD a 22.91 min., el 1,2,3,6,7,8 – HxCDD a 23.7 min., el 1, 2,3,7,8,9 – HxCDD a 24.09 min., el 1,2,3,4,6,7,8 – HpCDF a 26.65 min. y el 1,2,3,4,7,8,9 – HpCDD a 28.35 min.

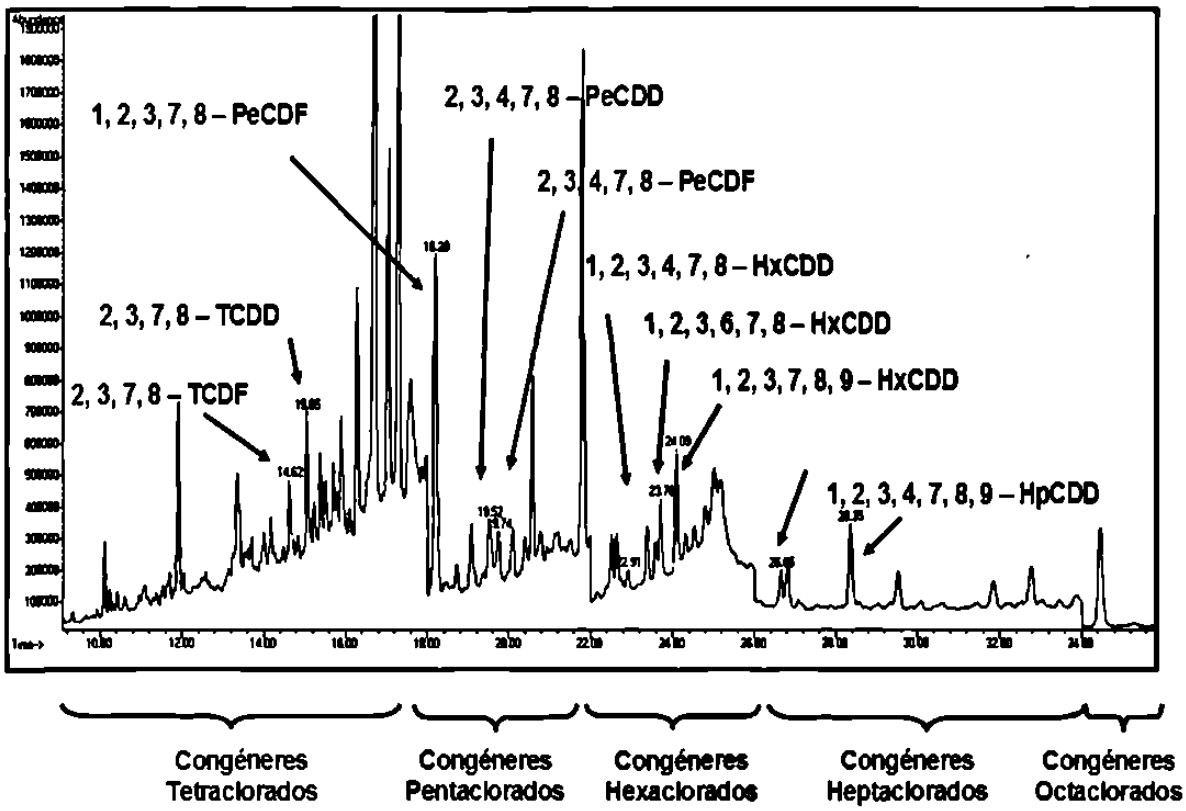

Figura 10. Cromatograma de una muestra de carne.

Los niveles de los congéneres de PCDDs/PCDFs determinados en las muestras de carne, fueron expresados en pg/g de grasa, tal como se muestran en la tabla XII.

Tabla XII. Niveles de PCDDs/PCDFs en muestras de carne en pg/g de grasa.

Congéneres	Muestra A	Muestra C	Muestra 3	Muestra J
2, 3, 7, 8 – TCDF	N. D.	0.96	N. D.	N. D.
1, 2, 3, 7, 8 – PeCDF	N. D.	4.24	N. D.	N. D.
2, 3, 4, 7, 8 – PeCDF	0.28	6.06	N. D.	N. D.
1, 2, 3, 4, 7, 8 – HxCDF	N. D.	N. D.	N. D.	N. D.
1, 2, 3, 6, 7, 8 – HxCDF	N. D.	N. D.	N. D.	N. D.
2, 3, 4, 6, 7, 8 - HxCDF	N. D.	N. D.	N. D.	N. D.
1, 2, 3, 7, 8, 9 – HxCDF	N. D.	N. D.	N. D.	N. D.
1, 2, 3, 4, 6, 7, 8 – HpCDF	6.19	10.26	18.93	11.70
1, 2, 3, 4, 7, 8, 9 – HpCDF	N. D.	N. D.	N. D.	N. D.
OCDF	N. D.	N. D.	N. D.	N. D.
2, 3, 7, 8 – TCDD	2.84	0.67	N. D.	N. D.
1, 2, 3, 7, 8 – PeCDD	6.55	2.08	N. D.	4.97
1, 2, 3, 4, 7, 8 – HxCDD	N. D.	10.35	N. D.	N. D.
1, 2, 3, 6, 7, 8 – HxCDD	N. D.	4.55	N. D.	N. D.
1, 2, 3, 7, 8, 9 – HxCDD	N. D.	0.45	N. D.	N. D.
1, 2, 3, 4, 7, 8, 9 – HpCDD	N. D.	15.42	6.65	0.78
OCDD	N. D.	N. D.	1.58	N. D.

N. D. = No Detectable.

3.5 Niveles de PCDDs/PCDFs de acuerdo a su Toxicidad

La tabla XIII muestra los resultados de los congéneres de acuerdo a su toxicidad expresados como cantidad de equivalentes tóxicos (TEQ).

3.6 Comparación de Concentraciones de Equivalentes Tóxicos de PCDDs/PCDFs en muestras de carne

Algunas muestras de carne procesadas se enviaron para analizar al Laboratorio de Dioxinas del Instituto de Investigaciones Químicas y Ambientales del Centro Superior de Investigaciones Científicas en Barcelona, España (IIQAB-CSIC), donde fueron analizadas en un equipo de Cromatografía de Gases de Alta Resolución con un Detector de Espectrometría de Masas de Alta Resolución. En la tabla XIV se muestra la comparación de los resultados obtenidos de una muestra de carne en nuestro laboratorio con el equipo GC/LRMS y los obtenidos en Barcelona. Se puede observar que se obtuvo una suma total de TEQ – OMS de PCDDs/PCDFs de 6.84 en nuestro laboratorio y de 9.89 en el IIQAB-CSIC.

Tabla XIV. Comparación de Concentraciones de Equivalentes Tóxicos de PCDDs/PCDFs en muestras de carne.

Congéneres	Muestra C Dpto. Q. A. GC/LRMS	Muestra C IIQAB-CSIC HRGC/HRMS
2, 3, 7, 8 – TCDF	0.10	0.03
1, 2, 3, 7, 8 – PeCDF	0.21	0.01
2, 3, 4, 7, 8 – PeCDF	3.03	0.86
1, 2, 3, 4, 7, 8 – HxCDF	N. D.	0.11
1, 2, 3, 6, 7, 8 – HxCDF	N. D.	0.09
2, 3, 4, 6, 7, 8 – HxCDF	N. D.	0.12
1, 2, 3, 7, 8, 9 – HxCDF	N. D.	0.04
1, 2, 3, 4, 6, 7, 8 – HpCDF	0.10	0.03
1, 2, 3, 4, 7, 8, 9 – HpCDF	N. D.	0.01
OCDF	N. D.	0.009
2, 3, 7, 8 – TCDD	0.67	0.34
1, 2, 3, 7, 8 – PeCDD	1.04	1.34
1, 2, 3, 4, 7, 8 – HxCDD	1.04	0.13
1, 2, 3, 6, 7, 8 – HxCDD	0.46	3.65
1, 2, 3, 7, 8, 9 – HXCDD	0.04	1.32
1, 2, 3, 4, 7, 8, 9 – HpCDD	0.15	1.58
OCDD	N. D.	0.216
pg TEQ – OMS (PCDDs/PCDFs) TOTAL / g de grasa	**6.84**	**9.89**

N. D. = No Detectable.

CAPÍTULO 4

DISCUSIÓN

4.1 Condiciones cromatográficas

Las dioxinas son un grupo de contaminantes que se encuentran en muy pequeñas cantidades (pg) en la grasa de los alimentos, por esta razón se necesitan métodos analíticos muy sensibles, selectivos y específicos como es la Cromatografía de Gases acoplada a la Espectrometría de Masas.

En el presente trabajo se empleó el sistema cromatográfico reportado por Oehme (1984), con el cual obtuvieron buenos resultados, sin embargo, bajo esas condiciones los criterios de validación recomendados por el método USEPA 1613 no se cumplieron (relación de abundancia de iones isotópicos). Por este motivo se realizaron varias modificaciones: cambios en la temperatura del inyector, el volumen de inyección, la velocidad de flujo y en el programa de temperatura del horno hasta obtener las condiciones finales de trabajo.

La operación inicial del GC/LRMS fue en modo SCAN y después en modo SIM, para definir los tiempos de retención. En la figura 5 del capítulo 3 se observan los intervalos de tiempo definidos para cada grupo de analito. De acuerdo al orden de elución los congéneres tetraclorados aparecen de 9 a 18 minutos, congéneres pentaclorados 18 a 22 minutos, congéneres hexaclorados de 22 a 26 minutos, congéneres heptaclorados de 26 a 34 minutos y los congéneres octaclorados de 34 a 36 minutos.

Como podemos observar en la tabla IX del capítulo 3, los resultados de los criterios de validación cumplieron con los criterios de aceptación establecidos por la USEPA 1613. En estos criterios se establece que el valle de isómeros específicos debe ser inferior a 25%, para el 2,3,7,8 – TCDD respecto al 1,2,3,7/1,2,3,8 – TCDD que son isómeros con tiempos de retención muy cercanos. El resultado obtenido fue de 16%. Una vez resuelto el valle de isómeros específicos de estos analitos fue posible continuar con la validación, ya que los demás congéneres no presentaron tiempos de retención tan estrechos y pudieron ser resueltos.

El nivel mínimo cuantificable está definido como la relación Señal/Ruido (S/N) de la concentración más baja de la mezcla de los estándares de calibración y verificación (EPA - 1613CS). Esta señal debe ser superior a 10 para que sea aceptado este criterio y de acuerdo a los resultados obtenidos, esta relación se cumple a partir de la concentración de 2 ng/mL para los PCDDs y 0.5 ng/mL para los PCDFs.

Con respecto al criterio de relación de abundancia de iones isotópicos, en la tabla VIII del capítulo 2 se muestran las relaciones de abundancias aceptadas por el método USEPA 1613. Los resultados obtenidos fueron de 0.84 para el 2,3,7,8 – TCDD y de 0.73 para el 2,3,7,8 – TCDF, con lo cual también se cumplió con este criterio.

Finalmente los resultados de la linearidad, expresada como %CV de las respuestas relativas, fueron de 16.69% para el 2,3,7,8 – TCDD y de 11.58% para el 2,3,7,8 – TCDF. Estas respuestas están por debajo del 20%, de acuerdo al método USEPA 1613, por tanto se aceptan. Se consideró el 2,3,7,8 – TCDD y el 2,3,7,8 – TCDF porque son los congéneres de mayor toxicidad.

Al comparar las condiciones cromatográficas desarrolladas con las reportadas en la literatura (Petroske, 1998; Katami, 2004) se observó que los programas de temperaturas son diferente; además de que dichos autores emplearon un equipo de alta resolución (HRGC/HRMS) para el análisis de las dioxinas.

También pudimos observar en la literatura que varios autores emplearon 2 columnas cromatográficas para la separación de los congéneres. Así, Hori (2005) empleó una columna SP-2331 (0.32 mm ID x 60 m largo x 0.2μm) para los congéneres tetraclorados, pentaclorados, y hexaclorados de CDDs/CDFs y una BPX-5 (0.25 mm ID x 60 m largo x 0.25μm) para determinar los congéneres de heptaclorados y octaclorados de CDDs/CDFs.

En nuestro caso solo trabajamos con una columna cromatográfica que fue capaz de resolver simultáneamente los 17 congéneres, con la ventaja de que los resultados obtenidos con esta columna estuvieron dentro de los criterios de validación recomendados por el método USEPA 1613.

4.2 Extracción y purificación de la muestra

Se implementó el método USEPA 1613 con modificaciones realizadas en el Laboratorio de Dioxinas del Instituto de Investigaciones Químicas y Ambientales del Centro Superior de Investigaciones Científicas en Barcelona, España (IIQAB-CSIC). Este método, consistió en una etapa de extracción y una etapa de purificación y fraccionamiento.

La extracción de dioxinas se realizó con hexano en un medio fuertemente ácido (H_2SO_4 concentrado), para facilitar la destrucción de la materia orgánica (grasa y proteínas). Las dioxinas no fueron dañadas debido a su gran resistencia en medios ácidos.

En la etapa de purificación y fraccionamiento se emplearon tres tipos de columnas: de sílica gel modificada, de florisil y de alúmina.

En la columna de sílica gel modificada se realizó la primera etapa de purificación. En esta columna son retenidos gran cantidad de Hidrocarburos

Aromáticos Policíclicos (PAHs), fenoles, ácidos y ésteres, además de aceites y lípidos.

La segunda columna está rellena de florisil que es un adsorbente compuesto de dióxido de silicio y de óxido de magnesio, éste permite continuar con la purificación e iniciar una primera etapa de fraccionamiento. Además posee la capacidad de retener algunos bifenilos policlorados (PCBs), diclorodifeniléter (DDE) y lípidos.

Finalmente, la columna de alúmina sirve para complementar la etapa de purificación y fraccionamiento, debido a su capacidad de separar PCDDs/PCDFs de los PCBs.

Al desarrollar la metodología se observó que la temperatura del laboratorio es un factor que influye en la recuperación de las dioxinas. Esta no debe ser mayor a 25 °C. En los meses de primavera se observó que al aumentar la temperatura, el cromatograma del análisis de la carne adicionada con el estándar EPA – 1613PAR no mostraba ninguna señal de los analitos, debido a la volatilidad de los solventes con los cuales son extraídas las dioxinas en la etapa de purificación y fraccionamiento.

Otro factor que influye en la etapa de extracción es la cantidad de grasa extraída, la cual debe ser entre 5 a 10 g. Esto pudo comprobarse ya que al analizar una muestra con una cantidad de grasa de 13 g, adicionada con el estándar EPA – 1613PAR, no se pudieron recuperar los 17 congéneres

(Figura 7). Si la cantidad de grasa era menor o mayor de 5 a 10 g no se alcanzaban a observar todos los congéneres, debido a la escasez o al exceso de la grasa. En caso escasez no se extraen todos los congéneres y cuando hay exceso se saturan.

Con el control de temperatura de laboratorio, una extracción correcta de grasa de las muestras y la disminución de la velocidad de flujo en la etapa de purificación y de fraccionamiento, se obtuvo un aumento en las áreas de los analitos y por lo tanto mejores porcentajes de recuperación de todos los congéneres. Además de esto, los resultados fueron reproducibles (Figura 9).

4.3 Validación del método desarrollado

4.3.1 Porcentaje de recuperación

La exactitud del método se evaluó en base al porcentaje de recuperación. En la tabla X del capítulo 3 se muestran los porcentajes de recuperación para los congéneres de PCDDs y PCDFs. Se observa que los porcentajes de recuperación obtenidos fueron de 70% a 166%; estos resultados se encuentran dentro de los rangos establecidos por el método USEPA 1613 tanto para furanos como dioxinas, excepto para el 1,2,3,6,7,8 – HxCDF y el 1,2,3,4,7,8,9 – HpCDF. En estos casos los porcentajes de recuperación están por encima del límite superior, pero cumplen con lo establecido en el límite inferior.

Al realizar la comparación de los resultados de recuperación con otros reportes, se observó que los porcentajes de recuperación obtenidos fueron mejores en el límite inferior que señala el método USEPA 1613, pero altos comparados con los de Petroske (1998), Huwe (2005) y Kumar (2001) en el límite superior.

Cabe señalar que Petroske (1998) utilizó un sistema automatizado de purificación y fraccionamiento, además del equipo HRGC/HRMS. Los porcentajes de recuperación obtenidos fueron de un 40% a 110% para los congéneres de PCDDs y PCDFs. Así mismo, Huwe (2005) obtuvo del 35 a 150% para los congéneres de PCDDs y PCDFs, utilizando la misma metodología que Petroske (1998).

Kumar (2001) obtuvo recuperaciones de 57% a 95% para los congéneres de PCDDs y PCDFs, utilizando una metodología similar, excepto que ellos no utilizan la columna de florisil, el sistema de concentración fue el Kuderna-Danish y la identificación y cuantificación fue en un HRGC/HRMS.

4.3.2 Precisión

Los resultados de precisión del método implementado se muestran en la tabla XI del capítulo 3. La precisión se calculó en función del porcentaje de desviación estándar relativa. Se obtuvieron resultados que van desde 8.05% hasta 19.89% , el primero correspondió al 1,2,3,6,7,8 – HxCDD y el segundo

al 1,2,3,7,8 – PeCDD, cumpliendo con el criterio de aceptación establecido por el método USEPA 1613, que señala que debe ser menor que 20%.

Los resultados de precisión obtenidos fueron menores a los reportados para el sistema automatizado de purificación y fraccionamiento, que alcanzaron valores de 25% (Petroske, 1998) y también a los obtenidos por el método de bioensayo CALUX que reportan hasta 32% (Schoeters, 2004).

Sin embargo, nuestros resultados están menos tendientes a cero en relación a los resultados de precisión reportados por Kitamura, que oscila de 0.58% para el 1,2,3,4,7,8 – HxCDD hasta 17% para el 2,3,4,7,8 – PeCDF. Kitamura trabajó un método de extracción líquida presurizada, con un sistema en tandem de columna cromatográfica de sílica gel y carbón activado para la purificación y fraccionamiento que fue totalmente diferente al método de extracción y purificación empleados por nosotros (Kitamura, 2004).

4. 4 Niveles de PCDDs/PCDFs en muestras de carne

En la figura 10 se muestra el cromatograma de una muestra de carne donde se observa la presencia de 10 congéneres. Los tiempos de retención obtenidos fueron corroborados con un estándar de dioxinas.

Con el método establecido se analizaron 4 muestras de carne. Los niveles de los congéneres de PCDDs/PCDFs se expresaron en pg/g de grasa como se muestra en la tabla XII del capítulo 3. Se alcanzaron a detectar desde 0.28 hasta 18.93 pg/g de grasa para ciertos congéneres y otros no fueron detectables. En la muestra A y C se detectó mayor número de congéneres.

4.5 Niveles de PCDDs/PCDFs de acuerdo a su Toxicidad

Los resultados de las muestras de carne expresados como cantidad de equivalentes tóxicos (TEQ), de acuerdo a su toxicidad, se presentan en la tabla XIII del capítulo 3. Se observa que la suma total de pg de TEQ – OMS de PCDDs/PCDFs / g de grasa para la muestra A es de 6.31 y para la muestra C es de 6.84. Estas concentraciones exceden el límite máximo permitido por la Comunidad Europea, el cual establece que el TEQ para dioxinas es de 3 pg TEQ-OMS PCDDs/PCDFs /g grasa. Por tanto, las muestras A y C se identificaron como muestras contaminadas.

En México no existen reportes de casos de contaminación de alimentos con dioxinas, debido a la carencia de metodologías analíticas para la determinación de dioxinas en esta matriz, razón por la cual estos resultados preliminares podrían dar inicio a otros trabajos. Además, el método de extracción validado podría ser aplicado para otros alimentos.

4.6 Comparación de Concentraciones de Equivalentes Tóxicos de PCDDs/PCDFs en muestras de carne

La tabla XIV del capítulo 3 muestra la comparación de los resultados obtenidos de una muestra de carne en nuestro equipo GC/LRMS en las condiciones cromatográficas establecidas y los obtenidos en Barcelona, España donde se trabaja con un HRGC/HRMS. Se puede observar que en la muestra C se obtuvo la suma total de pg de TEQ – OMS de PCDDs/PCDFs / g de grasa, la cual es de 6.84 en nuestro laboratorio y de 9.89 en el IIQAB-CSIC para la misma muestra.

Esta diferencia se debe a que ellos utilizaron un equipo de alta resolución y nosotros uno de baja resolución, sin embargo, pudimos identificar la muestra como contaminada al igual que ellos, según lo establecido por la Comunidad Europea.

Las ventajas de un equipo de HRGC/HRMS son su alta selectividad, alta sensibilidad, alta especificidad y no necesita que las muestras sean extensamente purificadas, porque tiene la capacidad de discriminar muchas interferencias de compuestos con masas similares. En cambio la especificidad de un equipo de baja resolución mejora de acuerdo a la técnica seleccionada para la purificación de la muestra. En nuestro caso, la técnica utilizada para la purificación y el fraccionamiento es selectiva por el uso de los adsorbentes, y por lo tanto pudimos obtener muy buenos resultados para poder identificar muestras contaminadas (IARC, 1991; Eljarrat, 1995).

El contar con equipo de Cromatografía de Gases acoplado a Espectrometría de Masas de Baja Resolución permitirá iniciar en México, particularmente en Monterrey, Nuevo León, el rastreo de Dioxinas en carnes.

CAPÍTULO 5

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

5.1 Conclusiones

1. La cantidad de grasa extraída debe ser entre 5 y 10 g para cuantificar las dioxinas.

2. La temperatura de trabajo del laboratorio debe ser menor de 25 °C debido a la alta volatilidad de los solventes con los cuales son extraídas las dioxinas.

3. El método implementado presenta los porcentajes de recuperación y de precisión dentro de lo señalado por el método USEPA 1613.

4. Se han detectado muestras de carne de res contaminadas con dioxinas.

5. Los resultados obtenidos con el equipo de GC/LRMS permiten realizar el rastreo de dioxinas en carne de res.

5.2 Perspectivas

1. Se debe continuar con el rastreo de dioxinas en carne de res.

2. Se recomienda el análisis de dioxinas en otras matrices.

BIBLIOGRAFÍA

Abad Esteban. Estudio de las Policlorodibenzo-p-dioxinas (PCDDs) y los Policlorodibenzofuranos (PCDFs) en los procesos de incineración y su influencia en el medio ambiente. Tesis de Doctorado. Universidad de Barcelona, Facultad de Química, Departamento de Química Analítica. Septiembre, 1999, pp 4-53.

Abad E., Caixach J. and Rivera J. Application of DB-5ms gas chromatography column for the complete assignment of 2,3,7,8-substituted polychlorodibenzo-p-dioxins and polychlorodibenzofurans in samples from municipal waste incinerator emissions. Journal of Chromatography A. 1997, 786, pp 125-134.

ATSDR. Agencia para Sustancias Tóxicas y el Registro de Enfermedades. Reseña Toxicológica de las Diverso-p-dioxinas Poli cloradas (en inglés). Departamento de Salud y Servicios Humanos de los EE.UU., Servicio de Salud Pública. Atlanta, 1999. http://www.atsdr.cdc.gov.

Badui Salvador. Química de los Alimentos. Ed. Longman de México Editores, S. A. de C. V., 3ª edición, México, 1999. Capítulo 3 pp 191-193.

Baron Caroline, Borresen Torger and Jacobsen Charlotte. UV Treatment of Fishmeal: A Method To Remove Dioxins? Journal Of Agricultural And Food Chemistry. 2005, 53, pp 7091-7097.

Belitz H. D., Grosch W. Química de los Alimentos. Ed. Acribia, S. A., 2ª edición, Zaragoza, España, 1992. Capítulo 12, pp 603-638.

CE. Reglamento (CE) No. 2375/2001 del consejo que modifica el Reglamento (CE) No. 466/2001 de la Comisión por el que se fija el contenido máximo de determinados contaminantes en los productos alimenticios (Texto pertinente a efectos del EEE). Diario Oficial de las Comunidades Europeas. 2001, 321, pp 1-5.

Cohen Mark, Commoner Barry, Cabrera Alfonso, Muir Derek and Santos Carlos. Case Study, Dioxin Draft. Report to the Secretariat of the Comission for Environmental Cooperation. June 1997, pp G-3-25.

Eljarrat E., Casanovas J., Muro R., Huguet X., Caixach J. and Rivera J. Determination of chlorinated dioxins and furans by high resolution gas chromatography coupled to mass spectrometry: comparative study of LRMS and HRMS. Química Analítica. 1995, 14, pp 89-95.

Hori Tsuguhide, Nakagawa Reiko, Tobiishi kazuhiro, Iida Takao, Tsutsumi Tomoaki, Sasaki Kumiko and Toyoda Masatake. Effects of Cooking on Concentrations of Polychlorinated Dibenzo-p-dioxins and Related Compounds in Fish and Meat. Journal Of Agricultural And Food Chemistry. 2005, 53, pp 8820-8828.

Huwe Janice and Larsen Gerald. Polychlorinated Dioxins, Furans, and Biphenyls, and Polybrominated Diphenyl Ethers in a U.S. Meat Market Basket and Estimates of Dietary Intake. Environmental Science Technology. 2005, 39, pp 5606-5611.

Huwe Janice. Dioxins in Food: A Modern Agricultural Perspective. Journal Of Agricultural And Food Chemistry. 2002, 50, pp 1739-1750.

IARC. International Agency for Research on Cancer. World Health

Organization. IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Polychlorinated dibenzo-p-dioxins and Polychlorinated dibenzofurans. IARC Scientific Publications No. 108. France, Lyon, 1991, vol. 69, pp 1-2, 105-133.

Interim Secretariat of the Stockholm Convention on Persistent Organic Pollutants. A guide to the Stockholm Convention on persistent organic pollutants. PNUMA, Suiza, 2002.

Katami Takeo, Yasuhara Akio and Shibamoto Takayuki. Formation of Dioxins from Incineration of Foods Found in Domestic Garbage. Environmental Science Technology. 2004, 38, pp 1062-1065.

Kira R., Sawyer R. and Egan H. Composición y Análisis de Alimentos de Pearson. Ed. Compañía Editorial Continental S. A. de C. V., 2ª edición, México, 1999. Capítulo 13, pp 517-537.

Kitamura Kimiyoshi, Takazawa Yoshikatsu, Hashimoto Shunji, Choi Jae-Won, Ito Hiroyasu and Morita Masatoshi. Effective extraction method for dioxin analysis from lipid-rich biological matrices using a combination of pressurized liquid extraction and dimethyl sulfoxide/acetonitrile/hexane partitioning. Analytica Chimica Acta. 2004, 512, pp 27–37.

Kumar Kurunthachalam, Kannan Kurunthachalam, Paramasivan Odathurai, Shanmuga Vellakovil, Nakanishi Junko and Masunaga Shigeki. Polychlorinated Dibenzo-p-Dioxins, Dibenzofurans, and Polychlorinated Biphenyls in Human Tissues, Meat, Fish, and Wildlife Samples from India. Environmental Science Technology. 2001, 35, pp 3448-3455.

Lampariski L. L. and Nestrick T. J. Determination of Tetra-, Hexa-, Hepta-, and Octachlorodibenzo-p-dioxin Isomers in Particulate

Samples at Parts per Trillion Levels. Analytical Chemistry. 1980, 52, pp 2045-2054.

Lampariski L. L. and Nestrick T. J. Nobel Extraction Device for the Determination of Chlorinated Dibenzo-p-dioxins (PCDDs) and Dibenzofurans (PCDFs) in Matrices Containing Water. J. Chemosphere. 1989, 19, pp 27-31.

McKay G. Dioxin characterization, formation and minimization during municipal solid waste (MSW) incineration: review. Journal Chemical Engineering. 2005, 86, pp 343-368.

Naccha Torres Lidia Runia. Cuantificación de Dioxinas por Cromatografía de Gases/Espectrometría de Masas de Baja Resolución (CG/LRMS) en carnes y leches consumidos en Nuevo León. Tesis de Doctorado, Facultad de Biología, U.A.N.L., San Nicolás de los Garza, Nuevo León, (en desarrollo).

Norma Oficial Mexicana. NOM-158-SCFI-2003, Jamón-Denominación y clasificación comercial. Sección 18 "Empacadores de Carnes Frías". Sección 21 "Obradores de Tocinería, 2003.

Oehme Michael and Kirschmer Paul. Isomer Selective Determination of Tetrachlorodibenzo-p-dioxins Using Hydroxyl Negative Ion Chemical Ionization Mass Spectrometry Combined with High-Resolution Gas Chromatography. Analytical Chemistry. 1984, 56, pp 2754-2759.

Petroske E., Zaylskie R. G. and Feil V. J. Reduction in Polychlororinated Dibenzodioxin and Dibenzofuran Residues in Hamburger Meat during Cooking. Journal Of Agricultural And Food Chemistry. 1998, 46, pp 3280-3284.

Schoeters Greet, Goyvaerts Marie, Ooms Daniëlla and Van Cleuvenbergen Rudy. The evaluation of dioxin and dioxin-like

contaminants in selected food samples obtained from the Belgian market: comparison of TEQ measurements obtained through the CALUX bioassay with congener specific chemical analyses. J. Chemosphere. 2004, 54, pp 1289-1297.

Smith L. M., Stalling D. L. and Johnson J. L. Determination of part per trillion levels of polychlorinated dibenzofurans and dioxins in environmental samples. Analytical Chemistry. 1984, 56, pp 1830-1842.

Swackhamer Deborah, Hans W., Paerl Steven, Eisenreich J., Hurley James y Hornbuckle Keri. Impacto de Contaminantes Atmosféricos Sobre Ecosistemas Acuáticos. Tópicos en Ecología publicado por la Ecological Society of America (la Sociedad Norteamericana de Ecológica), Washington, D. C. Verano 2004, Numero 12, pp 3-21.

UNEP. United Nations Environment Programme. National and Regional Emissions of PCDD/PCDF. UNEP Chemicals publicado por la Inter-Organization Programme For The Sound Management Of Chemicals. Geneva, Switzerland. May, 1999.

USEPA Method 1613. Revision B: Tetra- through Octa- Chlorinated Dioxins and Furans by Isotope Dilution HRGC/HRMS. U.S. Environmental Protection Agency Office of Water Engineering and Analysis Division. Washington, D. C., 20460. October, 1994.

Van den Berg M., Birnbaum L., Bosveld B.T.C., Brunström B., Cook P., Feeley M., Giesy J.P., Hanberg A., Hasegawa R., Kennedy S.W., Kubiak T., Larsen J.C., Van Leeuwen F.X.R., Liem A.K.D, Nolt C., Peterson R.E., Poellinger L., Safe S., Schrenk D., Tillitt D., Tysklind M., Younes M., Waern F. and Zacharewski T. Toxic Equivalency Factors (TEFs) for PCBs, PCDDs, PCDFs for humans and wildlife. Environmental Health

Perspective. 1998, 106 (12), pp 775-792.

Weisglas Kuperus N. Neurodevelopmental, immunological and endocrinological indices oif perinatal human exposure to PCBs and dioxins. Chemosphere, 1998, 37, pp 1845-1853.

WHO. World Health Organization. Environmental Health Criteria Series (EHCS). No. 205. Polybrominated dibenzo-p-dioxins and dibenzofurans. Assessment of the health risk of dioxins: re-evaluation of the Tolerable Daily Intake (TDI). Geneva, Switzerland, 1998.

Yarto Mario, Gavilán Arturo, Barrera Juan. El convenio de Estocolmo sobre contaminantes orgánicos persistentes y sus implicaciones para México. Gaceta Ecológica publicada por el Instituto Nacional de Ecología, Dirección de Investigación sobre Sustancias Químicas y Riesgos Ecotoxicológicos, México, D. F. Octubre-diciembre 2003, No. 069, pp 7-28.

TIPO DE ADQUISICION
O T O