

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



**CUANTIFICACIÓN DE DIOXINAS POR CROMATOGRFÍA DE
GASES/ESPECTROMETRÍA DE MASAS DE BAJA RESOLUCIÓN (GC/LRMS)
EN CARNES Y LECHE CONSUMIDOS EN NUEVO LEÓN**

Por

M.C. LIDIA RUNIA NACCHA TORRES

**Como requisito parcial para obtener el Grado de
DOCTOR EN CIENCIAS con Acentuación en Alimentos**

Agosto, 2010

**CUANTIFICACIÓN DE DIOXINAS POR CROMATOGRAFÍA DE
GASES/ESPECTROMETRÍA DE MASAS DE BAJA RESOLUCIÓN (GC/LRMS)
EN CARNES Y LECHE CONSUMIDOS EN NUEVO LEÓN**

Aprobación de la Tesis:

**Dra. María Guadalupe de Jesús Alanís Guzmán
Presidenta**

**Dr. Carlos Abel Amaya Guerra
Secretario**

**Dra. Noemí Waksman de Torres
1º. Vocal**

**Dr. Juan Gabriel Báez González
2º. Vocal**

**Dra. Rocío Castro Ríos
3er Vocal**

**CUANTIFICACIÓN DE DIOXINAS POR CROMATOGRAFÍA DE
GASES/ESPECTROMETRÍA DE MASAS DE BAJA RESOLUCIÓN (GC/LRMS)
EN CARNES Y LECHE CONSUMIDOS EN NUEVO LEÓN**

Presentado por:

M.C. LIDIA RUNIA NACCHA TORRES

Este trabajo se realizó en los laboratorios del Departamento de Química Analítica de la Facultad de Medicina, de la Universidad Autónoma de Nuevo León y Laboratorio de Dioxinas del Instituto de Diagnóstico Ambiental y Estudios del Agua del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) en Barcelona, España, bajo la dirección de la Dra. Ma. Guadalupe Alanís Guzmán y la Dra. Noemí Waksman de Torres, y la asesoría externa del Dr. Esteban Abad Holgado y el Dr. Lorenzo Heyer Rodríguez.

FIRMAS

Directora Interna

Dra. Ma. Guadalupe de Jesús Alanís Guzmán

Directora Externa

Dra. Noemí Waksman de Torres

Asesor Externo

Dr. Esteban Abad Holgado

Asesor Externo

Dr. Lorenzo Heyer Rodríguez

DEDICATORIA

A Don
Abel Cohaila Salas,
mi esposo, mi compañero de toda la vida.

A la memoria de mis padres
Don **Porfirio Naccha Alca** y Doña **Donatilda Torres Del Villar,**
por que sé que siempre están conmigo y gracias a ellos soy lo que soy.

A mis hermanos
Gloria, Elba e Iván.

AGRADECIMIENTOS

A Dios por permitirme llegar a donde he llegado.

A la Dra. Noemí Waksman de Torres por su disponibilidad e invaluable asesoramiento durante el desarrollo de esta investigación.

A la Dra. Guadalupe Alanis Guzmán por sus valiosas sugerencias durante la ejecución de este proyecto.

Al Dr. Josep Rivera Aranda mi especial reconocimiento y gratitud por haberme permitido iniciar el aprendizaje de esta especialidad, en el Laboratorio de Dioxinas del Instituto de Diagnóstico Ambiental y Estudios del Agua del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) en Barcelona, España, gracias a lo cual decidí iniciar esta investigación.

Al Dr. Esteban Abad Holgado por su atenta disposición para compartir conmigo sus conocimientos y experiencia en la especialidad.

Al Dr. Lorenzo Heyer Rodríguez por su apoyo oportuno y consejos durante la ejecución de la presente investigación.

A los miembros de la Comisión de Tesis Dra. Rocío Castro Ríos, Dr. Carlos Amaya Guerra y Dr. Juan Báez Gonzáles por su apoyo e importantes aportaciones durante la revisión de esta tesis.

A la M.C. Anabel Torres Cirio con quién compartí el reto de trabajar con dioxinas, ahora podemos decir tarea cumplida.

A la Dra. Gloria Molina Salinas por su amistad y apoyo incondicional.

A la Dra. Norma Cavazos, la Dra. Aurora Garza y la M.C. Idalia Carmona por su amistad y sus palabras de aliento constantes.

Al M.C. Ricardo Lucio Gutiérrez por haberme ayudado en la adquisición de información relevante para el desarrollo de esta tesis.

A todas aquellas personas que no menciono y que de una forma u otra me apoyaron para que concluya este trabajo.

Al CONACYT y a la UANL por el apoyo económico a los proyectos SAGARPA-CONACYT 2002-C01-1140 y PAICYT CA440-04 respectivamente.

TABLA DE CONTENIDO

| | Página |
|--|---------------|
| DEDICATORIA..... | iii |
| AGRADECIMIENTOS..... | iv |
| LISTA DE FIGURAS..... | xi |
| LISTA DE TABLAS..... | xiii |
| ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS..... | xvi |
| RESUMEN..... | xxii |
| ABSTRACT..... | xxiii |
| CAPÍTULO | |
| 1. INTRODUCCIÓN | 1 |
| 1.1 Objetivos | 5 |
| 1.2 Hipótesis | 5 |
| 2. ANTECEDENTES | 6 |
| 2.1 Definición y estructura química | 6 |
| 2.2 Propiedades físico-químicas | 8 |
| 2.3 Fuentes de generación de PCDDs/PCDFs | 10 |
| 2.4 Distribución de PCDDs/PCDFs en el medio ambiente | 12 |
| 2.4.1 Procesos de transporte | 13 |
| 2.4.2 Procesos de transformación | 15 |
| 2.4.3 Impacto ambiental | 16 |
| 2.4.3.1 Atmósfera | 16 |
| 2.4.3.2 Suelo | 16 |
| 2.4.3.3 Agua | 17 |
| 2.5 Vías directas e indirectas de dioxinas en los productos alimenticios | 17 |

| | |
|--|-----------|
| 2.6 Principales vías de exposición a PCDDs y PCDFs en seres humanos | 21 |
| 2.7 Toxicidad | 24 |
| 2.7.1 Efectos tóxicos y mecanismo | 26 |
| 2.7.2 Carcinogenicidad | 29 |
| 2.7.3 Efectos de PCDDs yPCDFs sobre el sistema endocrino | 31 |
| 2.7.4 Inmunotoxicidad | 33 |
| 2.7.5 Absorción, distribución, biotransformación y excreción | 34 |
| 2.8 Factor de Equivalencia Tóxica | 35 |
| 2.9 Legislación | 38 |
| 2.10 Convenio de Estocolmo | 41 |
| 2.11 Dioxinas en México | 44 |
| 2.12 Carne | 45 |
| 2.13 Leche | 47 |
| 2.14 Metodología | 50 |
| 2.14.1 Toma de muestras | 51 |
| 2.14.2 Extracción | 52 |
| 2.14.3 Purificación y Fraccionamiento | 52 |
| 2.14.4 Separación y detección | 53 |
| 3. MATERIALES Y MÉTODOS | 56 |
| 3.1 Equipo, material y reactivos | 56 |
| 3.1.1 Material Biológico a analizar | 56 |
| 3.1.1.1 Muestras de carne | 56 |
| 3.1.1.2 Muestras de leche | 56 |
| 3.1.2 Equipo | 57 |
| 3.1.3 Material | 58 |
| 3.1.4 Material de Seguridad | 59 |
| 3.1.5 Reactivos | 59 |
| 3.2 Metodología | 61 |
| 3.2.1 Soluciones estándares EPA 1613 | 61 |
| 3.3 Establecimiento de la condiciones de análisis de PCDDs/PCDFs por GC/LRMS | 66 |

| | |
|---|----|
| 3.3.1 Ventanas de tiempo de retención | 69 |
| 3.4 Validación del sistema cromatográfico | 69 |
| 3.4.1 Valle de isómeros específicos | 70 |
| 3.4.2 Relación de abundancia de iones isotópicos | 71 |
| 3.4.3 Nivel mínimo cuantificable | 71 |
| 3.4.4 Linealidad | 72 |
| 3.5 Desarrollo de un método de extracción de los PCDDs/PCDFs para las muestras de carne y leche | 74 |
| 3.5.1 Toma de muestra | 75 |
| 3.5.1.1 Carnes | 75 |
| 3.5.1.2 Leches | 76 |
| 3.5.2 Extracción de dioxinas | 77 |
| 3.5.3 Purificación y fraccionamiento | 77 |
| 3.5.3.1 Preparación de los adsorbentes para la etapa de purificación y fraccionamiento de los PCDDs/PCDFs | 78 |
| 3.5.3.2 Columna de sílica gel modificada | 79 |
| 3.5.3.3 Columna de florisil | 80 |
| 3.5.3.4 Columna de alúmina | 82 |
| 3.5.4 Separación y detección | 83 |
| 3.6 Validación del método analítico para la determinación de PCDDs/PCDFs en carnes y leches | 83 |
| 3.6.1 Porcentaje de recuperación | 84 |
| 3.6.2 Precisión | 85 |
| 3.7 Aplicación del método validado en muestras de carne y leche | 85 |
| 3.7.1 Procesamiento de las muestras | 85 |
| 3.7.2 Niveles de PCDDs/PCDFs de acuerdo a su toxicidad | 86 |
| 3.8 Comparación de resultados de Dioxinas por LRMS y HRMS | 86 |
| 3.9 Análisis estadístico | 86 |
| 3.10 Análisis de riesgo | 87 |
| 3.10.1 Estimación de dosis de exposición | 87 |
| 3.10.1.1 Cálculo de la concentración de dioxina en carne fresca | 88 |
| 3.10.1.2 Consideraciones para la tasa de ingesta de carne | 88 |

| | |
|--|-----------|
| 3.10.1.3 Factor de exposición | 88 |
| 3.10.2 Caracterización de riesgo | 89 |
| 3.10.2.1 Efectos cancerígenos | 89 |
| 3.10.2.2 Efectos no cancerígenos | 90 |
| 4. RESULTADOS | 91 |
| 4.1 Análisis por Cromatografía de Gases/Espectrometría de Masas | 91 |
| 4.1.1 Ventanas de tiempo de retención | 93 |
| 4.2 Validación del sistema cromatográfico | 94 |
| 4.2.1 Valle de isómeros | 94 |
| 4.2.2 Relación de abundancia de iones isotópicos | 94 |
| 4.2.3 Nivel mínimo cuantificable | 95 |
| 4.2.4 Linealidad | 97 |
| 4.3 Extracción y purificación de dioxinas en muestras de carne y leche | 102 |
| 4.3.1 Carne | 102 |
| 4.3.2 Leche | 107 |
| 4.4 Validación del método desarrollado | 109 |
| 4.4.1 Porcentaje de recuperación en carnes | 109 |
| 4.4.2 Precisión en carnes | 111 |
| 4.4.3 Porcentaje de recuperación en leches | 112 |
| 4.4.4 Precisión en leches | 113 |
| 4.5 Aplicación del método validado en muestras de carne y leche | 114 |
| 4.5.1 Niveles de PCDDs/PCDFs en muestras de carne | 114 |
| 4.5.2 Niveles de PCDDs/PCDFs en muestras de Leche | 115 |
| 4.6 Niveles de PCDDs/PCDFs de acuerdo a su toxicidad | 117 |
| 4.6.1 Carne | 118 |
| 4.6.2 Leche | 119 |
| 4.7 Comparación de Concentraciones de Equivalentes Tóxicos de PCDDs/PCDFs en muestras de carne y leche | 119 |
| 4.8 Análisis Estadístico | 125 |
| 4.9 Análisis de riesgo de dioxinas en carne | 129 |
| 4.9.1 Dosis de exposición | 129 |

| | |
|--|-----|
| 4.9.2 Caracterización de riesgo | 129 |
| 4.9.2.1 Efectos cancerígenos | 129 |
| 4.9.2.2 Efectos no cancerígenos | 130 |
| 5. DISCUSIÓN | |
| 5.1 Análisis por Cromatografía de Gases/Espectrometría de Masas | 132 |
| 5.2 Validación del sistema cromatográfico | 134 |
| 5.3 Extracción y purificación de dioxinas en muestras de carne y leche | 136 |
| 5.4 Validación del método desarrollado | 141 |
| 5.4.1 Porcentaje de recuperación en carnes | 141 |
| 5.4.2 Precisión en carnes | 142 |
| 5.4.3 Porcentaje de recuperación en leches | 142 |
| 5.4.4 Precisión en leches | 143 |
| 5.5 Niveles de PCDDs/PCDFs en muestras de carne | 143 |
| 5.6 Niveles de PCDDs/PCDFs en muestras de leche | 145 |
| 5.7 Niveles de PCDDs/PCDFs de acuerdo a su toxicidad en carnes | 146 |
| 5.8 Niveles de PCDDs/PCDFs de acuerdo a su toxicidad en leches | 148 |
| 5.9 Comparación de Concentraciones de Equivalentes Tóxicos de PCDDs/PCDFs en muestras de carne y Leche | 149 |
| 5.10 Análisis Estadístico | 151 |
| 5.11 Análisis de riesgo | 153 |
| 5.11.1 Riesgo carcinogénico | 153 |
| 5.11.2 Riesgo no carcinogénico | 154 |
| 6. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS | 155 |
| 6.1 Conclusiones | 155 |
| 6.2 Perspectivas | 156 |
| REFERENCIAS | 157 |

LISTA DE FIGURAS

| Figura | Página |
|---|--------|
| 1. (a) Fórmula general de los PCDFs y las PCDD (b) 2, 3, 7, 8 - Tetraclorodibenzo- <i>p</i> -dioxina (2, 3, 7, 8 - TCDD) | 6 |
| 2. Vías principales de exposición a Dioxinas a través de alimentos. Las cajas representan fuentes puntuales en las vías y las flechas rojas representan las vías de mayor exposición a las dioxinas | 19 |
| 3. Esquema del proceso toxicológico que desencadenan las dioxinas a nivel celular iniciado con la unión al receptor Ah | 26 |
| 4. Separación de isómeros específicos | 70 |
| 5. Columna de sílica gel modificada | 80 |
| 6. Columna de florisil | 81 |
| 7. Columna de alúmina | 82 |
| 8. Cromatograma de los PCDDs/PCDFs | 91 |
| 9. Cromatograma sin resolución de los octas | 92 |
| 10. Cromatograma del estándar de 10 a 100 pg/μL de los 17 congéneres PCDDs/PCDFs analizados por GC/LRMS | 93 |
| 11. Valle de isómeros de HxCDD y HxCDF | 94 |
| 12. Relación Señal/Ruido de TCDD 0.5 pg/μL | 96 |
| 13. Cromatograma de muestra adicionada con el estándar EPA – 1613PAR, sin control de la temperatura del laboratorio | 103 |
| 14. Cromatograma de la muestra adicionada con el estándar EPA- 1613PAR, a una temperatura de laboratorio de 24 °C | 104 |
| 15. Cromatograma de la muestra adicionada con el estándar EPA – 1613PAR, con una cantidad de grasa entre 5 y 10 g de grasa | 104 |

| | | |
|-----|---|-----|
| 16. | Cromatograma de la muestra adicionada con el estándar EPA – 1613PAR, con control de la velocidad de flujo | 105 |
| 17. | Cromatograma de leche con PAR | 108 |
| 18. | Cromatograma de una muestra de carne | 114 |
| 19. | Cromatograma de una muestra de leche | 116 |
| 20. | Comparación de WHO-TEQ obtenidos por las técnicas de detección de LRMS y HRMS) | 125 |
| 21. | Análisis de regresión lineal entre WHO-TEQ-LRMS y WHO-TEQ HRMS para carnes | 126 |
| 22. | Comparación de WHO-TEQ obtenidos por las técnicas de detección de LRMS y HRMS | 127 |
| 23. | Análisis de regresión lineal entre WHO-TEQ-LRMS y WHO-TEQ-HRMS para leches | 128 |

LISTA DE TABLAS

| Tabla | | Página |
|--------------|---|---------------|
| I. | Número de congéneres de PCDDs y PCDFs | 7 |
| II. | Abreviaturas comúnmente utilizadas para PCDDs y PCDFs | 8 |
| III. | Propiedades físicas de PCDDs y PCDFs | 9 |
| IV. | Propiedades físico-químicas más importantes de PCDDs y PCDFs | 10 |
| V. | Efectos de los PCDDs/PCDFs como disruptores del sistema endocrino | 31 |
| VI. | Factores de Equivalencia Tóxica de los PCDDs/PCDFs propuestos por NATO (I-TEF) y la WHO (WHO-TEF) | 36 |
| VII. | Contenidos máximos de dioxinas y furanos en alimentos | 39 |
| VIII. | Compuestos Orgánicos Persistentes listados en el anexo del Convenio de Estocolmo | 41 |
| IX. | Análisis químico aproximado de la mayoría de las carnes | 46 |
| X. | Composición aproximada de la leche de vaca | 48 |
| XI. | Fases estacionarias utilizadas y la clase de compuestos que remueven en cada fase | 52 |
| XII. | Concentración de las mezclas de los estándares EPA – 1613CS de PCDDs/PCDFs | 63 |
| XIII. | Composición de las mezclas de estándares indicados por el método USEPA 1613 | 65 |
| XIV. | Masas exactas y las relaciones de abundancias de iones isotópicos teóricos (método USEPA 1613) | 72 |
| XV. | Relación de abundancia de iones isotópicos de PCDDs/PCDFs | 95 |

| | | |
|---------|--|-----|
| XVI. | Señal/Ruido de PCDDs y PCDFs | 96 |
| XVII. | Respuesta Relativa de 2,3,7,8,-TCDD | 97 |
| XVIII. | Respuesta Relativa de 2,3,7,8,-TCDF | 97 |
| XIX. | Respuesta Relativa de 1,2,3,7,8,-PeCDD | 98 |
| XX. | Respuesta Relativa de PeCDF | 98 |
| XXI. | Respuesta Relativa de HxCDD | 99 |
| XXII. | Respuesta Relativa de 1,2,3,4,7,8-HxCDF y 1,2,3,6,7,8-HxCDF | 99 |
| XXIII. | Respuesta Relativa de 2,3,4,6,7,8-HxCDF y 1,2,3,7,8,9-HxCDF | 99 |
| XXIV. | Respuesta Relativa de 1,2,3,4,6,7,8-HpCDD | 100 |
| XXV. | Respuesta Relativa de HpCDF | 100 |
| XXVI. | Respuesta Relativa de OCDD | 100 |
| XXVII. | Resumen de los Criterios de validación determinados para PCDDs/PCDFs por GC/LRMS | 101 |
| XXVIII. | Porcentajes de recuperación para determinar los congéneres de PCDDs/PCDFs en carnes | 110 |
| XXIX. | Precisión del método para determinar los 17 congéneres de PCDDs/PCDFs en carnes | 111 |
| XXX. | Porcentajes de recuperación para determinar los congéneres de PCDDs/PCDFs en leches | 112 |
| XXXI. | Precisión del método para determinar los 17 congéneres de PCDDs/PCDFs en leches | 113 |
| XXXII. | Niveles de PCDDs/PCDFs en muestras de carne en pg/g de grasa | 115 |
| XXXIII. | Niveles de PCDDs/PCDFs en muestras de leche en pg/g de grasa | 117 |
| XXXIV. | Resultados de PCDDs/Fs en muestras de carne expresados como WHO-TEQ | 118 |

| | | |
|----------|--|-----|
| XXXV. | Resultados de PCDDs/Fs en muestras de leche expresados como WHO-TEQ | 119 |
| XXXVI. | Dioxinas en muestras de carne por GC/LRMS Y HRGC/HRMS expresadas en pg WHO-TEQ/g grasa | 120 |
| XXXVII. | Dioxinas de muestras de leche por GC/LRMS y HRGC/HRMS expresadas en pg WHO-TEQ/g grasa | 120 |
| XXXVIII. | Perfil de congéneres de PCDDs/PCDFs en muestra de carne | 121 |
| XXXIX. | Perfil de congéneres de PCDDs/PCDFs en muestra de leche | 122 |
| XL. | Comparación de Concentraciones de Equivalentes Tóxicos de PCDDs/PCDFs en muestras de carne | 123 |
| XLI. | Comparación de Concentraciones de Equivalentes Tóxicos de PCDDs/PCDFs en muestra de leche | 124 |
| XLII. | Dosis de exposición a dioxinas por consumo de carne | 129 |
| XLIII. | Caracterización del riesgo carcinogénico | 130 |
| XLIV. | Índices de peligro por ingesta de dioxina en carne | 131 |

ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

| | |
|--------------------|--|
| AHH | Aril hidrocarburo hidroxilasa |
| $A1l + A2l$ | Suma de las áreas de los iones primario y secundario de los PCDDs/PCDFs marcados isotópicamente con $^{13}\text{C}_{12}$ |
| $A1n + A2n$ | Suma de las áreas de los iones primario y secundario de los PCDDs/PCDFs nativos |
| AgNO_3 | Nitrato de plata |
| ATSDR | Agencia para Registro de Sustancias Tóxicas y Enfermedades |
| C | Concentración |
| $^{\circ}\text{C}$ | Grados Celsius |
| C_{ax} | Concentración añadida |
| CCA | Comisión para la Cooperación Ambiental |
| CCAH | Comité Científico de la Alimentación Humana |
| CDD | Chlorinated Dibenzo-p-dioxin (Dibenzo-p-dioxina clorinado) |
| CDF | Chlorinated Dibenzofuran (Dibenzofurano clorinado) |
| CE | Comunidad Europea |
| C_{ex} | Concentración encontrada |
| Cl | Concentración de los compuestos marcados isotópicamente con $^{13}\text{C}_{12}$ |
| C_n | Concentración de los compuestos nativos |
| Cong | Congéneres |
| COPs | Contaminantes Orgánicos Persistentes |
| CS | Calibration Standard (Solución de Calibración y Verificación) |
| CSIC | Laboratorio de Dioxinas del Instituto de Diagnóstico Ambiental y Estudios del Agua del Consejo Superior |

de Investigaciones Científicas (CSIC) en Barcelona,
España

| | |
|----------|--|
| CV | Coeficiente de Variación |
| DCDDs | Diclorodibenzo-p-dioxinas |
| DCDFs | Diclorodibenzofuranos |
| DDE | Diclorodifeniléter |
| DE | Dosis de exposición |
| DDT | Diclorodifeniltricloroetano |
| DGCENICA | Dirección General del Centro Nacional de Investigación y Capacitación Ambiental |
| DRE | Elementos reguladores de dioxinas |
| Ec. | Ecuación |
| EI | Impacto Electrónico |
| EM | Espectrometría de Masas |
| EPA | Environmental Protection Agency (Agencia de Protección del Medio Ambiente) |
| EROD | Etoxiresorufin o-deetilasa |
| FE | Factor de exposición |
| FP | Factor de potencia de cáncer |
| FSH | Hormona estimulante folicular |
| 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 |
| HCB | Hexaclorobenzeno |
| HpCDD | Heptaclorodibenzo-p-dioxina |
| HpCDF | Heptaclorodibenzofurano |
| 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 Internacional para la Investigación del Cáncer) |
| ID | Diámetro interno |
| IDT | Ingestión Diaria Tolerable |
| INE | Instituto Nacional de Ecología |
| IP | Índice de Peligro |
| IR | Índice de Riesgo |
| IRIS | Sistema de Información Integrada de Riesgo |
| ISS | Internal Standard Spiking Solution (Solución de Estándar Interno) |
| I-TEF | Factores de equivalencia tóxica internacional |
| I-TEQ | Equivalentes tóxicos internacionales |
| Kow | Coeficiente de partición octanol-agua |
| L | Litro |
| LCS | Labelled Compound Stock Solution (Solución Stock de Compuestos Marcados Isotópicamente con $^{13}\text{C}_{12}$) |
| LH | Hormona luteinizante |
| M | Ión Molecular |
| > | Mayor que |
| < | Menor que |
| MgO | Óxido de Magnesio |
| mg | Miligramo |
| min | Minuto |
| mL | Mililitro |

| | |
|---------------------------------|---|
| mm | Milímetro |
| MRL | Mínimo nivel de riesgo |
| m/z | Masa/carga |
| NATO/CCMS | North Atlantic Treaty Organization. Committee on the Challenges of Modern Society. (Organización del Tratado del Atlántico Norte. Comité sobre los Retos de la Sociedad Moderna). |
| N.D. | No Detectable |
| Na ₂ SO 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) |
| PC | Peso Corporal |
| PCBPEs | Bencil fenil eterpoliclorados |
| PCBs | Bifenilos policlorados |
| PCDDs | Policlorodibenzo-p-dioxinas |
| PCDE | Policlorodifenil éteres |
| PCDFs | Policlorodibenzofuranos |
| PeCDD | Pentaclorodibenzo-p-dioxina |
| PeCDF | Pentaclorodibenzofurano |
| pg | Picogramo |
| pg/g grasa | Picogramo por gramo de grasa |

| | |
|------------------|--|
| pg/kg | Picogramo por kilogramo |
| \bar{x} | Promedio |
| % R | Porcentaje de recuperación |
| RP | Riesgo poblacional |
| 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 (Monitoreo selectivo de iones) |
| SINAIS | Sistema Nacional de Información en Salud |
| SiO ₂ | Sílica gel |
| T ₄ | Tiroxina |
| TBG | Globulina de unión de tiroxina |
| TCDD | Tetraclorodibenzo-p-dioxina |
| TCDF | Tetraclorodibenzofurano |
| TDI | Ingesta Diaria Tolerable |
| TEF | Factor de Equivalencia Tóxica |
| TEQ | Equivalentes Tóxicos |
| TI | Tasa de ingesta |
| TIF | Tipo Inspección Federal |
| 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) |
| μg/mL | Microgramo por mililitro |
| μL | Microlitro |

| | |
|---------------|---|
| μm | Micrómetro |
| WHO-TEF | Factores de equivalencia tóxica propuestos por la OMS |
| WHO/TEQ | Equivalentes tóxicos calculados con los WHO-TEF |
| w_s | Peso de la grasa de la muestra |

RESUMEN

Lidia Runia Naccha Torres

Fecha de Graduación: Agosto, 2010

Universidad Autónoma de Nuevo León
Facultad de Ciencias Biológicas

Título del Estudio: CUANTIFICACIÓN DE DIOXINAS POR CROMATOGRAFÍA DE GASES/ESPECTROMETRÍA DE MASAS DE BAJA RESOLUCIÓN (GC/LRMS) EN CARNES Y LECHES CONSUMIDOS EN NUEVO LEÓN.

Número de páginas: 169

Candidato para el Grado de Doctor en Ciencias con Acentuación en Alimentos

Área de estudio: Ciencia de alimentos

Propósito y Método del Estudio:

Las Policlorodibenzo-*p*-dioxinas (PCDDs) y los Policlorodibenzofuranos (PCDFs) son comúnmente conocidos como "dioxinas". Las dioxinas son consideradas como los compuestos más tóxicos producidos por el hombre. Dentro de este grupo, la 2,3,7,8-tetraclorodibenzo-*p*-dioxina (TCDD) es la de mayor toxicidad y está clasificada como cancerígena para humanos. La principal vía de exposición a las dioxinas en los seres humanos es la ingestión de alimentos contaminados de origen animal, especialmente carne y productos lácteos. En México no se tiene establecida una metodología analítica que permita la detección rápida y sensible de estos compuestos en alimentos, tampoco se tienen establecidos los límites máximos permitidos del contenido de dioxinas en alimentos. El objetivo de este trabajo fue desarrollar, validar y aplicar un método analítico para la determinación y cuantificación de dioxinas en carnes y leches por Cromatografía de Gases/Espectrometría de Masas de Baja Resolución (GC/LRMS). Para desarrollar el método se implementó el método USEPA 1613 con modificaciones realizadas en el Laboratorio de Dioxinas del Instituto de Diagnóstico Ambiental y Estudios del Agua del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) en Barcelona, España. La metodología analítica comprende cuatro etapas fundamentales: 1) toma de muestras, 2) extracción de dioxinas, 3) purificación y fraccionamiento, 4) separación y detección de los congéneres. La metodología desarrollada se validó de acuerdo con los criterios señalados en el método USEPA 1613. Se aplicó a muestras de carne y leche que se consumen en Monterrey, Nuevo León.

Contribuciones y Conclusiones:

Se analizaron 10 muestras de carne de res y los niveles detectados están comprendidos entre 0.26 y 7.94 pg WHO-TEQ PCDDs/PCDFs/g de grasa. De estas muestras, se ha detectado que el contenido de dioxinas de cuatro de ellas exceden el límite máximo permitido por la Comunidad Europea, el cual es de 3 pg WHO-TEQ PCDDs/PCDFs /g grasa. Por otro lado, se analizaron 10 muestras de leche y los niveles detectados están comprendidos entre 0.16 y 2.81 pg WHO-TEQ PCDDs/PCDFs/g de grasa. Estos niveles están por debajo del límite máximo permitido por la Comunidad Europea, el cual es de 3 pg WHO-TEQ PCDDs/PCDFs/g grasa. Los resultados obtenidos con el equipo de GC/LRMS permiten afirmar que se puede realizar el rastreo de dioxinas en carnes de res y leches con este tipo de equipo. Por lo que sabemos, este es el primer trabajo de investigación acerca del análisis de dioxinas en carnes y leches en México y genera un precedente para el monitoreo de dioxinas en otros alimentos. Dada la importancia de que en México exista una legislación para el control de estos contaminantes, el presente trabajo coadyuva al establecimiento de tal legislación. El método desarrollado puede ser usado para el monitoreo de dioxinas en otros productos cárnicos y derivados lácteos.

Dra. Ma. Guadalupe de Jesús Alanís Guzmán
Directora Interna

Dra. Noemí Waksman de Torres
Directora Externa

ABSTRACT

Lidia Runia Naccha Torres

Graduation date: August, 2010

Universidad Autónoma de Nuevo León
Facultad de Ciencias Biológicas

**Title: QUANTIFICATION OF DIOXIN BY GAS CHROMATOGRAPHY/
LOW RESOLUTION MASS SPECTROMETRY (GC / LRMS) IN
MEAT AND MILK CONSUMED IN NUEVO LEON.**

Number of page: 169

**Candidate for Degree of Doctor
in Science with Emphasis on
Food**

Field of Study: Food Science

Purpose and Method of Study:

The polychlorinated dibenzo-p-dioxins (PCDDs) and polychlorinated dibenzofurans (PCDFs) are commonly known as "dioxins". Dioxins are considered the most toxic compounds produced by man. Within this group, 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) is the most toxic and is classified as carcinogenic to humans. The main route to exposure of dioxins is ingestion of contaminated food of animal origin, especially meat and dairy products. Mexico did not establish an analytical methodology to allow rapid and sensitive detection of these compounds in food. Moreover, no maximum permissible limits of dioxin in food are available in Mexico. The aim of this study was to develop, validate and apply an analytical method for the identification and quantification of dioxin in meat and milk by Low Resolution gas chromatography / mass spectrometry (GC / LRMS). To develop the methodology, USEPA Method 1613 modified by the Dioxin Laboratory of the Institute of Environmental Assessment and Water Research of the Spanish Council for Scientific Research (CSIC) in Barcelona, Spain, was used. The analytical methodology involves four basic stages: 1) sampling, 2) extraction of dioxins, 3) purification and fractionation, 4) separation and detection of congeners. The methodology was validated with the criteria set out in USEPA method 1613. This methodology was applied to analyze samples of meat and milk consumed in Monterrey, Nuevo León.

Contributions and Conclusions:

10 samples of beef were analyzed the levels of dioxins detected were from 0.26 to 7.94 pg WHO-TEQ PCDDs / PCDFs / g fat. In four of these samples the dioxin content exceeded the maximum allowed by the European Community, which is 3 pg WHO-TEQ PCDDs / PCDFs / g fat. In addition, 10 samples of milk were analyzed the levels of dioxins detected were 0.16 to 2.81 pg WHO-TEQ PCDDs / PCDFs / g fat. These levels are below the maximum allowed by the European Community, which is 3 pg WHO-TEQ PCDDs / PCDFs / g fat. The results here presented, demonstrate that GC/LRMS can be used for the screening of dioxins in beef and milk. As far as we know, this is the first report of dioxins analysis in beef and milk in Mexico. Given the fact that in Mexico there is no legislation to control these pollutants, this study contributes to the establishment of such legislation. The method developed could be used for monitoring these contaminants in others meat products and dairy products.

Dra. Ma. Guadalupe de Jesús Alanís Guzmán
Directora Interna

Dra. Noemí Waksman de Torres
Directora Externa

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN

Las dioxinas son contaminantes organoclorados persistentes ampliamente dispersos en el medio ambiente y se encuentran acumulados en alimentos grasos. Han sido consideradas como los compuestos más tóxicos producidos por el hombre. El término “dioxinas” abarca un grupo de 75 policlorodibenzo-*p*-dioxinas (PCDDs) y 135 policlorodibenzofuranos (PCDFs) congéneres, de los cuales 17 son considerados de riesgo toxicológico (UNEP 1999; WHO 2001; Huwe, 2002). El congénere más tóxico es la 2,3,7,8-tetraclorodibenzo-*p*-dioxina (TCDD), clasificado por el Centro Internacional de Investigaciones sobre el Cáncer y otras organizaciones internacionales de reconocido prestigio como cancerígeno humano (Jensen *et al.* 2001; Steenland *et al.* 2004).

El estudio de las dioxinas es muy importante por los diferentes efectos tóxicos que produce en los seres humanos. Estos efectos dependen del grado de exposición, y pueden manifestarse como: cloracné, cambios metabólicos y hormonales, alteraciones a nivel del sistema reproductor masculino y femenino, efectos en el sistema cardiovascular, daño en el sistema nervioso, daños hepáticos, alteraciones del sistema inmunitario, teratogenicidad y carcinogenicidad (Bertazzi *et al.* 2001; Kogevinas, 2001; Bodner *et al.* 2003; Lundqvist *et al.* 2006).

La exposición humana a los PCDDs/Fs puede ocurrir de varias maneras: inhalación del aire, absorción dérmica y consumo de alimentos. La OMS estimó que el 90% de los casos de exposición humana a las dioxinas se da a través de la ingesta de alimentos contaminados de origen animal, de los cuales las fuentes predominantes son carnes, pescados y productos lácteos (Roeder *et al.* 1998; Galli *et al.* 1999).

El aporte nutricional de la carne, sobre todo como fuente de proteínas, hierro, riboflavina y niacina, hace que este alimento sea indispensable en la dieta humana. Además, la carne de bovino es rica en lípidos intramusculares, con un contenido graso que puede oscilar entre 2 y 15% (incluso a veces un 20%), este hecho explica que sea la carne de bovino uno de los principales portadores de dioxinas en la alimentación humana. Estudios señalan que la situación geográfica puede influir en la concentración de dioxinas en carne (Feil *et al.* 1998). Nuevo León registra el consumo per cápita anual de carne de res más alto del país, 37 Kg (Diagnóstico del Sector Agropecuario y Acuícola del Estado de Nuevo León, Sep. 2008).

Por otra parte, la leche es rica en calcio y vitamina D, entre otros nutrientes y como alimento adquiere una importancia fundamental, dado el hecho de que ésta va destinada en buena medida a categorías poblacionales más vulnerables a los efectos perniciosos de sustancias químicas dañinas, como son los niños. Por otro lado, el importante contenido graso de la leche materna, la convierte en un vehículo de transferencia de los contaminantes a la descendencia. Este

hecho ha originado una especial preocupación, sobre todo teniendo en cuenta la mayor vulnerabilidad de los sistemas inmunitarios de los recién nacidos (Goldman 1999; Chao *et al.* 2004; Colles *et al.* 2008).

Debido a su alta estabilidad y carácter lipofílico, las dioxinas ingresan al cuerpo humano en conjunto con alimentos grasos como son la carne y la leche. Por tanto estos alimentos deben ser sometidos a controles rigurosos con el fin de salvaguardar la salud humana, sobre todo el control de contaminantes tal como son las dioxinas.

Debido a su complejidad y por el alto costo que implica la determinación de estos compuestos tóxicos, principalmente por el empleo de equipos de alta resolución como lo es la Cromatografía de Gases de Alta Resolución acoplada a la Espectrometría de Masas de Alta Resolución (HRGC/HRMS), solo algunos países industrializados han logrado el desarrollo de metodologías, así como la experiencia en la medición y análisis de dioxinas provenientes de diferentes fuentes. Posiblemente por esta razón en México existe poca información sobre dioxinas. Jiménez *et. al.* (2005) publicaron un trabajo sobre contaminantes organoclorados (incluyendo PCDDs/Fs), metales pesados y metaloides en aves de Baja California, reportando concentraciones para PCDDs y PCDFs de 21 pg/g para las jaulas de las palomas y de 7,7 pg/g para las heces de las palomas. Cañedo López y Macias Zamora (2007) publicaron una nota de investigación sobre PCDDs/PCDFs en peces de cuatro regiones diferentes de México, reportando que los peces de la zona de Pátzcuaro presentaron mayor

contenido de PCDD/PCDFs con un promedio de 0,3 pg PCDDs/PCDFs/g grasa peso húmedo. Sin embargo, no se han efectuado estudios acerca de la presencia de dioxinas, ni en matrices ambientales como el aire, agua, suelo o sedimento, ni alimentos como lo son la carne y la leche de vaca, siendo estos dos últimos objeto de estudio del presente trabajo de investigación.

Debido a la poca información que se tiene en México acerca de la presencia de estos contaminantes en la población, el ambiente o los alimentos, 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.

Por todo lo anterior, el presente trabajo de investigación se enfoca en el desarrollo, validación y aplicación de un método analítico económico y confiable para la determinación y cuantificación de dioxinas en carnes y leches que se consumen en el estado de Nuevo León, por medio de Cromatografía de Gases/Espectrometría de Masas de Baja Resolución (GC/LRMS). De este modo con esta técnica se podría iniciar el monitoreo de Dioxinas en México.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo general

Desarrollar, validar y aplicar un método analítico para la determinación y cuantificación de dioxinas en carnes y leches por Cromatografía de Gases/Espectrometría de Masas de Baja Resolución (GC/LRMS).

1.1.2 Objetivos específicos

1. Establecer un método analítico para la determinación y cuantificación de dioxinas por GC/LRMS.
2. Validar el método analítico establecido para la determinación y cuantificación de dioxinas por GC/LRMS.
3. Desarrollar un método de extracción de dioxinas en carnes y leches.
4. Validar el método analítico desarrollado para la determinación y cuantificación de dioxinas en carnes y leches por GC/LRMS.
5. Aplicar el método desarrollado en muestras de carnes y leches que se consumen en el Estado de Nuevo León.

1.2 HIPÓTESIS

El uso de Cromatografía de Gases acoplada a la Espectrometría de Masas de Baja Resolución (GC/LRMS) permitirá cuantificar niveles de Dioxinas en carnes y leches a nivel de picogramos.

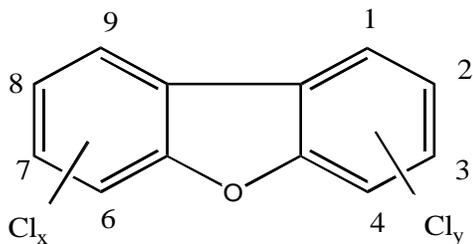
CAPÍTULO 2

ANTECEDENTES

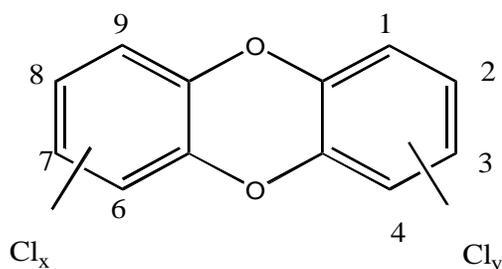
2.1 Definición y estructura química

Las dioxinas son contaminantes orgánicos persistentes (COPs) ampliamente dispersos en el medio ambiente y se encuentran acumuladas en alimentos grasos. El término “dioxinas” abarca dos clases de compuestos: las Policlorodibenzo-*p*-dioxinas (PCDDs) y los policlorodibenzofuranos (PCDFs), que engloban un total de 210 compuestos, 135 son PCDDs y 75 son 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) (UNEP, 1999; WHO, 2001; Huwe, 2002).

Dibenzofuranos policlorados (PCDFs)



Dibenzo-*p*-dioxinas policlorados (PCDDs)



(a)

$$x + y = 1 - 8$$

(b)

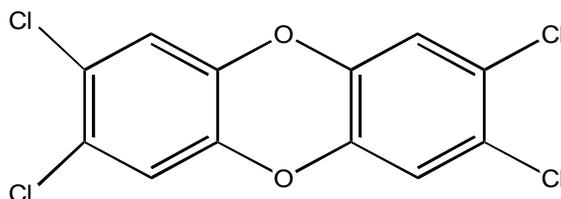


Figura 1. (a) Fórmula general de los PCDFs y las PCDDs.
(b) 2, 3, 7, 8 - Tetraclorodibenzo-*p*-dioxina (2, 3, 7, 8 - TCDD).

Cada uno de los anillos puede presentar diferentes grados de cloración, de manera que el número de átomos de cloro unidos a una molécula varía entre uno (monoclorados) y ocho (octaclorados), además los átomos de cloro pueden estar en diferentes posiciones de la molécula, denominándose *congéneres* a cada uno de estos isómeros. Se denomina *homólogo* al conjunto de congéneres que presentan el mismo grado de cloración. En la tabla I, se presenta el número de congéneres de cada homólogo de PCDDs y PCDFs.

Los compuestos que se consideran tóxicos son aquellos que se encuentran sustituidos en la posición 2, 3, 7, 8. Sólo 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 (TCDD) (figura 1b) (Baron *et al.* 2005).

Tabla I. Número de congéneres de PCDDs y PCDFs

| Homólogo | PCDDs | PCDFs |
|---------------------|--------------|--------------|
| <i>Monoclorado</i> | 2 | 4 |
| <i>Diclorado</i> | 10 | 16 |
| <i>Triclorado</i> | 14 | 28 |
| <i>Tetraclorado</i> | 22 | 38 |
| <i>Pentaclorado</i> | 14 | 28 |
| <i>Hexaclorado</i> | 10 | 16 |
| <i>Heptaclorado</i> | 2 | 4 |
| <i>Octaclorado</i> | 1 | 1 |
| <i>Total</i> | 75 | 135 |

Para nombrar cada uno de los diferentes congéneres se indica el nombre del homólogo precedido de los números que indican la posición de los átomos de cloro en la molécula. Las abreviaturas normalmente utilizadas para designar los distintos congéneres de las PCDDs y los PCDFs se resumen en la tabla II (Fernández *et al.* 2005).

Tabla II. Abreviaturas comúnmente utilizadas para PCDDs y PCDFs

| | |
|-----|-----------------------------------|
| D | Congénere de dibenzo-para-dioxina |
| F | Congénere de dibenzofurano |
| M | Monohalogenado |
| D | Dihalogenado |
| Tr | Trihalogenado |
| T | Tetrahalogenado |
| Pe | Pentahalogenado |
| Hx | Hexahalogenado |
| Hp | Heptahalogenado |
| O | Octahalogenado |
| CDD | Dibenzodioxina clorada |
| CDF | Dibenzofurano clorado |

2.2 Propiedades físico-químicas

La similitud estructural entre las dos familias de sustancias hace que los compuestos presenten también propiedades físico-químicas similares. En general, las PCDDs y los PCDFs son sólidos cristalinos e incoloros a temperatura ambiente que se caracterizan por una elevada estabilidad térmica y química, con puntos de fusión y ebullición relativamente elevados, estables en medio ácido y básico, e incluso frente a la acción de algunos agentes oxidantes (Abad, 1999). La solubilidad de estos compuestos en agua es muy baja y

disminuye con el grado de cloración, mientras que su solubilidad en disolventes orgánicos y lípidos aumenta con el grado de cloración, como lo demuestran los coeficientes de partición n-octanol/agua (K_{ow}). Esta marcada afinidad por los lípidos es la responsable de su acumulación en el tejido adiposo de los animales. En la tabla III se muestran las propiedades físicas más importantes de las dioxinas y furanos (Abad, 1999).

Tabla III. Propiedades físicas de PCDDs y PCDFs

| COMPUESTO | Punto Fusión (°C) | Punto Ebullición (°C) | Presión de Vapor (Pa) | Solubilidad (µg/L) | Log K_{ow} |
|-----------------------------|--------------------------|------------------------------|--|-----------------------------|--------------------------------|
| PCDDs (mono-octa) | 89-322 | 284-510 | 1.1×10^{-10} - 1.7×10^{-2} | 7.4×10^{-7} -417 | 4.3-8.2 |
| PCDFs (mono-octa) | 184-258 | 375-537 | 5×10^{-10} - 3.9×10^{-4} | 1.16×10^{-3} -14.6 | 5.4-8.0 |
| 2,3,7,8-TCDD | 305 | -- | 9.8×10^{-8} - 4.5×10^{-6} | 7.9×10^{-3} -0.317 | 6.8 |

Todas estas propiedades configuran un marco idóneo para considerar a estos compuestos como potenciales sustancias contaminantes altamente persistentes, capaces de experimentar fenómenos de bioacumulación y de acceder con relativa facilidad a los diferentes niveles de la cadena trófica. En la tabla IV se presenta un resumen de algunas de las propiedades físico-químicas más importantes de estos compuestos.

Tabla IV. Propiedades físico-químicas más importantes de PCDDs y PCDFs

- Elevado punto de fusión y de ebullición
- Baja presión de vapor
- 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

2.3 Fuentes de generación de PCDDs/PCDFs

Las dioxinas y furanos policlorados no han sido producidos por el hombre con finalidades comerciales, sino que son subproductos no deseados de diferentes procesos (Díaz, 2000; Fiedler, 1996; UNEP, 1999). En general las fuentes de PCDDs/PCDFs se agrupan en:

- **Fuentes primarias:** Corresponden a aquellos procesos en que se forman PCDDs/PCDFs. Principalmente son:

- *Procesos industriales relacionados con el cloro o fabricación de productos clorados:* En este grupo se incluye el blanqueo de la pulpa y pasta de papel con cloro y la producción de productos químicos organoclorados (clorofenoles, bifenilos policlorados, clorobencenos, etc.). En los últimos años, la emisión de

PCDDs/PCDFs por muchas de estas fuentes ha disminuido gracias a la sustitución de reactivos en los procesos, cambios en la tecnología utilizada y debido a la prohibición de fabricar algunos productos organoclorados.

- *Procesos térmicos:* En la actualidad constituyen la fuente de emisión principal de PCDDs/PCDFs en muchos países. Entre estos procesos se encuentran: la incineración de residuos (sólidos urbanos, clínicos, peligrosos y lodos de depuradora), la fabricación del acero, reciclaje de metales no ferrosos (aluminio, cobre, zinc, etc.), hornos de cementeras, producción de energía (calefacción con combustión de petróleo, carbón o madera, generación de electricidad en centrales eléctricas, etc.) y los incendios accidentales (de edificios, forestales, de equipos donde hay PCBs, etc.).
- *Procesos naturales:* Diversos autores (Oberg *et al.* 1992; Rappe, 1994) han demostrado la formación de PCDDs/PCDFs a partir de clorofenoles mediante las reacciones enzimáticas, tanto in vitro, como en lodos de depuradora. Sin embargo, la formación biológica es despreciable frente a los procesos industriales y térmicos (UNEP, 1999).

- **Fuentes secundarias:** Bajo este nombre se agrupan aquellas matrices en las que no se forman PCDDs/PCDFs pero que las acumulan a partir de otras fuentes y que pueden permitir su posterior incorporación al medio. Se incluyen

en este tipo los lodos de depuradora y compost, suelos y sedimentos contaminados, transformadores de corriente eléctrica que contengan bifenilos policlorados, etc.

2.4 Distribución de PCDDs/PCDFs en el medio ambiente

Los PCDDs/PCDFs presentan una gran estabilidad térmica y química, por lo que cuando entran en el medio ambiente, persisten en él durante mucho tiempo y se van distribuyendo por los diferentes ecosistemas, apareciendo en todo los niveles de éstos. A nivel global, puede decirse que se encuentran PCDDs/PCDFs en todas las zonas del planeta, incluso en áreas, como el Ártico o el Antártico, que están muy lejanas de cualquier foco emisor. Una posible explicación a este fenómeno es lo que se ha dado en llamar “efecto de destilación/fraccionamiento global” (Vallack *et al.* 1998), aplicable en general para cualquier contaminante orgánico persistente. Según esto, el contaminante tiende a volatilizarse en zonas tropicales y en las regiones templadas debido a su moderada volatilidad, mientras que se condensa y tiende a permanecer en las regiones más frías. Incluso se ha propuesto que la migración hacia latitudes mayores se realiza en avances relativamente cortos, en los que el contaminante migra, permanece y migra de nuevo, en función de los cambios de temperatura propios de cada estación de las latitudes medias. Por otra parte, cada COP tiene su propia “temperatura de condensación ambiental”, por lo que se produce un efecto de fraccionamiento a lo largo de la migración, los compuestos más volátiles tienden a permanecer en fase gas y por lo tanto migran más de prisa hacia las regiones polares en comparación con los COPs menos volátiles.

Debido a que estos compuestos son muy estables en condiciones ambientales y desde el momento en que son liberados en el medio ambiente, se ven sometidos a una serie de condiciones ambientales a través de las cuales pueden experimentar una gran variedad de procesos, dichos procesos involucran mecanismos de transporte y transformación que se describen a continuación.

2.4.1 Procesos de transporte

Estos implican mecanismos físicos o biológicos que dan lugar a transferencias entre diferentes sistemas, como aire-suelo, suelo-agua, etc.

- **Deposición atmosférica**

En este proceso las dioxinas y furanos se separan de la atmósfera y llegan al suelo. Puede presentarse deposición seca y húmeda. En la primera, los contaminantes adsorbidos en las partículas en suspensión llegan al suelo por sedimentación. En la segunda, el agua de lluvia los arrastra como consecuencia de la deposición de partículas (Fernández *et al.* 2005).

- **Volatilización**

Por medio de este mecanismo, las dioxinas y furanos pueden volver a la atmósfera desde el agua o el suelo. Al ser sustancias poco volátiles, se pueden presentar distintas distribuciones isoméricas en las fases vapor y sólido (Fernández *et al.* 2005).

- **Sedimentación**

Estas sustancias tienen baja solubilidad y alta tendencia a adherirse a las partículas, razón por la cual se encuentran en mayores proporciones en los sedimentos que en la fase acuosa (Fernández *et al.* 2005).

- **Erosión**

La erosión provocada por el aire, agua, etc. provoca el transporte de dioxinas y furanos que se encuentran unidos a las partículas del suelo (Fernández *et al.* 2005).

- **Lixiviación**

Mediante este mecanismo, las dioxinas y furanos contenidos en el suelo son solubilizados por corrientes de agua y transportados hasta las aguas subterráneas. Esta solubilización se produce por la interacción con la materia orgánica y partículas en suspensión que contiene el agua (Fernández *et al.* 2005).

- **Bioacumulación y bioconcentración**

La lipofilia y la baja solubilidad en agua que caracteriza a estas sustancias hacen que sean especialmente afines por los tejidos grasos de los seres vivos. Estas propiedades, además de conferirles resistencia a la degradación, favorecen su acumulación dentro de los organismos, pudiendo llegar a concentrarse en varios órdenes de magnitud con respecto al medio que los rodea (Fernández *et al.* 2005).

2.4.2 Procesos de transformación

Estos son procesos físicos, químicos o bioquímicos que implican la modificación de la estructura química de estos compuestos y que contribuyen a su degradación ambiental, aunque en periodos muy largos.

- **Fotólisis**

La fotólisis, a través de la luz solar, contribuye una vía importante de degradación de estos compuestos en el ambiente y es de gran trascendencia para las dioxinas y furanos contenidos en la atmósfera. Sin embargo, en agua y suelo la fotodegradación es menos importante. Algunos estudios han demostrado que a medida que disminuye el grado de cloración se acelera el proceso de fotodegradación de estos contaminantes (Fernández *et al.* 2005).

- **Biodegradación**

La degradación biológica se puede llevar a cabo por microorganismos o por organismos superiores. Se ha realizado diversos estudios para evaluar la magnitud de la degradación alcanzada por microorganismos y algunos animales. Sin embargo, se ha encontrado que el metabolismo de estas sustancias es muy lento (Fernández *et al.* 2005).

- **Degradación Química**

En condiciones de laboratorio se han forzado determinadas reacciones de sustitución de átomos de cloro por otros sustituyentes, pero esto es muy complicado en condiciones ambientales (Fernández *et al.* 2005).

2.4.3 Impacto ambiental

2.4.3.1 Atmósfera

La presencia de PCDDs/PCDFs en el aire se debe principalmente a los procesos de combustión y en menor grado a la evaporación de suelos y superficies. Estas sustancias se transportan fácilmente a través de la atmósfera a zonas lejanas. Finalmente a través de deposición seca o húmeda, acaban por depositarse en suelos o agua, con la posibilidad de afectar grandes extensiones. Los niveles de dioxinas y furanos son menores de 2 pg/m³ en zonas rurales remotas, oscila entre 2 y 15 pg/m³ en áreas urbanas y entre 15 y 120 pg/m³ en áreas cercanas a fuentes de generación. En los últimos años se han venido realizando determinaciones en diversos países como Alemania, Suecia, Holanda, Canadá y Estados Unidos. En México, se ha trabajado en la elaboración de inventarios con base a factores de emisión (Fernández *et al.* 2005).

2.4.3.2 Suelo

Las dioxinas y furanos llegan a los suelos por el vertimiento de residuos contaminados, aplicación de plaguicidas o por deposición atmosférica. Una vez depositados, son fuertemente retenidos por las partículas y se transportan

únicamente por erosión a través del viento y agua (Fernández *et al.* 2005). La deposición de estos contaminantes en pastizales es una de las principales vías de acceso a la cadena alimenticia, a través de los lácteos y la carne del ganado.

2.4.3.3 Agua

La contaminación de aguas superficiales puede deberse a la propia deposición atmosférica de las dioxinas y furanos o al vertido directo de efluentes industriales contaminados. La lixiviación de suelos también puede contribuir, aunque en menos grado, a la introducción de estas sustancias en aguas subterráneas. Una vez introducidas, tienden a acumularse en sedimentos y partículas en suspensión y de ahí transferirse a los organismos. Cabe señalar, que los peces pueden acumular hasta 10,000 veces las concentraciones ambientales (Fernández *et al.* 2005).

2.5 Vías directas e indirectas de dioxinas en los productos alimenticios

Las dioxinas pueden entrar de la alimentación animal a la cadena alimentaria humana a través de una ruta directa, indirecta o ambos. La ruta directa incluye: de aire a planta/suelo, de planta/suelo a animal y de agua/sedimento a pescado. Si nuevamente se produce o forma reservorio, las dioxinas se depositan en la vegetación, en el suelo y en los sedimentos de agua desde la atmósfera o a través de prácticas agrícolas de pesticidas, fertilizantes e irrigación y son retenidas en la superficie de las plantas, en el suelo circundante y los sedimentos en los cursos del agua. Se estima que el 5% del depósito aéreo de dioxinas en el ambiente terrestre son retenidos por plantas y los 95%

restantes llega al suelo. Por tanto, las dioxinas transmitidas por el suelo pueden ser fuente de reservorio que pueden llegar a plantas usadas como alimento animal por volatilización y redeposición o como polvo (Institute of Medicine of National Academies, 2003).

Las dioxinas pueden entrar al sistema acuático por vía directa de descarga en el agua, por deposición sobre el suelo y por escurrimiento de cuencas hidrográficas. Los animales acuáticos acumulan estos compuestos a través de contacto directo con el agua, partículas suspendidas y los sedimentos de fondo, y a través de consumo directo de otros organismos acuáticos.

Además de las vías de medio ambiente, las prácticas de la agricultura animal, pueden incorporar las vías indirectas de la exposición a dioxinas que conducen a la contaminación de los vegetales, las dietas de los animales y la fabricación de piensos para animales. Estas vías indirectas tienen el potencial para producir elevados niveles de dioxinas en los animales (Institute of Medicine of National Academies, 2003).

El medio ambiente como reservorio representa la fuente de mayor producción y depósito reciclable para las dioxinas (Institute of Medicine of National Academies, 2003)(figura 2). Como se indica en el proyecto de reevaluación de la EPA, hay una serie de fuentes que generan dioxinas (procesos químicos, procesos de incineración y otras actividades humanas) y la mayoría de ellas son almacenadas en los reservorios ambientales como el suelo y los

sedimentos. Las dioxinas son transportadas por vía atmosférica al forraje de los animales, piensos y pastos para la alimentación, a las verduras, frutas y cereales de consumo humano y a los animales terrestres y acuáticos consumidos por los seres humanos. La ruta de la exposición a través de verduras, frutas y cereales consumidos por los seres humanos es generalmente considerada una vía de menor importancia, pero, por la contaminación de la superficie del suelo puede aumentar la exposición. La atmósfera contaminada contamina a su vez los productos vegetales destinados a los animales, cuya carne, leche y productos derivados consume el ser humano. Por lo tanto la atmósfera es una fuente importante de contaminación por dioxinas (Fries, 1995; Turrio-Baldassarri *et al.* 2009).

Los animales acuáticos también constituyen una vía importante mediante la cual las dioxinas pueden ingresar a los seres humanos. Los organismos acuáticos pueden acumular niveles elevados de dioxinas por deposición atmosférica reciente o por depósito histórico de las dioxinas en los sedimentos o áreas terrestre de drenaje.

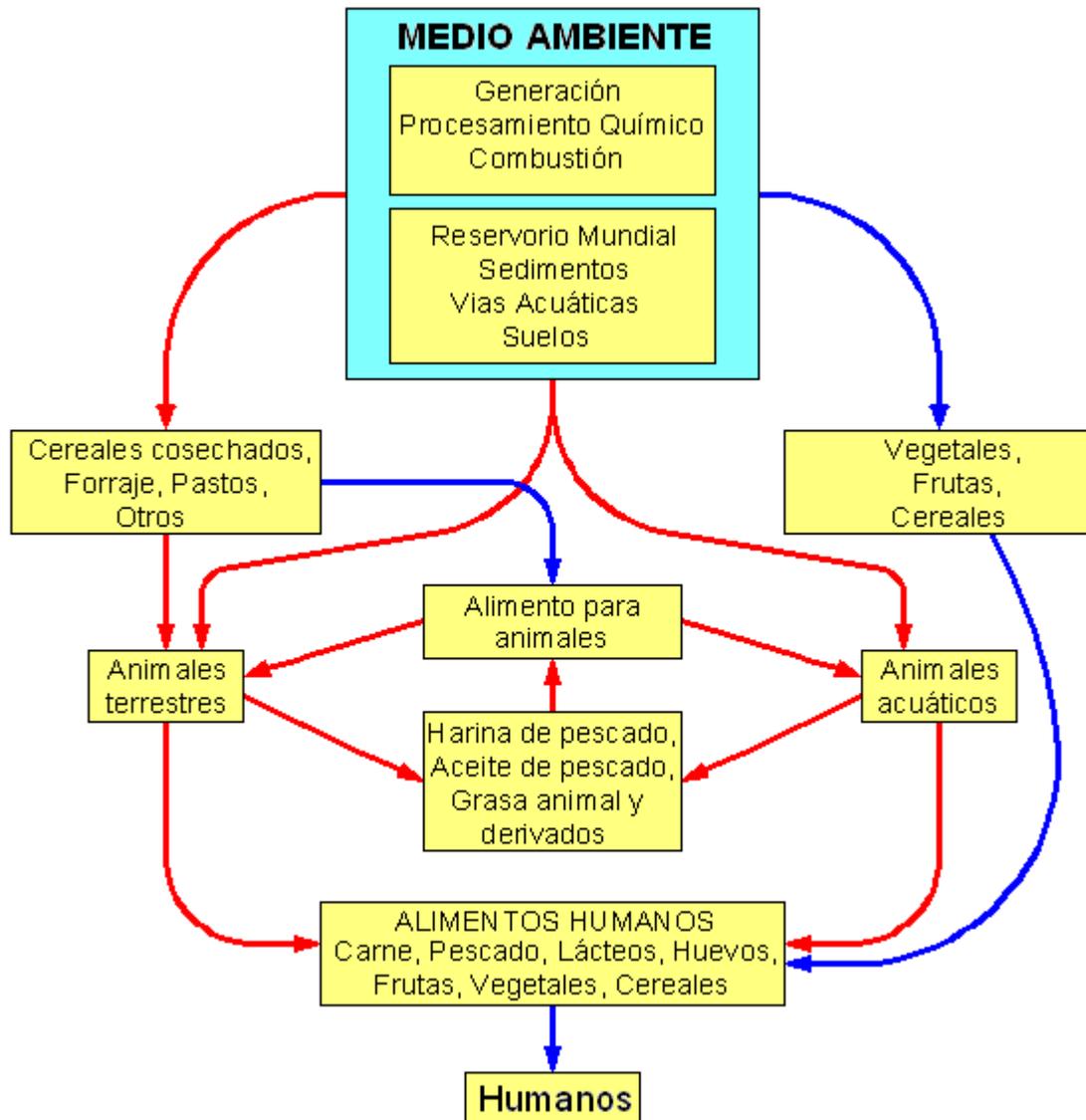


Figura 2. Vías principales de exposición a Dioxinas a través de alimentos. Las cajas representan fuentes puntuales en las vías y las flechas rojas representan las vías de mayor exposición a las dioxinas.

Como gran parte de los alimentos que consume el ser humano son de origen animal, por tanto se puede decir que dichos alimentos constituyen la vía principal de ingreso de dioxinas al cuerpo humano (Institute of Medicine of National Academies, 2003).

2.6 Principales vías de exposición a PCDDs y PCDFs en seres humanos

Existen tres vías preferentes de exposición en humanos a PCDDs y PCDFs: ingestión, contacto e inhalación (Roeder *et al.* 1998; Abad, 1999).

▪ Ingesta a través de la dieta

La principal ruta de exposición humana a PCDDs y PCDFs la constituye la ingestión de alimentos contaminados. Se podría decir, que la contaminación de los alimentos viene determinada principalmente por la presencia de dioxina en suelos, y de forma menos importante por la deposición de dioxinas que se encuentran en la atmósfera sobre las plantas. De modo que el consumo de alimentos de origen vegetal, así como los alimentos que proceden de animales, que a su vez se han alimentado de vegetales, conducen a un ingreso directo de estos contaminantes en el organismo humano. La Organización Mundial de la Salud (OMS), estimó que el 90% de los casos de exposición humana a las dioxinas se produce a través de la dieta, básicamente a través de productos de origen animal, y siempre está relacionado con el contenido lipídico del alimento (carne, pescado, productos lácteos y derivados) (Roeder *et al.* 1998; Galli *et al.* 1999, Fernández *et al.* 2004). Así mismo, la EPA también estimó que el 95% de

la exposición a humanos se produce a través de la dieta, con alimentos de origen animal ricos en grasa (GAO, 2002).

Debido a su alta estabilidad y carácter lipofílico, estos analitos ingresan al cuerpo humano en conjunto con alimentos grasos. La carne de bovino es rica en lípidos intramusculares, con un contenido graso que puede oscilar entre 2 y 15% (incluso a veces un 20%), este hecho explica que sea la carne de bovino una de las principales portadoras de dioxinas en la alimentación humana. Estudios señalan que la situación geográfica puede influir en la concentración de dioxinas en carne (Fiel *et al.* 1998).

Se han llevado a cabo muchos estudios para evaluar la ingesta humana diaria, los resultados señalan que los productos alimenticios de origen animal, entre ellos leche y productos lácteos, son contribuyentes prominentes de la ingesta de dioxinas. Estos resultados a menudo explican que no menos del 30% de la población en general está expuesta (Focant *et al.* 2003; Lundqvist *et al.* 2006).

La leche como alimento adquiere una importancia fundamental, por el hecho de que ésta va destinada en buena medida a categorías poblacionales más vulnerables a los efectos perniciosos de sustancias químicas dañinas, como son los niños. Por otra parte, el importante contenido graso de la leche materna, la convierte en un vehículo de transferencia de los contaminantes a la descendencia. Este hecho ha originado una especial preocupación, sobre todo

teniendo en cuenta la mayor vulnerabilidad de los sistemas inmunitarios de los recién nacidos (Goldman, 1999; Chao *et al.* 2004; Colles *et al.* 2008).

- **Contacto dérmico**

De entre las diferentes vías de exposición a PCDDs y PCDFs el contacto dérmico quizás sea la que contribuye en menor medida. Los casos de exposición por vía dérmica descritos casi siempre se han producido accidentalmente a consecuencia de actividades que implica el manejo o la manufactura de productos químicos que contienen PCDDs y PCDFs. Por otra parte, se ha observado que los efectos derivados de este tipo de exposición son más importantes en niños que en personas adultas (Abad, 1999).

- **Inhalación**

Las dioxinas y los furanos presentes en la atmósfera procedentes de diferentes focos de emisión pueden también acceder al metabolismo de los seres vivos a través de la respiración.

Al igual que ocurre con el contacto dérmico, la asimilación por el organismo de dioxinas y furanos por inhalación no es tampoco una vía de exposición que supone mayor riesgo, sin embargo hay que tener en cuenta que los niveles de estas sustancias en zonas urbanas pueden ser elevados si se compara con los existentes en zonas poco desarrolladas industrialmente. Se ha observado que aquellos lugares en los que el viento provenía de una zona en la cual se localizaba una incineradora de residuos urbanos sin un tratamiento de

depuración de gases adecuado presentaban los niveles más elevados de dioxinas en el aire, en consecuencia en estas zonas aumenta el riesgo de asimilación de estos compuestos por vía respiratoria (Abad, 1999; Fernández *et al.* 2005).

2.7 Toxicidad

Una de las principales razones para el estudio de las dioxinas y furanos es su elevada toxicidad. Inicialmente, los efectos tóxicos de estos compuestos fueron conocidos a través de diferentes accidentes y del estudio de enfermedades presentadas por trabajadores de algunas industrias de productos organoclorados (Bernes, 1998). Ejemplos de ellos son los accidentes de la planta de Monsanto (Nitro, Virginia, USA) en 1949, la muerte masiva de pollos en USA (1963) producida por la contaminación de la grasa de los piensos con pentaclorofenol, la exposición durante la guerra de Vietnam de vietnamitas y soldados americanos al Agente Naranja (Operación Ranch Hand), que contenía TCDD como subproducto, y las contaminaciones de aceite de arroz para el consumo humano con dioxinas, furanos y PCBs en los episodios de Yusho (Japón, 1968) y Yucheng (Taiwán, 1979). Uno de los incidentes más relevantes es el accidente sucedido en Seveso (Italia) en 1976, en el que se emitieron a la atmósfera alrededor de 250-300 g de 2,3,7,8-TCDD que afectaron una extensión de 15 km² y a unas 37,000 personas (WHO, 2001). Otro suceso acaecido fue el de Bélgica en 1999, contaminación con dioxinas y furanos de alimentos domésticos destinados al consumo humano, concretamente en pollos y huevos. La contaminación se debió a la ingesta de alimento balanceado

contaminado por aceites sintéticos que previamente habían sido empleados en transformadores eléctricos que posteriormente pasaban a formar parte de la grasa con que se elaboraba los alimentos balanceados (WHO, 2001). Todos estos eventos dieron impulso definitivo para realizar estudios no solo de las fuentes de producción sino también de los efectos que producían en animales y humanos.

Hoy en día muchos países controlan la presencia de dioxinas en alimentos, esto ha conducido a la detección temprana de la contaminación y ha impedido a menudo un impacto a mayor escala. Un ejemplo es la detección de concentraciones elevadas de dioxinas en la leche en 2004 en los Países Bajos, debido al uso de una arcilla en la producción de los piensos para animales. En otro incidente, se detectaron niveles elevados de dioxinas en la alimentación animal en los Países Bajos en 2006 y el origen estaba en la grasa contaminada utilizada en la producción de los piensos (OMS, 2010).

Algunos sucesos de contaminación por dioxinas han sido más importantes, con implicaciones más amplias en muchos países. Es así que en julio 2007, la Comisión Europea emitió una advertencia de salud a sus Estados miembros después de detectar altos niveles de dioxinas en un aditivo alimentario, goma guar, que se utiliza como espesante en pequeñas cantidades en la carne, productos lácteos, postres o productos delicatessen. La fuente era una goma guar de la India que estaba contaminada con pentaclorofenol (PCP), un

plaguicida que ya no está en uso. El pentaclorofenol contiene dioxinas como contaminantes (OMS, 2010).

2.7.1 Efectos tóxicos y mecanismo

Las dioxinas y furanos policlorados se han asociado a los siguientes efectos tóxicos en animales y/o humanos: cloracné (alteraciones de la piel debido a la exposición a productos organoclorados) ilustrado en el conocido caso de envenenamiento del presidente de Ucrania Víktor Yushchenko en 2003, cuyo rostro estaba desfigurado por cloracné, reducción de peso con notable disminución de masa muscular y tejido adiposo (wasting syndrome), atrofia del timo (órgano fundamental en el desarrollo del sistema inmunitario) e inmunotoxicidad (incrementándose así la susceptibilidad y la incidencia de enfermedades infecciosas), hepatotoxicidad, toxicidad reproductora (produciendo disfunciones en el sistema reproductor tanto machos como hembras), teratogenicidad, efectos negativos en el desarrollo de los individuos y carcinogenicidad (Weisglas-Kuperus *et al.* 2000; Bertazzi *et al.* 2001; Kogevinas, 2001; Bodner *et al.* 2003; Lim *et al.* 2004; WHO, 2001; Lundqvist *et al.* 2006).

La mayoría de estos efectos están relacionados con la interacción de las dioxinas y compuestos similares con un receptor citosólico celular, denominado receptor Ah (Aryl Hidrocarbonasa) (Díaz, 2000; Safe and Wormke, 2003). Este receptor, identificado por primera vez en 1976 por Poland en tejido hepático de

ratones, es una proteína intracelular que se une a las dioxinas y compuestos similares iniciando así el proceso que se describe en la figura 3.

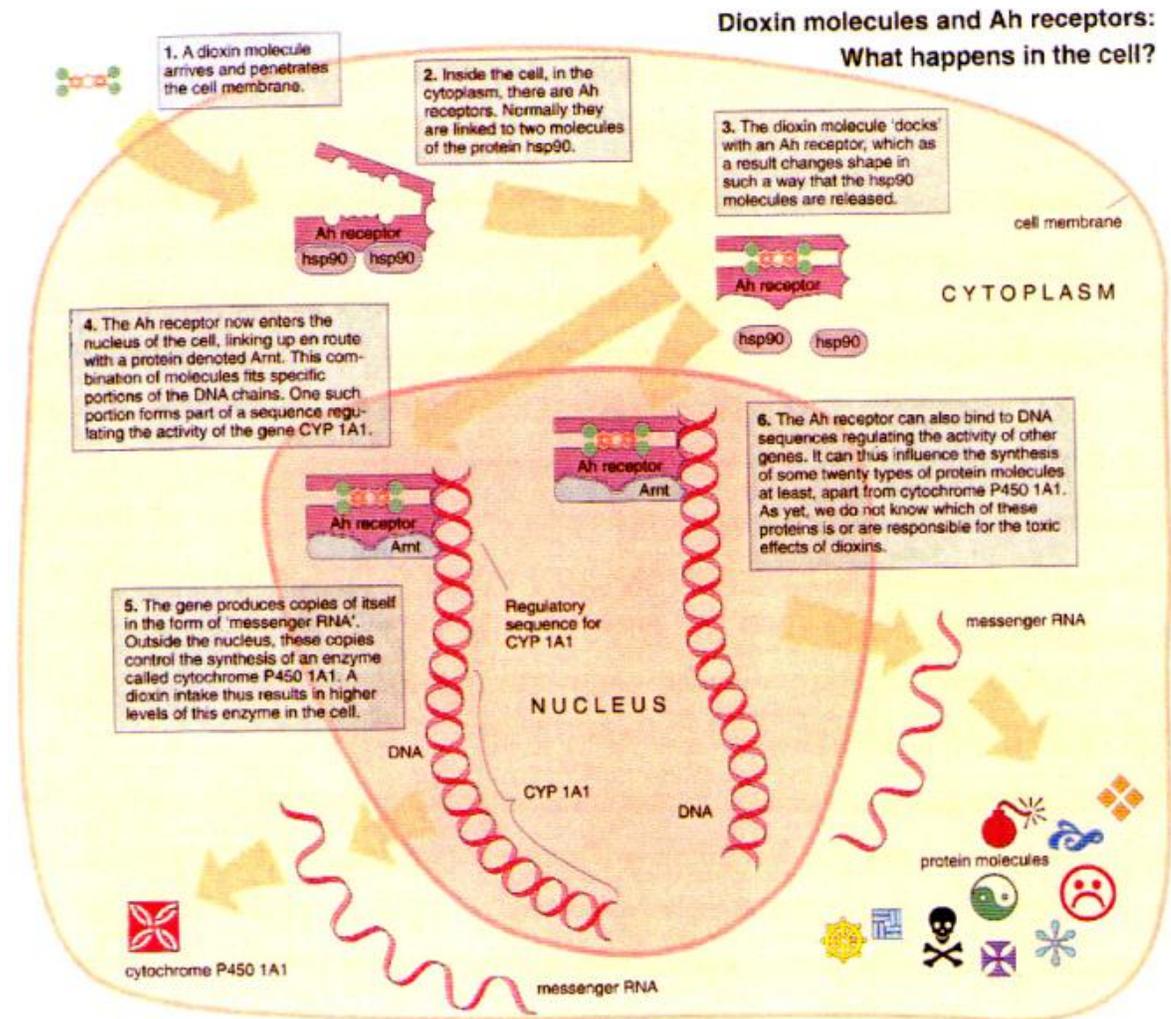


Figura 3. Esquema del proceso toxicológico que desencadenan las dioxinas a nivel celular iniciado con la unión al receptor Ah (reproducido de Bernes (1998), con permiso del autor)

En primer lugar, el compuesto es reconocido por el receptor, uniéndose a este, que pierde las dos unidades de proteína hsp90. Se produce entonces la entrada del complejo al núcleo, uniéndose en este proceso a otra proteína, denominada Arnt. En el núcleo celular, el complejo de dioxina-receptor.Arnt interacciona con una determinada secuencia de DNA (elementos reguladores de dioxina o

DRE), hecho que provoca un incremento en la síntesis de citocromo P450 1A1 y sus actividades monooxigenasa dependiente (7-etoxiresorufin O-deetilasa o EROD y aril hidrocarburo hidroxilasa o AHH). La medida del incremento de estas actividades se utiliza en muchas ocasiones como biomarcadores de exposición a dioxinas y compuestos similares.

Se conoce experimentalmente que el proceso descrito de unión al receptor Ah está directamente relacionado con mucho de los efectos tóxicos enumerados anteriormente, pero se desconocen los mecanismos exactos que los relacionan.

Sin embargo es conocido que cuanto mayor es la afinidad del compuesto por el receptor Ah, éste es tóxico a dosis más bajas. De los 210 compuestos que configuran las familias de dioxinas y furanos tan solo 17 presentan esta configuración (7 dioxinas y 10 furanos) y por tanto son los que presentan mayor interés desde un punto de vista toxicológico y ambiental. En los organismos que se sitúan dentro de los niveles altos de la cadena trófica, como aves, peces o mamíferos, los compuestos no sustituidos en las posiciones 2,3,7,8 se metabolizan rápidamente y son excretados vía heces u orina (Safe, 1990).

De los 17 compuestos que presentan átomos de cloro en las posiciones 2,3,7,8 no todos poseen la misma toxicidad. El que se ha revelado como más tóxico, y del cual se dispone a su vez más datos toxicológicos, es la tetracloro-p-dioxina. Por esta razón, la toxicidad de una mezcla de PCDDs y PCDFs 2,3,7,8 clorosustituidos se evalúa respecto a la 2,3,7,8-TCDD.

2.7.2 Carcinogenicidad.

Entre los efectos tóxicos de las dioxinas, la carcinogenicidad ha sido uno de los más estudiados. Aunque los efectos carcinogénicos de la 2,3,7,8-TCDD en animales parecen ser claros, la carcinogenicidad en humanos ha sido muy discutida hasta que en 1977 la Agencia Internacional para la Investigación sobre el Cáncer (IARC), perteneciente a la OMS, declaró a la 2,3,7,8-TCDD como perteneciente al grupo 1, donde se le considera como carcinógeno para humanos (UNEP, 1999; Jensen *et al.* 2001; Steenland *et al.* 2004).

La evaluación se llevó a cabo en una reunión de expertos de diferentes países, en Lyon, Francia, en Febrero de 1997; publicándose posteriormente la decisión y los datos en que se basaron para tomarla en el volumen 69 de las monografías de la IARC sobre la Evaluación de los Riesgos Carcinogénicos para los Humanos (IARC, 1997).

La evaluación de la carcinogenicidad en humanos se centró principalmente en aquellos estudios en que estaba correctamente descrita la exposición directa a la 2,3,7,8-TCDD y aquellos en que se había dado una elevada exposición a herbicidas probablemente contaminados con 2,3,7,8-TCDD. Por tanto, se consideraron sobre todo los datos provenientes de cuatro cohortes de productores de herbicidas (la NIOSH de Estados Unidos, la BASF y la Boehringer-Ingelheim de Alemania y la cohorte holandesa), la cohorte de residentes en el área contaminada por el accidente de Seveso (Italia) y la cohorte internacional de la IARC, que incluía datos de 16,863 hombres y 1,527

mujeres, de 10 países diferentes, que habían sido involucrados en la producción o utilización de herbicidas fenoxiácidos y clorofenoles.

En estos estudios, en los que la exposición había sido muy alta, se observa un incremento del riesgo de todos los cánceres combinados (cáncer del pulmón, linfoma del tipo no-Hodking, sarcoma de tejidos blandos, cáncer de hígado, cáncer de mama, cáncer testicular, cáncer del sistema digestivo, mieloma múltiple, cáncer de endometrio). Aunque este riesgo relativo no parece ser explicable debido a la confusión con otros agentes, esta posibilidad no puede descartarse. Se destaca también que la población general se encuentra expuesta a niveles mucho más bajos que los de las poblaciones industriales estudiadas (Bertazzi *et al.* 2001; Kogevinas, 2001; Bodner *et al.* 2003; Lundqvist *et al.* 2006).

El riesgo tiende a ser mayor para los trabajadores con una mayor exposición. Al realizar estudios de latencia se observó que existe mayor aumento de riesgo con el transcurso del tiempo a partir de la primera exposición. La evidencia más fuerte proviene de estudios de las personas cuya exposición es de dos o tres órdenes de magnitud más alta que la de la población en general. Con el fin de extrapolar a la población en general, los modelos deben ser utilizados, asumiendo efectos similares a dosis altas y bajas. En la actualidad, el verdadero dilema no es si las dioxinas son cancerígenas o no, sino más bien, el tamaño de los riesgos asociados a la exposición a concentraciones muy bajas, de la población en general (WHO, 2001).

2.7.3 Efectos de PCDDs yPCDFs sobre el sistema endocrino

El concepto de los disruptores endocrinos se ha creado para describir las sustancias químicas que afectan los niveles de los mediadores endocrinos, debido a que la hormona tiroidea es absolutamente vital para el desarrollo saludable del cerebro y de las hormonas sexuales, las cuales son esenciales en el control de los comportamientos específicos de género.

Tanto en la catástrofe de Seveso y la catástrofe del río Yucheng, una exposición local muy alta a las dioxinas, se encuentra relacionada a los cambios en la proporción de sexos de los hijos de padres expuestos. Los mecanismos aún no se conocen, pero se ha sugerido que los efectos perturbadores endocrinológicos de estos agentes en las hormonas sexuales podrían estar involucrados (Lundqvist *et al.* 2006).

Los estudios epidemiológicos también han demostrado un efecto en la maduración sexual, y se encontró que el retraso de la pubertad está asociado con la exposición a las dioxinas en el estado prenatal.

En la tabla V se muestran diversos efectos relacionados con la disrupción del sistema endocrino debido a la exposición a PCDDs/PCDFs (Díaz, 2000).

Tabla V. Efectos de los PCDDs/PCDFs como disruptores del sistema endocrino

| Población-Exposición | Efectos observados | Referencia |
|--|--|------------------------------|
| Trabajadores afectados por el accidente de BASF (1953), estudiados 35 años después. | Correlación positiva entre la concentración de TCDD y niveles de T ₄ y TBG. | Brucker-Davis, 1998 |
| Estudio no sistemático sobre la salud de veteranos del Vietnam. | No parece haber un incremento de enfermedades tiroideas en soldados expuestos respecto al grupo control. | Brucker-Davis, 1998 |
| Descendencia de ratas gestantes expuestas a dosis bajas de 2,3,7,8-TCDD (50 ng/kg peso). | Disminución de la longitud fálica y disminución del tamaño de la próstata. Se atribuye estas disfunciones a cambios en los niveles de dihidrotestosterona. | Ohsako <i>et al.</i> 1999 |
| 1500 adolescentes de Samara (Rusia), zona fuertemente contaminada con PCDDs/PCDFs. | Aumento de la frecuencia de criptorquidia respecto al grupo normal. No se observaron alteraciones de los niveles de LH, FSH, testosterona y cortisol. | Goncharov <i>et al.</i> 1999 |
| 51 hombres de Samara (Rusia), zona fuertemente contaminada con PCDDs/PCDFs. | Niveles hormonales normales, pero se detectan morfologías patológicas en los espermatozoides seminales. | Goncharov <i>et al.</i> 1999 |
| Descendencia de animales expuestos durante la gestación. | Alteraciones en el desarrollo de las gónadas, demasculinización de los machos. | Brouwer <i>et al.</i> 1999 |

T₄: tiroxina; TBG: globulina de unión a tiroxina; LH: hormona luteinizante; FSH: hormona estimulante folicular; criptorquidia: ausencia de uno o de ambos testículos en las bolsas escrotales debido a la detención de los mismos en el abdomen o en el conducto inguinal en su emigración normal.

En general, los estudios se centran básicamente en los efectos sobre los niveles hormonales tiroideo y en los efectos que producen sobre el sistema reproductor, debido a la disrupción hormonal, tanto en humanos como en animales. En algunos estudios la exposición a 2,3,7,8-TCDD muestran aumentos de T₄, mientras que en otros muestran disminución. En cuanto al sistema reproductor, se observan alteraciones de diferentes tipos. Sin embargo, en general, se considera que todavía es necesario efectuar muchos más

estudios que permitan establecer claramente si existe o no relación causal entre la exposición a PCDDs/PCDFs, sobre todo a niveles de fondo, y las alteraciones observadas (Brouwer *et al.* 1999). Lim en 2004, en un estudio realizado en cuatro escenarios (sangre de población directa, leche materna, sangre de trabajadores de incineradores y sangre de pobladores vecinos a los incineradores), reportó que el riesgo para disfunciones reproductivas por exposición a dioxinas no fue excepcionalmente alto en ninguno de los 4 escenarios (Lim *et al.* 2004). En este sentido, las principales dificultades se centran en que la exposición no es a un único producto sino a mezclas de gran cantidad de ellos, todos a niveles de fondo, y que los efectos que producen en muchos casos son muy sutiles y, por tanto, difíciles de establecer (Lundqvist *et al.* 2006).

2.7.4 Inmunotoxicidad

Se ha observado inmunosupresión inducida por TCDD en varias especies de animales de experimentación, incluyendo roedores, cobayos, conejos y primates no humanos. Varios tejidos y células del sistema inmunológico son atacados por la TCDD. Se ha observado atrofia del timo inducida por TCDD después de la exposición perinatal en todas las especies examinadas (WHO, 2001).

En un estudio realizado en niños en Holanda, se concluyó que niños en edad preescolar con antecedentes de exposición prenatal a dioxinas y expuestos

durante la infancia exhiben una mayor susceptibilidad a enfermedades infecciosas (Weisglas-Kuperus *et al.* 2000).

2.7.5 Absorción, distribución, biotransformación y excreción

La grasa es absorbida eficientemente por el tracto gastrointestinal, de modo que las dioxinas administradas en una matriz grasa pueden pasar fácilmente a la sangre. Experimentos en ratas mostraron 90% de absorción de 2,3,7,8-TCDF después de una administración oral de una dosis única de una mezcla de etanol: aceite vegetal 1:1 y una absorción de 70-85% de 2,3,4,7,8-PeCDF.

En contraste con la 2,3,7,8 TCDD y TCDF, la OCDF se absorbió pobremente, 2-15% de una administración por sonda de una mezcla de aceite de maíz y ortodibenceno 1:1. Por otra parte, se encontró que la absorción de 1,2,3,7,8-PeCDD, administrada oralmente, variaba desde 19 hasta 71%. La absorción en matrices complejas es menor, tal como de la dieta. Solo el 50-60% de una dosis de TCDD de la dieta fue absorbida. En un estudio realizado con un voluntario, se le administró oralmente TCDD en aceite de maíz y se observó que más del 87% fue absorbido. Esta cifra es comparable con una absorción casi total de dioxinas y furanos por los lactantes de leche materna (WHO, 2001).

Después de su absorción en el tracto gastrointestinal, las dioxinas entran a la sangre en forma de quilomicrones. Una vez en la sangre se unen a las lipoproteínas y desde allí se transportan y se depositan en los tejidos grasos, hígado y leche materna. La absorción de dioxinas y furanos, de acuerdo a lo

señalado anteriormente, varía según el medio de administración, el compuesto específico y que la exposición sea a través de boca, piel o pulmones. En general la absorción es mayor cuando se ingieren que cuando se aplican a la piel, sobre la absorción pulmonar hay pocos datos aunque se piensa que es alta.

La metabolización dura varios años y la eliminación se hace principalmente en la leche materna y en las heces y necesita de la transformación metabólica a derivados polares.

La vida media de la 2,3,7,8-TCDD en el hombre se estima entre 5.1 y 11.3 años, según IARC 1977, citado en el informe del SCF (Comité Científico Europeo de Alimentos) en Mayo 2001. Se encontró una vida media de 8.2 años en las víctimas del accidente de Seveso y de 8.6 años en extrabajadores de plantas químicas. Sin embargo para el correspondiente furano es de 1 a 2 años (Gorrachategui, 2001; WHO, 2001). Esto indica que la TCDD es la de mayor permanencia en el organismo.

2.8 Factor de Equivalencia Tóxica

La toxicidad de las dioxinas difiere considerablemente de unos a otros congéneres las más tóxicas son las que han sido sustituidas en la posición 2,3,7,8. Así de todas las dioxinas, 17 tienen importancia toxicológica. El compuesto más tóxico es la 2,3,7,8-TCDD.

Para facilitar la comparación de datos analíticos de los 17 congéneres y referirlos siempre a su grado de toxicidad se convierten los resultados para expresarlos como “Equivalentes Tóxicos” (TEQ, por sus siglas en inglés: Toxic Equivalent Quantitated).

Esta conversión está basada en asumir que todos los congéneres muestran similares efectos cualitativos pero con intensidades diferentes. La distinta actividad se expresa con los Factores de Equivalencia Tóxica (TEF, por sus siglas en inglés: Toxic Equivalency Factor), que es la relación entre la toxicidad del congénere implicado frente a la del compuesto más tóxico, la 2,3,7,8-TCDD, a la que se ha asignado el valor de 1 (Van Der Berg, 1998). La multiplicación de la cantidad de cada congénere en la muestra por su valor TEF nos da el valor TEQ.

Los valores TEF más usados para las dioxinas fueron los propuestos por NATO/CCMS en 1988 como Factor de Equivalencia Tóxica Internacional o I-TEF (Bottimore *et al.* 1990), estos valores se muestran en la tabla VI. Sin embargo, ante la necesidad de establecer valores únicos de TEF, en 1997 la Organización Mundial de la Salud (WHO) reevaluó y revisó los Factores de Equivalencia Tóxica para humanos y se establece los WHO-TEF. Los valores WHO-TEF de la distribución de riesgo para humanos se presentan en la tabla VI (Van Der Berg, 1998).

Tabla VI. Factores de Equivalencia Tóxica de los PCDDs/PCDFs propuestos por NATO (I-TEF) y la WHO (WHO-TEF)

| COMPUESTO | ABREVIATURA | I-TEF | WHO-TEF |
|--|-----------------------------|-------|---------|
| <i>Policlorodibenzo dioxinas</i> | | | |
| 2, 3, 7, 8 – Tetraclorodibenzodioxina | 2, 3, 7, 8 – TCDD | 1 | 1 |
| 1, 2, 3, 7, 8 – Pentaclorodibenzodioxina | 1, 2, 3, 7, 8 – PeCDD | 0.5 | 1 |
| 1, 2, 3, 4, 7, 8 – Hexaclorodibenzodioxina | 1, 2, 3, 4, 7, 8 – HxCDD | 0.1 | 0.1 |
| 1, 2, 3, 6, 7, 8 – Hexaclorodibenzodioxina | 1, 2, 3, 6, 7, 8 – HxCDD | 0.1 | 0.1 |
| 1, 2, 3, 7, 8, 9 – Hexaclorodibenzodioxina | 1, 2, 3, 7, 8, 9 – HxCDD | 0.1 | 0.1 |
| 1, 2, 3, 4, 6, 7, 8 – Heptaclorodibenzodioxina | 1, 2, 3, 4, 6, 7, 8 – HpCDD | 0.01 | 0.01 |
| Octaclorodibenzodioxina | OCDD | 0.001 | 0.0001 |
| <i>Policlorodibenzo furanos</i> | | | |
| 2, 3, 7, 8 – Tetraclorodibenzofurano | 2, 3, 7, 8 – TCDF | 0.1 | 0.1 |
| 1, 2, 3, 7, 8 – Pentaclorodibenzofurano | 1, 2, 3, 7, 8 – PeCDF | 0.05 | 0.05 |
| 2, 3, 4, 7, 8 – Pentaclorodibenzofurano | 2, 3, 4, 7, 8 – PeCDF | 0.5 | 0.5 |
| 1, 2, 3, 4, 7, 8 – Hexaclorodibenzofurano | 1, 2, 3, 4, 7, 8 – HxCDF | 0.1 | 0.1 |
| 1, 2, 3, 6, 7, 8 – Hexaclorodibenzofurano | 1, 2, 3, 6, 7, 8 – HxCDF | 0.1 | 0.1 |
| 2, 3, 4, 6, 7, 8 – Hexaclorodibenzofurano | 2, 3, 4, 6, 7, 8 – HxCDF | 0.1 | 0.1 |
| 1, 2, 3, 7, 8, 9 – Hexaclorodibenzofurano | 1, 2, 3, 7, 8, 9 – HxCDF | 0.1 | 0.1 |
| 1, 2, 3, 4, 6, 7, 8 – Heptaclorodibenzofurano | 1, 2, 3, 4, 6, 7, 8 – HpCDF | 0.01 | 0.01 |
| 1, 2, 3, 4, 7, 8, 9 – Heptaclorodibenzofurano | 1, 2, 3, 4, 7, 8, 9 – HpCDF | 0.01 | 0.01 |
| Octaclorodibenzofurano | OCDF | 0.001 | 0.0001 |

En consecuencia encontraremos los TEQ expresados como:

1. I-TEQ (NATO/CCMS)
2. WHO-TEQ

Hoy en día todos los resultados se expresan como WHO-TEQ, de modo que se usarán solo los valores de WHO-TEF para expresar los resultados de las concentraciones de PCDDs/Fs en este trabajo.

2.9 Legislación

La OMS estimó que el 90% de los casos de exposición humana a las dioxinas se da a través de la ingesta de alimentos contaminados de origen animal, de los cuales las fuentes predominantes son carnes, pescados y productos lácteos (WHO, 1998; Lundqvist *et al.* 2006).

Las dioxinas son compuestos indeseables y contaminantes no intencionados en el suministro de alimentos, la ingesta a través de la dieta es la principal vía de exposición a las dioxinas. Reduciendo la exposición dietética a las dioxinas entre los segmentos más vulnerables de la población como lo son las mujeres embarazadas, los infantes y las niñas jóvenes, se establece una estrategia efectiva para reducir la carga corporal en las generaciones futuras. La exposición a las dioxinas a través de los alimentos puede ser minimizada seleccionando variedades bajas en grasa de carnes y productos lácteos. El consumo de todos los alimentos, incluyendo pescados grasos, en cantidades recomendadas es congruente con el objetivo de reducir la exposición por ingesta de dioxinas y así mantener una buena salud (Yaktine *et al.* 2006). Además, debido a 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 la última década instituciones internacionales muy reconocidas como: OMS, IARC, Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos (USEPA), Comité de Alimentos de la Comisión Científica Europea (EC-SCF) entre otras, han llevado a cabo amplios estudios de la evaluación de riesgo relativo a PCDDs/Fs. Como resultado de estos estudios se ha establecido la ingesta diaria tolerable (TDI). En 1998 la OMS ha propuesto la reducción de la TDI de 1 - 10 pg TEQ/kg peso corporal/día a 1- 4 pg TEQ/kg peso corporal/día. Por otro lado, la Agencia de Sustancias Tóxicas y Registro de Enfermedades de los Estados Unidos (U.S. ATSDR) acepta 1 pg TEQ/kg peso corporal/día como el Mínimo Nivel de Riesgo (MRL) (WHO, 1998; Larsen *et al.* 2000; Van Leeuwen *et al.* 2000; Fernández *et al.* 2004).

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.

En la tabla VII se muestra los límites máximos de dioxinas en diferentes alimentos permitidos por la Comunidad Europea, expresados en equivalentes tóxicos de la Organización Mundial de la Salud (WHO-TEQ), para lo cual se ha empleado los WHO-TEF (Commission Regulation 199/2006/EC).

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 VII. Contenidos máximos de dioxinas y furanos en alimentos.

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

Hoy en día, muchos países como Estados Unidos, Alemania, Francia, España y China están regulando la ingesta de estos compuestos a través de programas de control exhaustivo para identificar y reducir las vías de exposición (Huwe *et al.* 2005; Li *et al.* 2006; Gies *et al.* 2007; Tard *et al.* 2007; Martí-Cid *et al.* 2008).

2.10 Convenio de Estocolmo

En mayo de 2001, en Estocolmo, Suecia, un total de 127 países adoptaron un tratado de las Naciones Unidas para prohibir o minimizar el uso de doce de las sustancias más tóxicas, consideradas causantes de cáncer y defectos congénitos en personas y animales. Las sustancias COP objeto de este convenio incluyen 9 plaguicidas, entre ellos el DDT y el hexaclorobenceno (que ha sido usado como plaguicida, pero que también es un producto secundario de la combustión), un producto industrial y dos subproductos de diversos procesos de combustión, incluyendo los incendios accidentales de basura y materiales plásticos: **las dioxinas y los furanos** (tabla VIII) (Fernández *et al.* 2005).

El objetivo del Convenio de Estocolmo es eliminar o restringir la producción y uso de los Contaminantes Orgánicos Persistentes que se fabrican intencionalmente. Además, se busca minimizar la generación de los contaminantes producidos de manera no intencional como las dioxinas y furanos. El Convenio de Estocolmo entró en vigor el 17 de mayo de 2004 contando con 151 países signatarios y 76 países miembros. México firmó este convenio el 23 de mayo de 2001 y lo ratificó el 10 de febrero de 2003 (Fernández *et al.* 2005).

Tabla VIII. Compuestos Orgánicos Persistentes listados en el anexo del Convenio de Estocolmo

| PLAGUICIDAS | PRODUCTOS INDUSTRIALES | PRODUCTOS SECUNDARIOS NO INTENCIONALES DE PROCESOS INDUSTRIALES O COMBUSTION |
|-------------------------------------|---------------------------------------|--|
| Aldrina ^a | Bifenilos Policlorados ^{a,c} | Dioxinas ^c |
| Clordano ^a | | Furanos ^c |
| DDT ^b | | |
| Dieldrina ^a | | |
| Endrina ^a | | |
| Heptacloro ^a | | |
| Hexaclorobenceno (HCB) ^a | | |
| Mirex ^a | | |
| Toxafeno ^a | | |

- a. Listado en el Anexo A del Convenio (sustancias propuestas para su eliminación).
- b. Listado en el Anexo B del Convenio (sustancias propuestas para uso restringido).
- c. Listado en el Anexo C del Convenio (sustancias propuestas para reducir sus emisiones por el uso de la mejor tecnología disponible).

El convenio establece una serie de compromisos y oportunidades para los signatarios, entre las que se incluyen: designar un punto focal nacional, brindar asistencia técnica a otros países que lo requieran, promover la participación pública y la difusión de información y llevar a cabo actividades de investigación, desarrollo y monitoreo.

Entre las principales actividades comprometidas por México dentro de la Convención de Estocolmo se tienen:

1. medidas para reducir o eliminar la liberación derivada de la producción y utilización intencionales de COP

2. prohibir y/o adoptar las medidas jurídicas y administrativas necesarias para eliminar su producción y utilización; así como sus importaciones y exportaciones
3. restringir su producción y utilización
4. vigilar que para un producto químico COP para el cual esté en vigor una exención específica para su producción o utilización con una finalidad aceptable, se tengan en cuenta las disposiciones de los instrumentos internacionales de consentimiento fundamentado previo existentes
5. adoptar medidas para reglamentar nuevos plaguicidas o nuevos productos químicos industriales, con el fin de prevenir la generación de COP
6. implementar medidas para reducir o eliminar las liberaciones derivadas de existencias y desechos con el fin de garantizar que se proteja la salud humana y el medio ambiente (Fernández *et al.* 2005).

En México, para ir dando cumplimiento con los compromisos del Convenio, el Instituto Nacional de Ecología (INE) a través de la Dirección General del Centro Nacional de Investigación y Capacitación Ambiental (DGCENICA), en conjunto con la Comisión para la Cooperación Ambiental (CCA), han venido trabajando en el inventario de emisiones y realizando talleres y foros sobre Contaminantes Orgánicos Persistentes, especialmente sobre Dioxinas y Furanos. En el III Foro de Investigaciones sobre compuestos persistentes en México realizado en Mayo de 2008, se dio a conocer el inicio de operación de la Red Mexicana de Monitoreo de Dioxinas y Furanos en aire ambiente, cuyo objetivo es generar

información sobre los niveles de fondo de dioxinas y furanos en aire ambiente en diferentes regiones geográficas de México, con el fin de brindar elementos para la toma de decisiones para reducir, controlar y eliminar las emisiones de dioxinas y furanos. Para el inicio de este estudio se seleccionaron 8 sitios para niveles de fondo y 1 de referencia urbana. El muestreo se realizó en 4 momentos por año, de marzo 2008 a marzo 2010. Los análisis de estos dos primeros años se efectuaron en Estados Unidos en la EPA, debido a que todavía no se cuenta con la infraestructura necesaria ni personal especializado en el análisis de estos contaminantes. A partir de los resultados obtenidos se tomará las decisiones señaladas en el objetivo de este estudio.

2.11 Dioxinas en México

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

Debido a su complejidad y por el alto costo que implica la determinación de estos compuestos tóxicos, solo algunos países industrializados han logrado el desarrollo de metodologías y la experiencia en la medición y análisis de concentraciones de dioxinas y furanos provenientes de las diferentes fuentes.

En México existe poca información sobre dioxinas. Jiménez *et al.* publicaron en 2005 un trabajo sobre contaminantes organoclorados (incluyendo PCDDs/Fs), metales pesados y metaloides en aves de Baja California, reportando

concentraciones para PCDDs y PCDFs de 21 pg/g para las jaulas de las palomas y de 7,7 pg/g para las heces de las palomas. Cañedo López y Macias Zamora publicaron en 2007 una nota de investigación sobre PCDDs/PCDFs en peces de cuatro regiones diferentes de México, reportando que los peces de la zona de Pátzcuaro presentaron mayor contenido de PCDD/PCDFs con un promedio de 0,3 pg PCDDs/PCDFs/g grasa peso húmedo. Sin embargo, todavía no se han efectuado investigaciones de la presencia de dioxinas y furanos, ni en matrices ambientales como el aire, agua, suelo o sedimento, ni alimentos como lo es la carne y la leche pasteurizada de vaca, siendo estos dos alimentos objeto de estudio de la presente tesis doctoral. Además, en México no se ha establecido un método analítico que permita conocer los niveles de dioxina en las matrices mencionadas. 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.

2.12 Carne

El ser humano es omnívoro y consume alimentos tanto de origen animal como origen vegetal desde que históricamente puede recordarse. Los alimentos procedentes de los productos animales representan fuentes ricas de muchos de los nutrientes requeridos por el ser humano especialmente proteínas.

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).

De acuerdo a la Norma Mexicana la carne está definida como la estructura compuesta 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. 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. La composición de los cortes de carne variará de acuerdo con su cantidad relativa de grasa y de carne magra, en la tabla IX se presenta una composición aproximada de la mayoría de carnes (Badui, 2006).

Tabla IX. 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 |

En el 2007 en Nuevo León se produjeron 38, 899 Tn de carne de bovino. Hoy en día Nuevo León ocupa el lugar 20 en la producción nacional de bovino y registra el consumo per cápita de carne de res más alto del país, el consumo per cápita anual nacional es de 21 Kg y el de Nuevo León de 37 Kg (Diagnóstico del Sector Agropecuario y Acuícola del Estado de Nuevo León, Sep. 2008).

Debido al carácter lipofílico de las dioxinas y siendo la carne de bovino rica en materia grasa, es necesario su control en cuanto al contenido de este analito, ya que la carne bovina es muy consumida por su aporte nutricional sobre todo por las proteínas.

2.13 Leche

La leche se define como el producto obtenido de la secreción de las glándulas mamarias de las vacas, sin calostro el cual debe ser sometido a tratamientos

térmicos u otros procesos que garanticen la inocuidad del producto; además puede someterse a otras operaciones tales como clarificación, homogeneización, estandarización u otras, siempre y cuando no contaminen al producto y cumpla con las especificaciones de su denominación (NOM-155-SCFI-2003).

Leche pasteurizada es la que ha sido sometida al proceso de pasteurización, estandarizada o no. Pasteurización es tratamiento térmico al que se somete la leche, fórmula láctea o el producto lácteo combinado, consistente en una relación de temperatura y tiempo que garantice la destrucción de organismos patógenos y la inactivación de algunas enzimas de los alimentos (NOM-155-SCFI-2003).

La leche de vaca varía en composición dependiendo de muchos factores, como la raza, la variabilidad animal, la edad, la fase de lactación, la estación del año, la alimentación, el tiempo de ordeño, el periodo de tiempo entre ordeños, las condiciones fisiológicas (incluido el que la vaca esté tranquila o nerviosa) y el que reciba medicación o no. Todos estos factores afectan también a la calidad de la leche. Debido a estas fuentes de variación, es muy raro que coincidan exactamente los valores que se dan para la composición de la leche en la bibliografía. No obstante, es útil recordar la composición aproximada de la leche de vaca, ya que la mayoría de la que es comercializada contiene una mezcla de las procedentes de varias granjas y las variaciones tienden así a un término

medio. La composición aproximada de la leche de mezcla se muestra en la tabla X (Potter, 2007).

Tabla X. Composición aproximada de la leche de vaca.

| Constituyentes | % |
|--------------------------------|-------|
| Agua | 87.1% |
| Grasa | 3.9% |
| Proteína | 3.3% |
| Lactosa (Azúcares de la leche) | 5.0% |
| Cenizas | 0.7% |

SAGARPA reportó que la producción de leche en México en el 2008 ascendió a 10 mil millones 600 mil litros, de los cuales en Nuevo León se produjo 39,909 litros y la Región Lagunera 2,255,272 litros (SIAP, 2008).

La leche es el único alimento que puede consumirse en estado líquido o bien como materia transformada en una extensa variedad de productos elaborados.

Por sus propiedades nutritivas se considera un alimento especialmente importante para la infancia. Es así que la leche como alimento adquiere una importancia fundamental, dado el hecho de que ésta va destinada en buena medida a categorías poblacionales más vulnerables a los efectos perniciosos de sustancias químicas dañinas, como son los niños. Por otra parte, el importante contenido graso de la leche materna, la convierte en un vehículo de transferencia de los contaminantes a la descendencia. Este hecho ha originado

una especial preocupación, sobre todo teniendo en cuenta la mayor vulnerabilidad de los sistemas inmunitarios de los recién nacidos (Goldman 1999; Chao *et al.* 2004; Colles *et al.* 2008).

Debido a las características nutricionales de la leche, y tomando en cuenta el segmento poblacional al que va destinado, este alimento debe ser sometido a controles rigurosos con el fin de salvaguardar la salud humana, sobre todo en el control de contaminantes tal como son las Dioxinas que son altamente persistentes, liposolubles y bioacumulables.

Por tanto, es muy importante la vigilancia del gobierno de Nuevo León en cuanto a Dioxinas en carnes y leche se refiere.

2.14 Metodología

A nivel internacional existe un gran interés en la determinación de PCDDs y PCDFs tanto en alimentos como en el medio ambiente, por el alto riesgo de exposición a estos tóxicos cancerígenos. Sin embargo el problema del análisis de dioxinas es bastante complejo debido a que:

1. Se encuentran a niveles muy bajos, lo que conlleva las dificultades propias de los análisis de trazas.
2. En las muestras se encuentran otros compuestos que pueden interferir en el análisis de las dioxinas.

3. La toxicidad de los 17 congéneres 2,3,7,8-clorosustituidos obliga a la determinación de éstos con una elevada exactitud y precisión.

Por tanto, los métodos desarrollados para analizar PCDD/F deben caracterizarse por una alta sensibilidad, selectividad, especificidad y exactitud. Para cumplir con estas características en el presente trabajo se ha tomado como modelo el método EPA 1613 (USEPA, 1994b). Las etapas fundamentales de esta metodología son:

- 1) Toma de muestra.
- 2) Extracción.
- 3) Purificación y fraccionamiento.
- 4) Separación y detección por HRGC/HRMS.

2.14.1 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). La Comisión 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. En cuanto a la muestra de leche, para lo que se supone una distribución homogénea de los contaminantes como son las dioxinas en un lote determinado, bastará con

tomar 1 envase cuando el número de envases del lote son de 1 a 25, o 2 envases cuando el número son de 26 a 100 (Comisión Directiva 2002/69/CE).

2.14.2 Extracción

El método de extracción aplicado para el análisis de dioxinas depende también del tipo de muestra. Se recomienda extracción con soxhlet para muestras sólidas o la extracción líquido-líquido en el caso de muestras acuosas.

2.14.3 Purificación y Fraccionamiento

Las etapas de purificación y fraccionamiento (cleanup) 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 $AgNO_3$. Es importante destacar que se permite utilizar cualquier otra técnica de purificación o fraccionamiento siempre y cuando se pueda demostrar que se puede obtener extractos con correctas recuperaciones de PCDD/F y sin interferencias para el análisis por HRGC/HRMS. La tabla XI muestra las fases estacionarias utilizadas y la clase de compuestos que se remueven en cada fase (Torres, 2006).

Tabla XI. 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 ₂ SO 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) |
| 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) Ballschmitter (1986) |
| Alúmina básica | PCBs, PCDPEs, PCN, lípidos y fenoles. Separación de la fracción de PCDDs/PCDFs de PCBs. | Busser (1975) |

2.14.4 Separación y detección

La separación y la detección específica de los isómeros de interés se realiza mediante la cromatografía de gases de alta resolución (HRGC) acoplada a la espectrometría de masas de alta resolución (HRMS) o baja resolución (LRMS) (Eljarrat *et al.* 1995).

La determinación instrumental debe realizarse mediante HRGC/HRMS, ya que en la actualidad es el único método lo suficientemente sensible y selectivo para el análisis de PCDD/F. Se trabaja en modo SIM (monitoreo selectivo de iones), por su sensibilidad, y monitorizando dos masas de cada congénere para asegurar la identificación. Se trabaja a una resolución másica igual o superior a 10 000, que es la resolución necesaria para evitar la interferencia de los $^{13}\text{C}_{12}$ -PCDF en la determinación de las $^{13}\text{C}_{12}$ -PCDD de mismo número de cloros. Sin embargo, esta resolución no es suficiente para resolver las interferencias de otros compuestos, como los PCBs, de modo que éstos deben ser separados de los PCDD/F en la etapa de purificación. Trabajando en alta resolución, se consigue, además, una mejora en la sensibilidad, gracias a la disminución del ruido de fondo que provocan las interferencias.

Cabe mencionar que los métodos de análisis de PCDD/F se basan en la cuantificación por el método de la dilución isotópica. Éste consiste en añadir una cantidad conocida de patrones de los congéneres 2,3,7,8-substituidos marcados con ^{13}C antes de iniciar la extracción de la muestra (estándar EPA - 1613LCS). Estos patrones presentan un comportamiento químico prácticamente igual al de los congéneres nativos y, por tanto, son uno de los mejores patrones internos que se podrían emplear. La utilización de la espectrometría de masas como herramienta instrumental para la determinación final permite la detección diferenciada de los congéneres nativos y los congéneres marcados. Así, los congéneres nativos pueden cuantificarse respecto a sus correspondientes marcados, de manera que las posibles pérdidas que se pudieron haber

producido durante el análisis quedan corregidas. Se consigue de esta manera una elevada exactitud en los resultados analíticos. Por otra parte, la adición de los patrones de estándar interno (estándar EPA - 1613ISS) antes de la determinación instrumental por HRGC/HRMS permite calcular las recuperaciones de los patrones internos marcados con ^{13}C , pudiéndose así evaluar la bondad del proceso analítico en cada una de las muestras analizadas. Dado que los métodos son largos y con varias etapas de purificación y concentración, se aceptan recuperaciones de los patrones marcados entre el 25 % y el 150%, los márgenes son variable para cada congénere, en el método 1613 de la USEPA.

Como se mencionó anteriormente, en México se carece de la capacidad de análisis especializado para determinar con seguridad la presencia de dioxinas 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.

En este trabajo nos enfocaremos en la cuantificación de dioxinas por Cromatografía de Gases acoplado a Espectrometría de Masas de Baja Resolución en carnes y leches consumidos en Nuevo León.

CAPÍTULO 3

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Equipo, material y reactivos

3.1.1 Material Biológico a Analizar

3.1.1.1 Muestras de carne

Diez muestras de carne fueron proporcionadas por el Centro de Investigación Regional del Noreste de la Sociedad Ganadera. Estas muestras fueron recolectadas en rastros de plantas TIF (Tipo Inspección Federal) de Nuevo León. Estas muestras fueron mezclas representativas (3 Kg) de diferentes cortes: pescuezo, pecho y pierna. Cuatro muestras corresponden a la estación de otoño del 2004, cuatro muestras a la estación de invierno del 2005 y dos muestras a la estación de primavera del 2005.

3.1.1.2 Muestras de leche

Las muestras fueron adquiridas al azar en diferentes supermercados del área Metropolitana de Monterrey. Se adquirieron 10 muestras de leches comercializadas, provenientes de diferentes lotes de la marca de mayor consumo, con más de 70% de participación en el mercado. Estas muestras fueron adquiridas en diferentes meses, a saber: 1 muestra en noviembre del 2005, 2 muestras en noviembre del 2006, 1 muestra en diciembre del 2006, 2

muestras en mayo del 2007, 2 muestras en agosto del 2007 y 2 muestras en septiembre del 2007.

3.1.2 Equipo

- Cromatógrafo de Gases (GC) 6890N con automuestreador Agilent 7683 y Detector Selectivo de Masas (MSD) 5973 INERT Agilent Technologies con fuente de ionización de impacto de electrones y analizador de cuadrupolo.
- Cabina de Seguridad Biológica clase II tipo B2 ESCO modelo EQU/04 EBC-2B2.
- Liofilizadora Labconco Freeze Dry system/freezone 4.5 modelo 77500.
- Extractor Soxhlet de 200 mL, 50 mm ID.
- Balanza analítica AND GR-202.
- Balanza semianalítica AND GX-200.
- Baño de ultrasonido ULTRASonik modelo 208H.
- Bomba de vacío GAST modelo 1HAB – 26 M100X.
- Congelador MYTAG modelo CFU2046ARM.
- Estufa bacteriológica She – Lab.
- Mini – evaporadores Supelco.
- Rotaevaporador YAMATO modelo RE 200 con baño de agua YAMATO modelo BM 200.
- Vortex GENIE 2 Scientific Industries modelo G560.

3.1.3 Material

- Columna capilar HP-5ms, 60 m x 0.25 mm ID x 0.25 μ m (5% fenil, 95% dimetilpolisiloxano) de Agilent.
- Viales de vidrio de 12 x 32 mm de 1.5 mL con tapón de rosca transparente y septum de PTFE/silicón Chromacol.
- Agitadores de vidrio.
- Aros para soporte.
- Columnas de vidrio de 200 mm x 15 mm.
- Columnas de vidrio de 200 mm x 10 mm.
- Dedal de vidrio de fondo poroso.
- Desecador.
- Embudos de separación de 1000 y 2000 mL.
- Espátulas.
- Jeringas de vidrio para Cromatografía de Gases de 10 μ L, HAMILTON 701N.
- Matraces bola de 50, 100, 250 y 500 mL.
- Matraces erlenmeyer de 25, 50, 125 y 250 mL.
- Matraz de aforación de 100 mL.
- Pinzas para soporte.
- Pipeta volumétrica de 2 mL.
- Pipetas pasteur, Fisher Scientific.
- Probetas de 50, 100 y 400 mL.
- Soportes universales.

- Termómetro de -20 °C a 110 °C.
- Vasos de precipitado de 50, 600 y 1000 mL.
- Vasos para liofilizadora de 900 mL.

3.1.4 Material de Seguridad

- Cabina de seguridad biológica clase II tipo B2.
- Bata de seguridad especial.
- Gorros de seguridad.
- Cubrebocas con filtros.
- Guantes.
- Lentes de la seguridad.

3.1.5 Reactivos

- Estándares EPA - 1613CS (Soluciones de Calibración y Verificación), son mezclas de los 17 congéneres nativos y los correspondientes marcados isotópicamente con $^{13}\text{C}_{12}$ en concentraciones que van desde 0.5 hasta 200 ng/mL, Wellington Laboratories Inc. Guelph, Ontario Canadá.
- Estándar EPA – 1613LCS (Solución Stock de Compuestos Marcados Isotópicamente con $^{13}\text{C}_{12}$), contiene los 17 congéneres marcados isotópicamente en concentraciones de 100 y 200 ng/mL, Wellington Laboratories Inc. Guelph, Ontario Canadá.

- Estándar EPA - 1613ISS (Solución Estándar Interno), contiene $^{13}\text{C}_{12-1}$, 2, 3, 4 – TCDD y el $^{13}\text{C}_{12-1}$, 2, 3, 7, 8, 9 – HxCDD en concentraciones de 200 ng/mL, Wellington Laboratories Inc. Guelph, Ontario Canadá.
- 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, Wellington Laboratories Inc. Guelph, Ontario Canadá.
- Alúmina básica súper I para análisis de dioxinas, Sorbent Technologies.
- Florisil para Cromatografía de Gases, EMD.
- Hidróxido de sodio grado ACS, J. T. Baker.
- Nitrato de plata grado ACS, J. T. Baker.
- Sílica gel 60 tamaño de partícula 0.063 – 0.2mm, Merck.
- Sulfato de sodio anhidro grado ACS, J. T. Baker.
- Oxalato de sodio grado ACS, J. T. Baker.
- Ácido sulfúrico 95 – 97% grado pro análisis, MERCK.
- Agua Bidestilada Plus, Laboratorios Monterrey S.A. de C.V.
- Acetona grado pesticida, MERCK.
- Ciclohexano grado pesticida, FLUKA.
- Diclorometano grado biosíntesis, EM SCIENCE.
- Éter etílico grado ACS, EMD.
- Dietil éter grado pesticida, MERCK.
- Éter de petróleo grado pesticida, MERCK.
- Metanol grado pesticida, MERCK.
- Hexano grado pesticida, MERCK.

- Nonano grado pesticida, FLUKA.
- Tolueno grado pesticida, MERCK.
- Acetona grado ACS, Jalmek.
- Diclorometano grado HPLC/SPECTRO, M TEDIA.

3.2 Metodología

3.2.1 Soluciones estándares EPA 1613

Estándares EPA – 1613CS

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

Estándar EPA – 1613LCS

Este estándar se empleó como estándar surrogado. De la mezcla que contiene los 17 congéneres marcados en concentraciones de 100 a 200 ng/mL, se midieron 5 μ L y se distribuyeron homogéneamente en la muestra durante el proceso de extracción de la grasa (tabla XIII).

Estándar EPA - 1613ISS

Es el estándar interno que se empleó para la cuantificación. Es una mezcla que contiene el $^{13}\text{C}_{12}$ - 1, 2, 3, 4 – TCDD y el $^{13}\text{C}_{12}$ - 1, 2, 3, 7, 8, 9 – HxCDD en

concentraciones de 200 ng/mL. Se midieron 5 μ L y se adicionaron al extracto de la muestra obtenida al final del proceso (tabla XIII).

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 midieron 5 μ L y se distribuyeron homogéneamente en la muestra durante el proceso de extracción de la grasa (tabla XIII).

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

| PCDDs/PCDFs | 1613CS1 | 1613CS2 | 1613CS3 | 1613CS4 | 1613CS5 |
|---|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
| NATIVOS | (ng/mL) | (ng/mL) | (ng/mL) | (ng/mL) | (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 XIII. 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 | --- |

3.3 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 (GC) 6890N con automuestreador Agilent 7683 y Detector Selectivo de Masas (MSD) 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.
- 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.
- Gas acarreador: Helio 99.999% pureza.
- Flujo: 1 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.

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.
- 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.
- Gas acarreador: Helio 99.999% pureza.
- 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.

3.3.1 Ventanas de tiempo de retención

Para realizar el análisis de PCDDs/PCDFs primero 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).

3.4 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 fueron los siguientes:

1. Valle de isómeros específicos.
2. Nivel mínimo cuantificable.
3. Relación de abundancia de iones isotópicos.
4. Linealidad.

3.4.1 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% (Ec. 1).

$$\text{Valle de isómeros específicos} = \frac{x}{y} * 100 \quad (\text{Ec. 1})$$

En la figura 4 se muestra el ejemplo de una HxCDD.

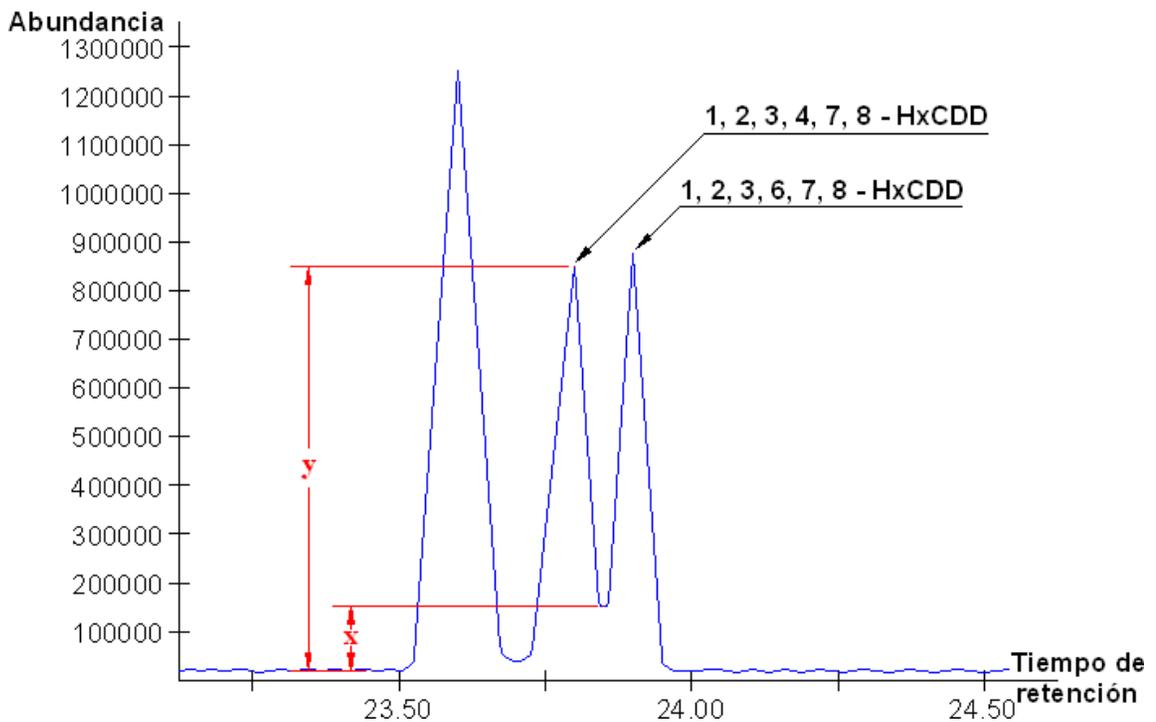


Figura 4. Separación de isómeros específicos

3.4.2 Relación de abundancia de iones isotópicos

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

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 ión 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 XIV muestra las relaciones de abundancias aceptadas por el método USEPA 1613.

3.4.3 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.

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

| Congéneres | 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 | | |

3.4.4 Linealidad

Para evaluar la linealidad 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 ¹³C₁₂ (tabla XIII), se calcularon las respuestas relativas mediante la ecuación 2.

$$RR = \frac{(A1n + A2n)Cl}{(A1l + A2l)Cn} \quad (\text{Ec. 2})$$

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 $^{13}\text{C}_{12}$.

Cl = Concentración de los compuestos marcados isotópicamente con $^{13}\text{C}_{12}$.

Cn = Concentración de los compuestos nativos.

RR = Respuesta relativa.

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

$$CV = \left(\frac{SD}{\bar{x}} * 100 \right) \quad (\text{Ec. 3})$$

Donde:

CV = Porcentaje del coeficiente de variación.

SD = Desviación estándar de las respuestas relativas.

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

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

3.5 Desarrollo de un método de extracción de los PCDDs/PCDFs para las muestras de carne y leche

Se implementó el método USEPA 1613 con modificaciones realizadas por el Laboratorio de Dioxinas del Instituto de Diagnóstico Ambiental y Estudios del Agua del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) en Barcelona, España (USEPA 1994; Abad et al.1997, 2000).

La metodología analítica empleada para la determinación de dioxinas comprende 4 etapas fundamentales:

1. Toma de la muestra.
2. Extracción de dioxinas.
3. Purificación y fraccionamiento.
4. Separación y detección de los congéneres.

Antes de empezar con la metodología analítica para la determinación de dioxinas en carnes y leches, se tomaron en cuenta las medidas de seguridad durante el trabajo en el laboratorio con estos analitos, debido a los efectos tóxicos que conlleva el manejo de los mismos. La manipulación de estas

sustancias debe ser en extremo cuidadosa, como si se manejara materiales radiactivos o infecciosos.

El desarrollo del procedimiento para la extracción de dioxinas en carnes y leches se llevó a cabo en cuatro etapas como se mencionó anteriormente. Sin embargo la primera etapa fue diferente en la extracción de grasa (debido al carácter lipofílico de las dioxinas) por ser matrices diferentes y las tres últimas similares por que los analitos a determinar son los mismos.

3.5.1 Toma de muestra

3.5.1.1 Carnes

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

Antes de la extracción de dioxinas las muestras de carne fueron sometidas a un pretratamiento, el cual consistió en congelar las muestras y posteriormente liofilizarlas para eliminar totalmente el agua, la liofilización duró de 4 a 7 días.

Determinación de grasa

Una vez obtenida la muestra liofilizada se procedió a la extracción de la grasa por el método Soxhlet, para lo cual se pesó una cantidad de muestra que contenga alrededor de 5 a 10 % de grasa. A la muestra pesada se le adicionó el estándar surrogado EPA 1613LCS marcado isotópicamente con ^{13}C para

poder cuantificar las dioxinas por el método de dilución isotópica. La extracción de la grasa se realizó con 400 mL de tolueno-ciclohexano (1:1), durante 24 horas. Después se concentró la grasa a sequedad y se dejó en estufa a 105°C por 12 hrs. Se obtuvo la grasa y a partir de esta se aplicaron los diferentes procesos para la determinación y cuantificación de dioxinas.

3.5.1.2 Leche

Las muestras de leche con que se trabajó fueron de diferentes lotes de una misma marca obtenidas en los supermercados de la zona metropolitana de Monterrey. Estas muestras fueron homogenizadas por agitación antes de ser sometidas a la extracción de grasa.

Determinación de grasa

La metodología a seguir para la extracción de grasa es la siguiente:

Se pesaron 200 mL de leche y se transfirió a un embudo de separación de 2000 mL, se agregaron 2 g de oxalato de sodio para romper la emulsión y facilitar la liberación de la grasa, se agitó por 20 segundos; luego se adicionaron 200 mL de metanol y se agitó por 10 segundos. Posteriormente se adicionaron 200 mL de dietiléter y se fortificó con una concentración conocida del estándar EPA 1613LCS (estándar surrogado) para poder cuantificar las dioxinas por el método de dilución isotópica y se agitó por 30 segundos, en esta etapa comienza la separación de la grasa. Finalmente se adicionaron 200 mL de éter de petróleo y se agitó por 60 segundos. Se dejó reposar durante 24 horas. La fase orgánica se recibió en un matraz bola de 1 L; se realizó una segunda extracción a la

fase acuosa pero sólo desde la fase de extracción con dietiléter, dejando nuevamente reposar 24 horas. Después de este tiempo se recibió la fase orgánica en el mismo envase del anterior filtrado orgánico, se concentró hasta eliminar toda la fase orgánica y se dejó durante 12 hrs. a 105 °C en la estufa. Se pesó la grasa obtenida. Esta muestra de grasa de la leche se utilizó para la extracción de dioxinas.

3.5.2 Extracción de dioxinas

La muestra de grasa, procedente de la carne o la leche, 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 repite 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.

3.5.3 Purificación y fraccionamiento

En este caso se ha empleado el sistema manual para este proceso, utilizando adsorbentes de diversa naturaleza: sílica gel, florisil y alúmina.

3.5.3.1 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. Este acondicionamiento se llevó a cabo con la finalidad de eliminar posibles sustancias que pudieran afectar el correcto funcionamiento del proceso de purificación.

- 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 una solución de hidróxido de sodio 1 Molar, se agitó constantemente hasta que la mezcla esté 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 quede 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.

3.5.3.2 Columna de sílica gel modificada

Para este paso, 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_2SO_4 anhidro, que sirve para eliminar la posible humedad presente en el extracto (figura 5).

Una vez preparada la columna de sílica gel modificada se acopló 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.

Seguidamente se introdujo el extracto obtenido en 3.5.2 y se eluyó con 250 mL de hexano por que se trabajó en tándem con la columna de florisil.

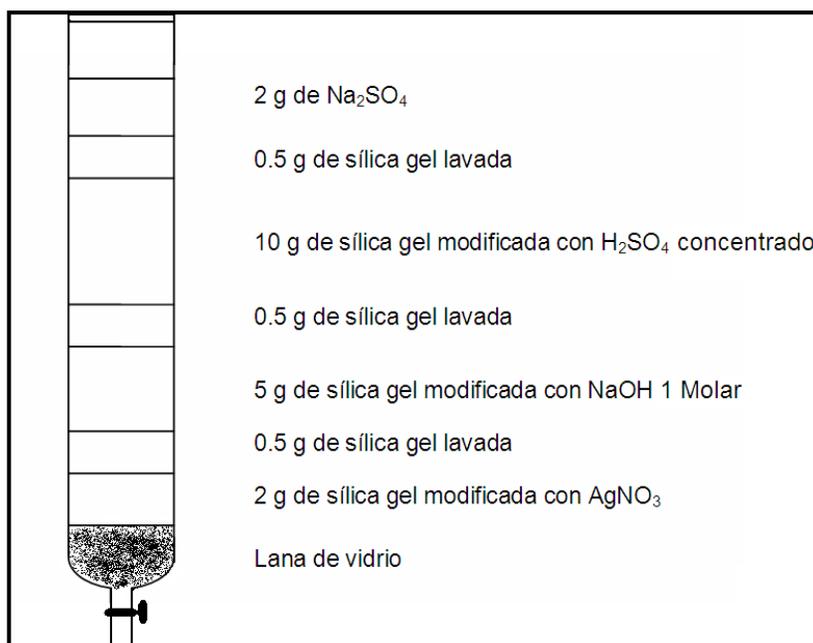


Figura 5. Columna de sílica gel modificada.

3.5.3.3 Columna de florisil

Se empleó una columna de vidrio de 200 mm con un diámetro interno de 10 mm, se introdujeron 5 g de florisil (preparado de acuerdo a 3.5.3.1.b), seguidos de 1g de Na_2SO_4 anhidro (figura 6).

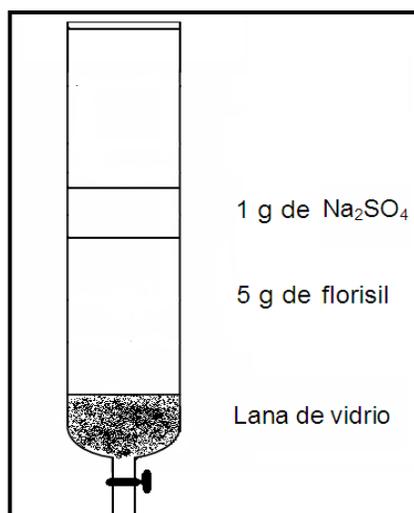


Figura 6. Columna de florisil.

La primera fracción de la elución con 250 mL de hexano se descartó y se retiró la columna de sílica gel modificada. Después se eluyó con una mezcla de tolueno:éter etílico (90:10) en la cual se recuperan las dioxinas (Abad et al. 2000; Ábalos et al. 2008, 2010). Esta fracción, 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.

3.5.3.4 Columna de alúmina

Esta columna es también una columna de vidrio de 200 mm con un diámetro interno de 10 mm, donde se introdujo 6 g de alúmina (preparado de acuerdo a 3.5.3.1.c), seguidos de 3 g de Na_2SO_4 anhidro (figura 7).

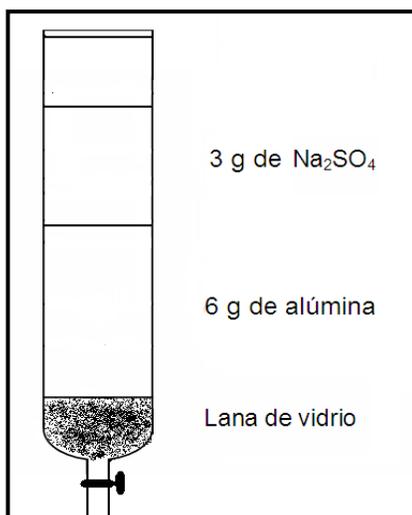


Figura 7. Columna de alúmina.

La columna de alúmina se eluyó con 50 mL de hexano, luego se introdujo el extracto procedente de la columna de florisil y se eluyó con 25 mL de hexano, después se efectuó 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) permitió recuperar los PCDDs/PCDFs y para asegurar de su total recuperación, se agregó una última fracción de 20 mL de diclorometano.

Finalmente, la tercera fracción que contiene PCDDs/PCDFs 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 agregaba el diclorometano se evaporaba a sequedad con nitrógeno. El extracto seco se reconstituyó con 5 μ L de nonano y se adicionó 5 μ L del estándar EPA 1613ISS para realizar la cuantificación.

3.5.4 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. Cada vez que se inyectaban muestras se corría también un estándar de referencia sobre todo para controlar los tiempos de retención y así poder identificar los analitos presentes.

3.6 Validación del método analítico para la determinación de PCDDs/PCDFs en carnes y leches

La validación del método analítico para la determinación de dioxinas en carnes y leches se ha realizado por separado debido a que el tratamiento de las muestras para la obtención de grasa es muy diferente en cada uno de ellos.

Se evaluaron los siguientes parámetros:

- Exactitud como porcentaje de recuperación (%R).
- Precisión como desviación estándar relativa (%RSD).

Para evaluar el porcentaje de recuperación y precisión se empleó la misma metodología analítica, tanto para carnes como para leches, sólo que al agregar el estándar EPA1613LCS durante la extracción de la grasa también se añadió el estándar EPA1613PAR. Luego se continuó con el mismo procedimiento que ha sido explicado anteriormente.

3.6.1 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.

$$C_{ex} \text{ (g/mL)} = \frac{(A_{1n} + A_{2n}) \cdot CI}{(A_{1l} + A_{2l}) \cdot RR} \quad (\text{Ec. 4})$$

Donde:

$A_{1n} + A_{2n}$ = Suma de las áreas de los iones primario y secundario de los PCDDs/PCDFs nativos.

$A_{1l} + A_{2l}$ = Suma de las áreas de los iones primario y secundario de los PCDDs/PCDFs marcados isotópicamente con $^{13}\text{C}_{12}$.

CI = Concentración de los compuestos marcados isotópicamente con $^{13}\text{C}_{12}$.

RR = Respuesta relativa.

C_{ex} = Concentración encontrada.

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

$$\%R = \frac{C_{ex} \left(\mu\text{g} / \text{mL} \right)}{C_{ax} \left(\mu\text{g} / \text{mL} \right)} * 100 \quad (\text{Ec. 5})$$

Donde:

C_{ex} = Concentración encontrada.

C_{ax} = Concentración añadida.

$\%R$ = Porcentaje de recuperación.

3.6.2 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.

3.7 Aplicación del método validado en muestras de carne y leche

3.7.1 Procesamiento de las muestras

Las muestras de carne y leche se procesaron siguiendo el método analítico validado, se analizaron por Cromatografía de Gases con un detector de Espectrometría de Masas de Baja Resolución.

Las concentraciones de los PCDDs y PCDFs se reportaron en pg/g de grasa.

Se aplicó la siguiente ecuación:

$$\text{Concentración} = \frac{C_{ex}}{W_s} \quad (\text{Ec. 6})$$

Donde:

C_{ex} = Concentración encontrada (pg).

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

3.7.2 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.

$$TEQ = Concentración * TEF \quad (Ec. 7)$$

Donde:

Concentración = pg/g grasa de la ecuación 6.

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

3.8 Comparación de resultados de Dioxinas por LRMS y HRMS

Con la finalidad de verificar los resultados obtenidos por LRMS se analizaron tres muestras de carnes y cinco de leches con equipo de HRMS. Las muestras analizadas fueron las mismas en ambos equipos.

3.9 Análisis estadístico

El análisis estadístico de los datos se realizó mediante el software estadístico MINITAB. Se hizo análisis de varianza con la finalidad de establecer diferencias entre las técnicas de detección GC/LRMS y HRGC/HRMS. También se hizo un

análisis de regresión lineal para encontrar un modelo que permita describir la relación entre los WHO-TEQ detectados por ambas técnicas.

3.10 Análisis de riesgo

Con la finalidad de determinar el potencial riesgo para la salud pública por la presencia de Dioxinas en carne se realizó una evaluación de dicho riesgo, siguiendo las recomendaciones descritas en las Guías de Evaluación de Riesgo Carcinogénico, Evaluación de la Exposición y Evaluación de Riesgos para la Salud por Mezclas Químicas de la USEPA (USEPA, 1992; USEPA, 2000; USEPA, 2005).

3.10.1 Estimación de la dosis de exposición

La dosis de exposición a dioxinas por ingesta de carne se estimó mediante la siguiente ecuación:

$$DE = \frac{C \times TI \times FE}{PC} \quad (\text{Ec. 8})$$

Donde:

DE = Dosis de exposición.

C = Concentración en el medio de exposición (mg dioxina /g de carne fresca).

TI = Tasa de ingesta de carne fresca.

FE = Factor de exposición.

PC = Peso corporal (70 Kg para una persona adulta).

3.10.1.1 Cálculo de la concentración de dioxina en carne fresca

Acorde con la literatura revisada, en promedio la carne fresca contiene 70 % de agua, es decir, 100 g de carne fresca producirán 30 g de carne seca. En nuestro estudio encontramos que el porcentaje de grasa en base seca es de aproximadamente 50 %, por lo tanto se estimó que 100 g de carne fresca tienen aproximadamente 15 g de grasa, lo que equivale a tener 0.15 g de grasa por gramo de carne fresca. Utilizando este factor se estimó la concentración de dioxinas en carne fresca, C, expresada en mg de dioxina por g de carne fresca, mediante la siguiente ecuación:

$$C = \left(\frac{Pg_{dioxina}}{g_{grasa}} \right) \left(0.15 \frac{g_{grasa}}{g_{carnefresca}} \right) \left(10^{-9} \frac{mg}{Pg} \right) \quad (\text{Ec. 9})$$

3.10.1.2 Consideraciones para la tasa de ingesta de carne

Suponiendo que una porción de carne de res es de 125 g de carne fresca y que en una semana se consumen 4 porciones de carne, la tasa de ingesta (TI) de carne de res sería de 71.42 g/día. Esta TI es similar a las TI de carne de res de los Estados Unidos de 51 g/día (USDA, 1980) y superior al consumo de carne de res en Inglaterra de 16 g/día (Slater *et al.* 1998).

3.10.1.3 Factor de exposición

El factor de exposición (FE) se utiliza cuando la exposición es intermitente o con bases irregulares. Este factor es calculado para promediar la dosis en un

intervalo de exposición. El FE se calcula multiplicando la frecuencia de exposición por la duración de la exposición y dividiendo por el periodo de tiempo sobre el cual la dosis va a ser promediada. En este estudio se consideró que una persona adulta come carne 4 veces a la semana durante 70 años de su vida, por lo tanto el factor de exposición esta dado por la siguiente ecuación:

$$FE = \frac{4 \text{ Días/semana} \times 52 \text{ Semanas/año} \times 70 \text{ años}}{70 \text{ años} \times 365 \text{ Días/año}} = 0.57 \quad (\text{Ec. 10})$$

Este valor de FE se utiliza para calcular DE.

3.10.2 Caracterización del riesgo

La caracterización del riesgo carcinogénico y no carcinogénico se realizó según se establece en la Guía Técnica para Orientar la Elaboración de Estudios de Evaluación de Riesgo Ambiental de Sitios Contaminados publicada por la Secretaria del Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT, 2006).

3.10.2.1 Efectos cancerígenos

Para la caracterización del riesgo cancerígeno se calculó el índice de riesgo (IR) y el riesgo poblacional (RP) mediante las siguientes ecuaciones:

$$IR = DE \times FP \quad (\text{Ec. 11})$$

$$RP = IR \times \text{Población expuesta} \quad (\text{Ec. 12})$$

Donde:

FP = Factor de potencia de cáncer.

RP = Riesgo poblacional o incidencia de cáncer esperada al exponer a la población a la DE .

3.10.2.2 Efectos no cancerígenos

Para caracterizar el riesgo de efectos sistémicos se calculó el índice de peligro (IP) mediante la siguiente ecuación:

$$IP = \frac{DE}{MRL} \quad (\text{Ec. 13})$$

Donde MRL es el nivel mínimo de riesgo establecido para la 2,3,7,8-TCDD por vía oral, establecido por la Agencia para el Registro de Sustancias Tóxicas y Enfermedades, ATSDR por sus siglas en inglés, de los Estados Unidos de Norteamérica.

CAPÍTULO 4

RESULTADOS

4.1 Análisis por Cromatografía de Gases/Espectrometría de Masas

En la figura 8 se muestra el cromatograma que se obtuvo con las condiciones iniciales de trabajo, donde se observó que los valores de los valles de los isómeros del grupo hexa eran muy altos. Por otro lado, la relación de abundancia de los iones isotópicos tampoco estaba dentro de lo recomendado por el método EPA 1613.

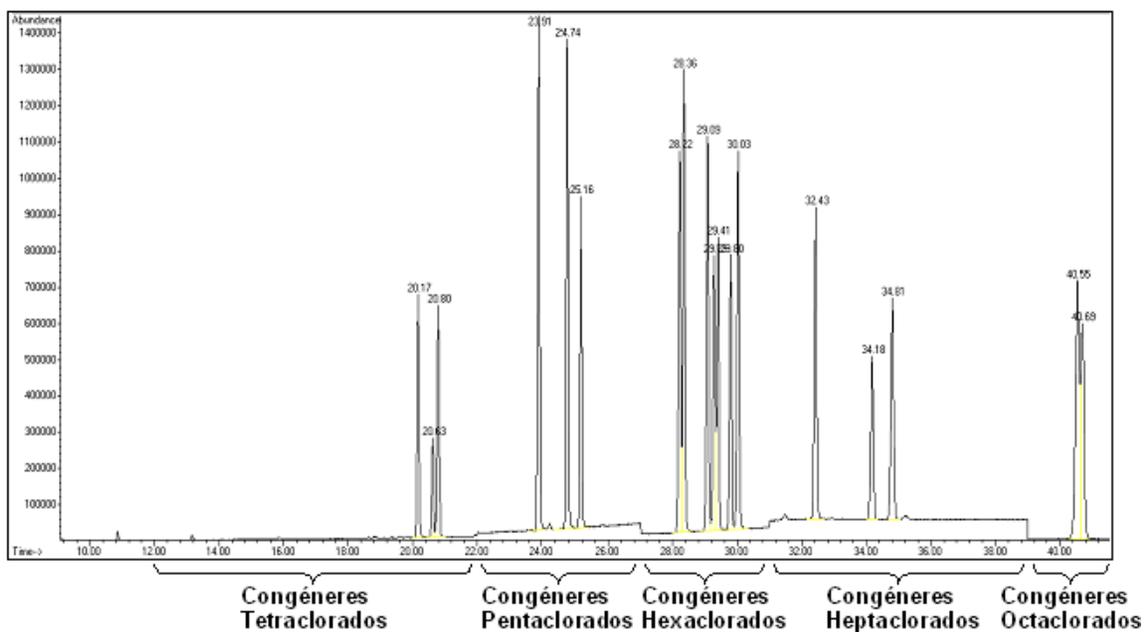


Figura 8. Cromatograma de los PCDDs/PCDFs.

En la figura 9 se muestra el cromatograma resultante de la modificación de la Temperatura inicial del horno, de 150°C a 180°C. Con esto mejoraron los valores de los valles en un 8%, pero se perdió la resolución del grupo de los octa.

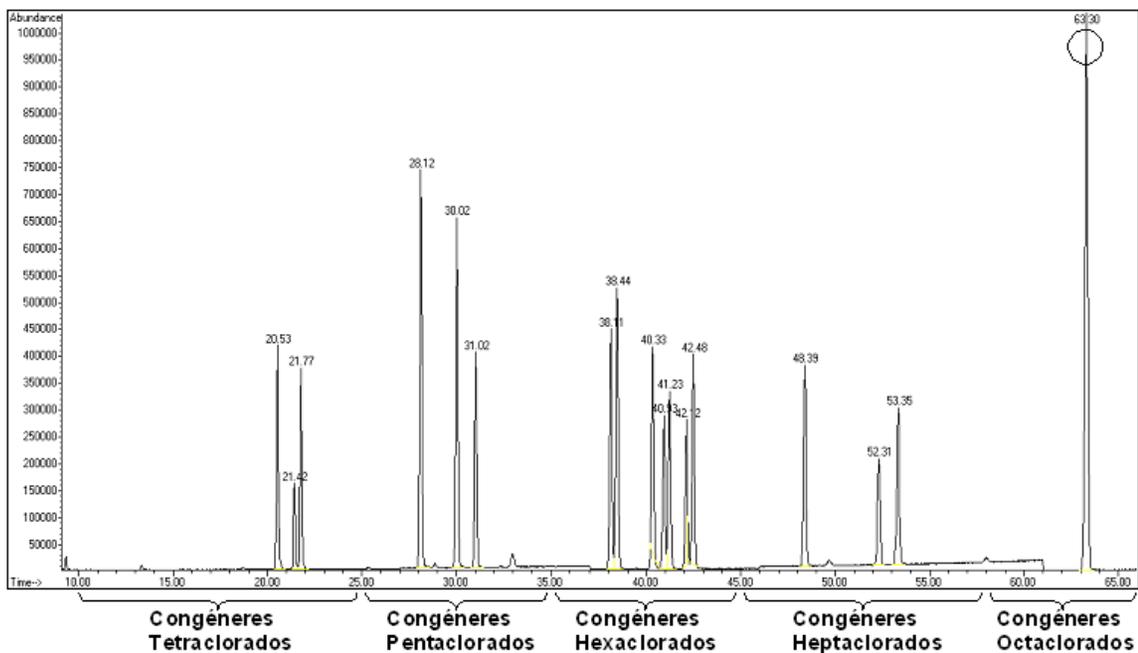


Figura 9. Cromatograma sin resolución de los octas.

La figura 10 muestra un cromatograma obtenido con las condiciones finales de operación.

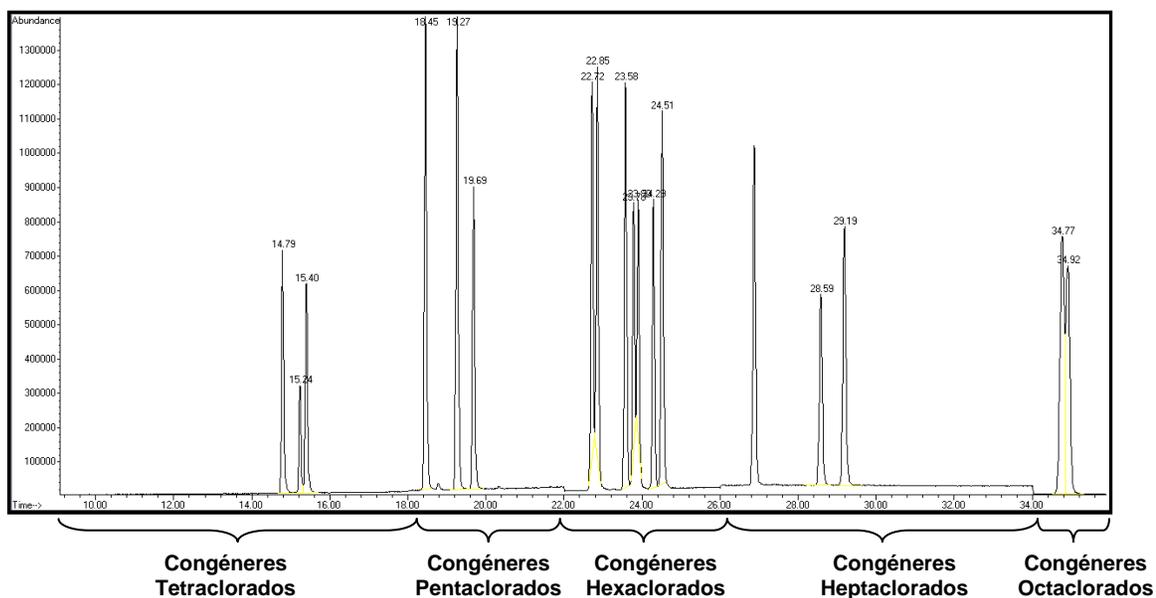


Figura 10. Cromatograma del estándar de 10 a 100 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de los 17 congéneres PCDDs/PCDFs analizados por GC/LRMS.

4.1.1 Ventanas de tiempo de retención

Se determinaron en modo SCAN para establecer los tiempos de retención absolutos de los analitos y después en el modo SIM.

Las ventanas seleccionadas se muestran en la figura 10 y fueron los siguientes:

Congéneres tetraclorados 9-18 min.

Congéneres pentaclorados 18-22 min.

Congéneres hexaclorados 22-26 min.

Congéneres heptaclorados 26-32 min.

Congéneres octaclorados 32-36 min.

4.2 Validación del sistema cromatográfico

4.2.1 Valle de isómeros específicos

Se ha determinado 16% para TCDD, 19.60% para HxCDD y 9.76% para HxCDF.

Los resultados de HxCDD se muestran en la figura 11.

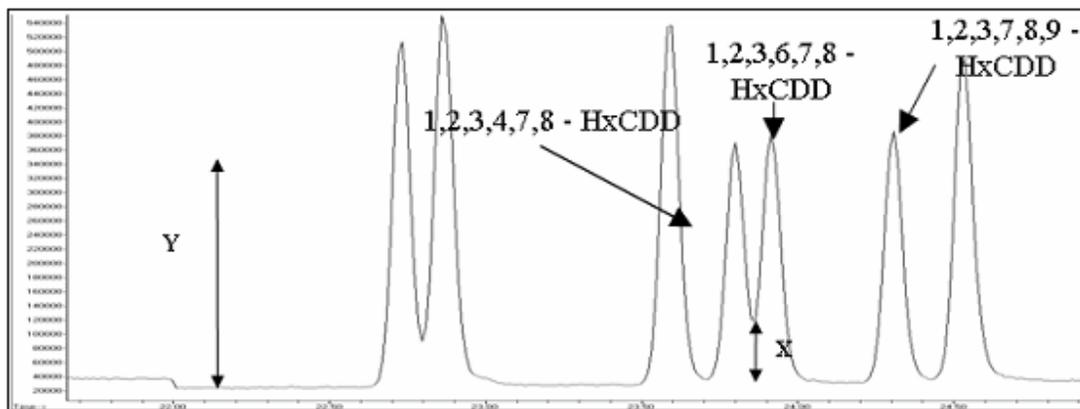


Figura 11. Valle de isómeros de HxCDD y HxCDF.

4.2.2 Relación de abundancia de iones isotópicos

En la tabla XV se muestra la relación de abundancia de los iones isotópicos de los PCDDs y PCDFs en concentraciones de 0.5 pg/μL hasta 200 pg/μL, todos están dentro de los límites que señala la EPA, excepto los PeCDD que presentan la relación masa/carga (m/z) dentro del límite después de la concentración de 2 pg/μL.

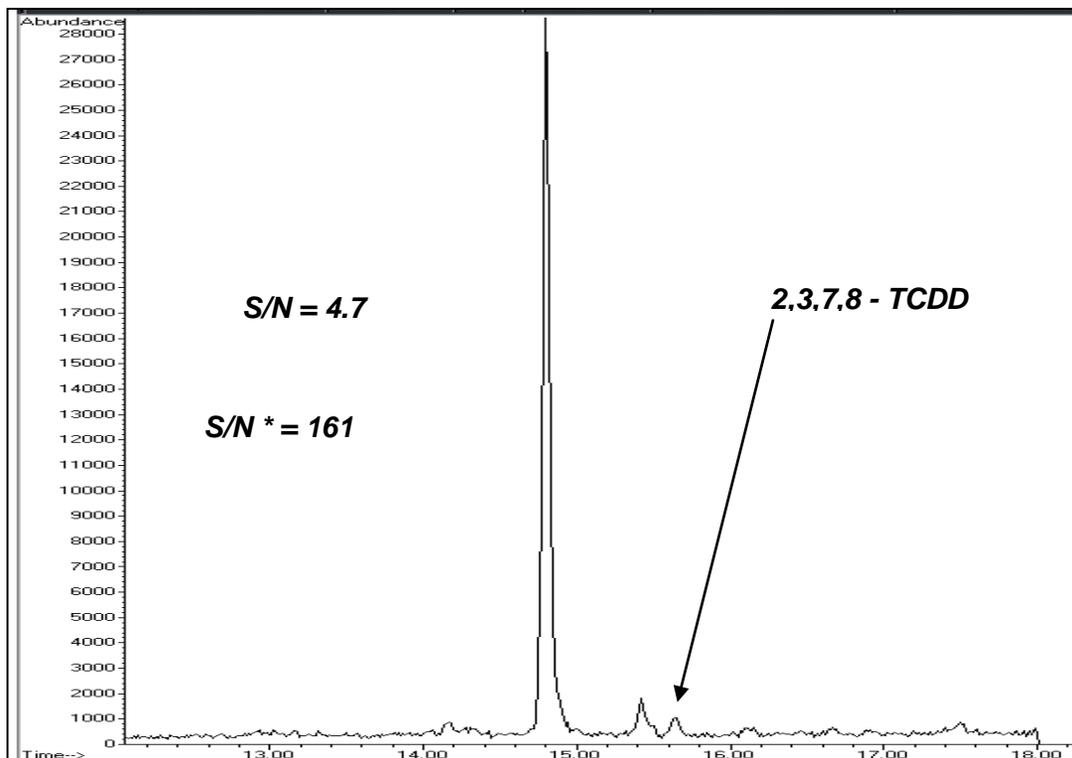
Tabla XV. Relación de abundancia de iones isotópicos de PCDDs/PCDFs.

| N° de Cloros | Relación de m/z's | Intervalo Determinado | Límite EPA |
|--------------|-------------------|-----------------------|------------|
| 4 | M/(M+2) | 0.74-0.84 | 0.65-0.89 |
| 5 | (M+2)/(M+4) | *1.44-1.68 | 1.32-1.78 |
| 6 | (M+2)/(M+4) | 1.07-1.35 | 1.05-1.43 |
| 7 | (M+2)/(M+4) | 0.88-1.22 | 0.88-1.20 |
| 8 | (M+2)/(M+4) | 0.85-1.02 | 0.76-1.02 |

*PeCDD presentan relación m/z dentro del límite después de 2 pg/μL.

4.2.3 Nivel mínimo cuantificable (LOQ)

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 se acepte este criterio. En la figura 12 se muestra la relación Señal/Ruido de TCCD a una concentración de 0.5 pg/μL. En la tabla XVI se muestra los S/N de los diferentes congéneres de PCDDs y PCDFs.



S/N = Relación señal ruido para nativo
 S/N* = Relación señal ruido para marcado

Figura 12. Relación Señal/Ruido de TCDD 0.5 pg/μL

Tabla XVI. Señal/Ruido de PCDDs y PCDFs

| Congéneres | Concentración pg/μL | Señal/Ruido |
|-----------------------------|------------------------|-------------|
| 2, 3, 7, 8 – TCDF | 0.5 | 8.8 |
| 1, 2, 3, 7, 8 – PeCDF | 2.5 | 8.4 |
| 2, 3, 4, 7, 8 – PeCDF | 2.5 | 11.5 |
| 1, 2, 3, 4, 7, 8 – HxCDF | 2.5 | 9.3 |
| 1, 2, 3, 6, 7, 8 – HxCDF | 2.5 | 9.8 |
| 2, 3, 4, 6, 7, 8 – HxCDF | 2.5 | 9.3 |
| 1, 2, 3, 7, 8, 9 – HxCDF | 2.5 | 7.8 |
| 1, 2, 3, 4, 6, 7, 8 – HpCDF | 2.5 | 3.5 |
| 1, 2, 3, 4, 7, 8, 9 – HpCDF | 2.5 | 3.1 |
| 2, 3, 7, 8 – TCDD | 0.5 | 4.7 |
| 1, 2, 3, 7, 8 – PeCDD | 2.5 | 23.9 |
| 1, 2, 3, 4, 7, 8 – HxCDD | 2.5 | 3.2 |
| 1, 2, 3, 6, 7, 8 – HxCDD | 2.5 | 4.6 |
| 1, 2, 3, 4, 7, 8, 9 – HpCDD | 2.5 | 6.8 |
| OCDD | 5 | 5.4 |

4.2.4 Linealidad

Para evaluar la linealidad se determinó la Respuesta Relativa (RR) aplicando la ecuación 2. El coeficiente de variación de las Respuestas Relativas, debe ser menor que 20%. En la tabla XVII se muestran las RR para la 2,3,7,8-TCDD, se observó que a partir de 2 pg/μL las RR están dentro del CV que señala la EPA. En la tabla XVIII se muestran las RR para 2,3,7,8-TCDF. Los valores de CV se encuentran dentro de los límites de la EPA a partir de 0.5 pg/μL.

Tabla XVII. Respuesta Relativa de 2,3,7,8,-TCDD, n=3.

| Concentración pg/μL | Respuesta Intradía | Respuesta Interdía |
|------------------------|-----------------------|-----------------------|
| 2 | 0.91 | 0.96 |
| 10 | 0.92 | 0.98 |
| 40 | 1.00 | 1.02 |
| 200 | 0.92 | 0,89 |
| Prom. | 0.94 | 0.96 |
| CV | 4.09 | 5.09 |
| CV-EPA | <20 | <20 |

Tabla XVIII. Respuesta Relativa de 2,3,7,8,-TCDF, n=3.

| Concentración pg/μL | Respuesta Intradía | Respuesta Interdía |
|------------------------|-----------------------|-----------------------|
| 0.5 | 1.27 | 1.15 |
| 2 | 0.84 | 0.85 |
| 10 | 0.85 | 0.88 |
| 40 | 0.91 | 0.92 |
| 200 | 0.89 | 0,93 |
| Prom. | 0.96 | 0.94 |
| CV | 16.65 | 11.65 |
| CV-EPA | <20 | <20 |

En las tablas XIX y XX se muestran las RR de PeCDD y PeCDF respectivamente; en la tabla XXI de la HxCDD; en las tablas XXII y XXIII del HxCDF; en la tabla XXIV y XXV de HpCDD y HpCDF respectivamente y en la tabla XXVI las RR de la OCDD. Se observó que para PeCDD, PeCDF, HxCDD, HxCDF, HpCDD y HpCDF a partir de 2.5 pg/μL las RR están dentro del CV que señala la EPA. En la tabla XXVI se muestran las RR para OCDD, los valores de CV se encuentran dentro de los límites de la EPA a partir de 10 pg/μL.

Tabla XIX. Respuesta Relativa de 1,2,3,7,8,-PeCDD, n=3.

| Concentración pg/μL | Respuesta Intradía | Respuesta Interdía |
|------------------------|-----------------------|-----------------------|
| 10 | 5.90 | 7.15 |
| 50 | 5.23 | 5.36 |
| 200 | 5.15 | 5.15 |
| 1000 | 3.60 | 5.25 |
| Prom. | 4.97 | 5.73 |
| CV | 19.60 | 16.63 |
| CV-EPA | <20 | <20 |

Tabla XX. Respuesta Relativa de PeCDF, n=3.

| Concentración pg/μL | 1,2,3,7,8-PeCDF | | 2,3,4,7,8-PeCDF | |
|------------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|
| | Respuesta Intradía | Respuesta Interdía | Respuesta Intradía | Respuesta Interdía |
| 10 | 4.83 | 4.97 | 5.12 | 5.32 |
| 50 | 4.70 | 4.71 | 4.78 | 5.01 |
| 200 | 4.99 | 4.94 | 4.99 | 4.97 |
| 1000 | 4.80 | 5.17 | 4.74 | 5.20 |
| Prom. | 4.83 | 4.95 | 4.90 | 5.13 |
| CV | 2.43 | 3.83 | 3.66 | 3.2 |
| CV-EPA | <20 | <20 | <20 | <20 |

Tabla XXI. Respuesta Relativa de HxCDD, n=3.

| Concentración pg/ μ L | 1,2,3,4,7,8-HxCDD | | 1,2,3,6,7,8-HxCDD | | 1,2,3,7,8,9-HxCDD | |
|------------------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|
| | Respuesta Intradía | Respuesta Interdía | Respuesta Intradía | Respuesta Interdía | Respuesta Intradía | Respuesta Interdía |
| 10 | 3.94 | 5.53 | 3.53 | 3.64 | 4.70 | 4.82 |
| 50 | 4.80 | 5.53 | 4.45 | 4.74 | 4.45 | 4.60 |
| 200 | 4.91 | 4.40 | 4.61 | 4.22 | 4.76 | 4.51 |
| 1000 | 4.84 | 5.04 | 4.52 | 4.78 | 4.64 | 4.55 |
| Prom. | 4.62 | 5.13 | 4.28 | 4.35 | 4.64 | 4.62 |
| CV | 9.94 | 10.45 | 11.70 | 12.24 | 2.84 | 3.02 |
| CV-EPA | <20 | <20 | <20 | <20 | <20 | <20 |

Tabla XXII. Respuesta Relativa de 1,2,3,4,7,8-HxCDF y 1,2,3,6,7,8-HxCDF, n=3.

| Concentración pg/ μ L | 1,2,3,4,7,8-HxCDF | | 1,2,3,6,7,8-HxCDF | |
|------------------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|
| | Respuesta Intradía | Respuesta Interdía | Respuesta Intradía | Respuesta Interdía |
| 10 | 5.24 | 4.27 | 5.51 | 4.23 |
| 50 | 4.70 | 4.80 | 5.13 | 4.82 |
| 200 | 4.99 | 5.15 | 4.93 | 5.06 |
| 1000 | 4.72 | 4.93 | 4.14 | 4.65 |
| Prom. | 4.91 | 4.79 | 4.93 | 4.70 |
| CV | 5.16 | 7.77 | 11.68 | 7.51 |
| CV-EPA | <20 | <20 | <20 | <20 |

Tabla XXIII. Respuesta Relativa de 2,3,4,6,7,8-HxCDF y 1,2,3,7,8,9-HxCDF, n=3.

| Concentración pg/ μ L | 2,3,4,6,7,8-HxCDF | | 1,2,3,7,8,9-HxCDF | |
|------------------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|
| | Respuesta Intradía | Respuesta Interdía | Respuesta Intradía | Respuesta Interdía |
| 10 | 4.69 | 4.43 | 4.59 | 4.51 |
| 50 | 4.50 | 4.62 | 4.55 | 4.47 |
| 200 | 4.78 | 4.45 | 4.83 | 4.50 |
| 1000 | 4.73 | 5.33 | 4.94 | 5.61 |
| Prom. | 4.68 | 4.71 | 4.73 | 4.77 |
| CV | 2.59 | 9.03 | 4.07 | 11.70 |
| CV-EPA | <20 | <20 | <20 | <20 |

Tabla XXIV. Respuesta Relativa de 1,2,3,4,6,7,8-HpCDD, n=3.

| Concentración pg/ μ L | Respuesta Intradía | Respuesta Interdía |
|------------------------------|-----------------------|-----------------------|
| 10 | 4.86 | 4.09 |
| 50 | 4.88 | 4.76 |
| 200 | 4.67 | 5.41 |
| 1000 | 5.10 | 5.11 |
| Prom. | 4.88 | 4.84 |
| CV | 3.63 | 11.68 |
| CV-EPA | <20 | <20 |

Tabla XXV. Respuesta Relativa de HpCDF, n=3.

| Concentración pg/ μ L | 1,2,3,4,6,7,8-HpCDF | | 1,2,3,4,7,8,9-HpCDF | |
|------------------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|
| | Respuesta Intradía | Respuesta Interdía | Respuesta Intradía | Respuesta Interdía |
| 10 | 4.77 | 5.21 | 4.43 | 4.95 |
| 50 | 4.70 | 4.74 | 4.29 | 4.43 |
| 200 | 4.91 | 5.10 | 4.55 | 4.36 |
| 1000 | 5.18 | 5.23 | 4.55 | 5.22 |
| Prom. | 4.89 | 5.09 | 4.46 | 4.74 |
| CV | 4.34 | 4.93 | 2.84 | 8.76 |
| CV-EPA | <20 | <20 | <20 | <20 |

Tabla XXVI. Respuesta Relativa de OCDD, n=3.

| Concentración pg/ μ L | Respuesta Intradía | Respuesta Interdía |
|------------------------------|-----------------------|-----------------------|
| 20 | 4.36 | 3.60 |
| 100 | 4.62 | 4.32 |
| 400 | 4.88 | 4.72 |
| 2000 | 4.70 | 5.75 |
| Prom. | 4.64 | 4.60 |
| CV | 4.67 | 19.54 |
| CV-EPA | <20 | <20 |

En la tabla XXVII se muestra el resumen de los resultados de los criterios de validación del sistema cromatográfico para la determinación de los PCDDs y PCDFs.

Tabla XXVII. Resumen de los Criterios de validación determinados para PCDDs/PCDFs por GC/LRMS.

| Criterio | PCDDs (TCDD) | PCDFs (TCDF) | Método USEPA 1613 |
|---|-----------------------------|---------------------------|------------------------------|
| Valle de isómeros específicos | 16% | 9.76% (HxDF) | $\leq 25\%$ |
| Nivel mínimo cuantificable | 2.0 pg/ μ L S/N > 10 | 1 pg/ μ L S/N > 10 | S/N ≥ 10 |
| Relación de abundancia de iones isotópicos | 0.84 | 0.74 | M / M+2 = 0.65 – 0.89 |
| Linealidad | | | |
| CV intradía | 4.09% | 5.09% | $\leq 20\%$ |
| CV interdía | 16.65% | 11.65% | |

4.3 Extracción y purificación de dioxinas en muestras de carne y leche

La extracción de dioxinas se realizó con hexano en un medio fuertemente ácido (H₂SO₄ conc.). La purificación y fraccionamiento se llevó a cabo en columnas de sílica gel modificado, florisil y alúmina. Se trabajó con columna de sílica gel modificada acoplada a la columna de florisil.

La eficacia de cada una de las etapas de purificación y fraccionamiento descritas se evaluó mediante el análisis de los extractos correspondientes por GC/LRMS. Las fracciones 1 y 2 de la columna de alúmina no presentaron ninguno de los 17 congéneres analizados. De la misma manera la fracción 4 tampoco presentó ninguno de los congéneres.

4.3.1 Carne

La figura 13 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.

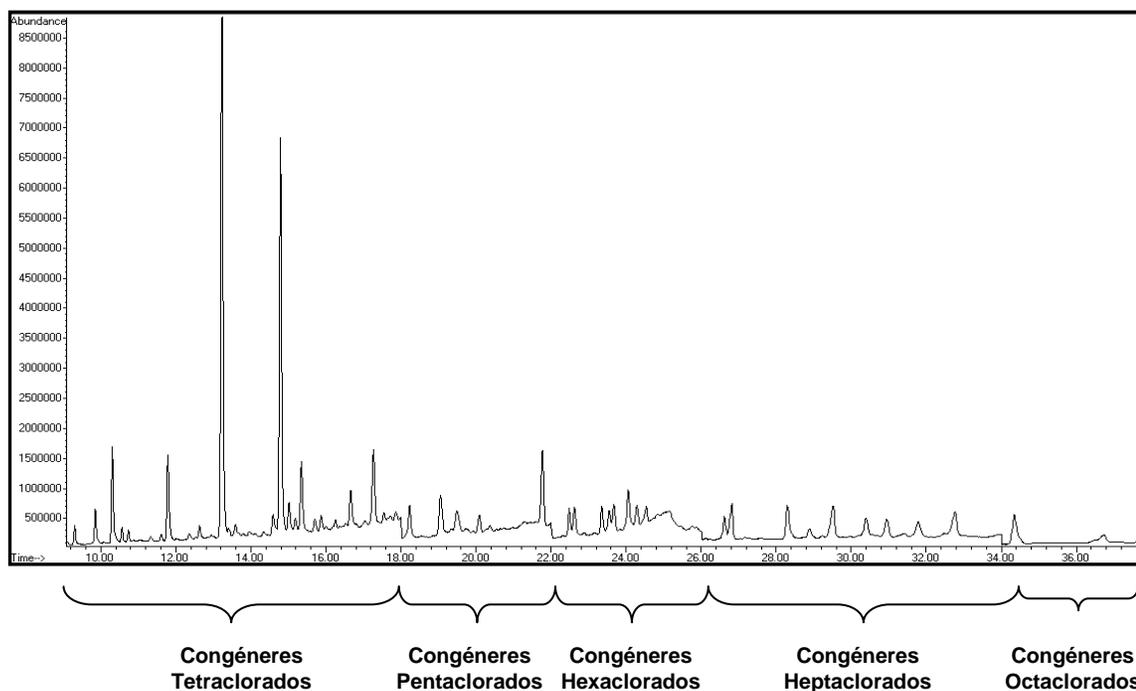


Figura 13. Cromatograma de la muestra de carne adicionada con el estándar EPA – 1613PAR, sin control de la temperatura del laboratorio.

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 posteriormente se controló la temperatura de laboratorio de modo que fuese menor o igual que 25 °C (Torres, 2006).

En la figura 14 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, recuperándose solo 8 de ellos.

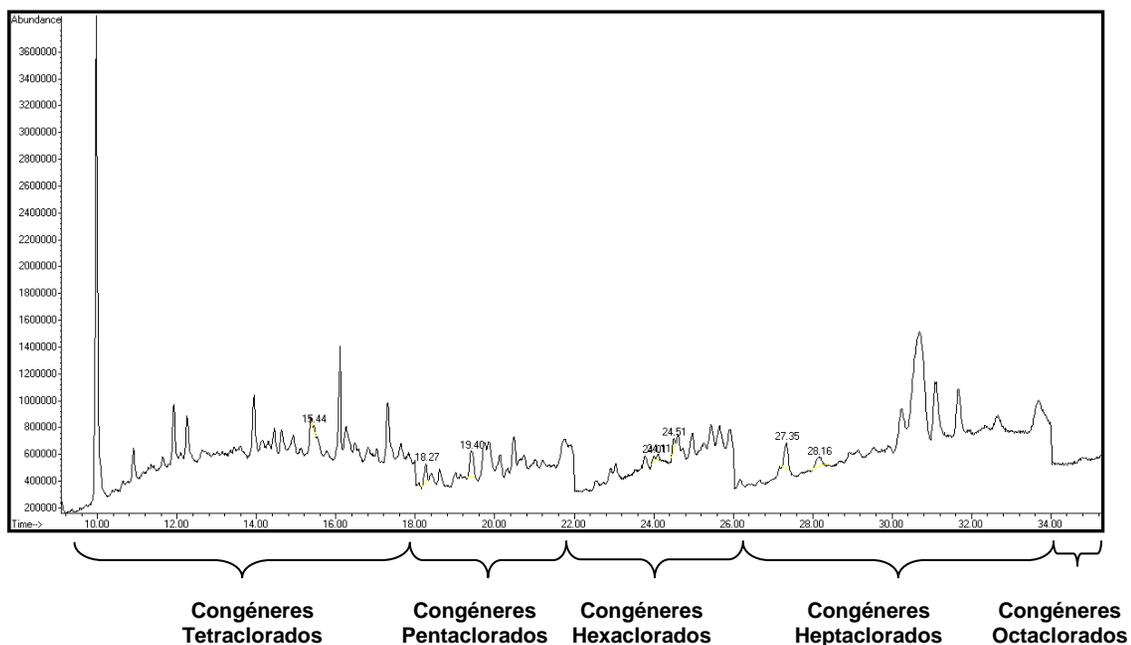


Figura 14. Cromatograma de la muestra de carne adicionada con el estándar EPA- 1613PAR, a una temperatura de laboratorio de 24 °C.

La figura 15 muestra el cromatograma de una muestra adicionada con el estándar EPA – 1613PAR, con una cantidad de grasa entre 5 y 10 g.

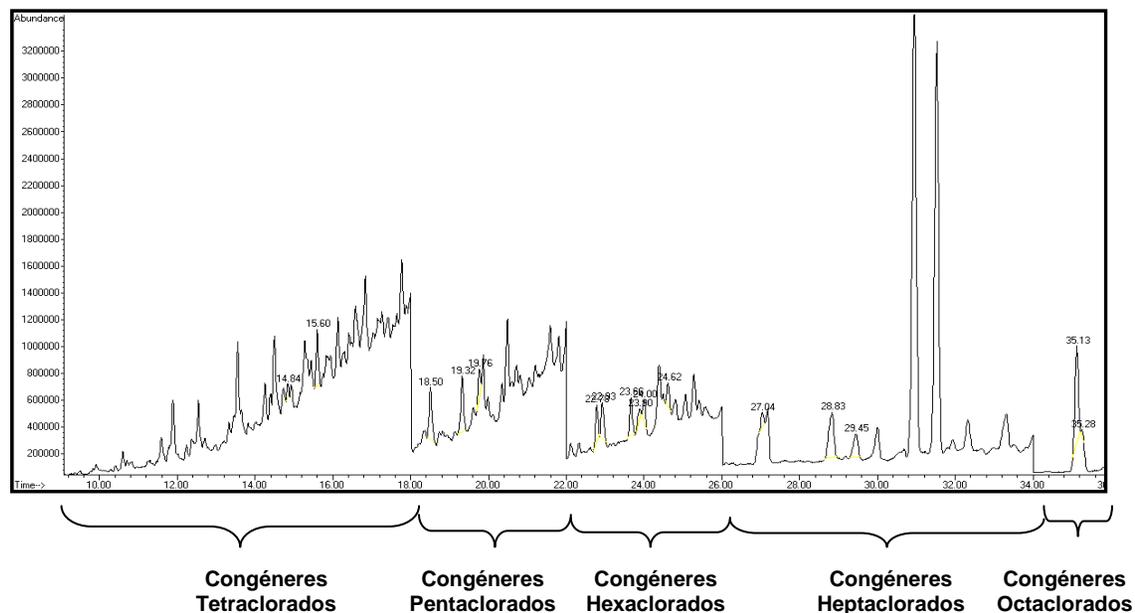


Figura 15. Cromatograma de la muestra de carne adicionada con el estándar EPA-1613PAR, con una cantidad de grasa entre 5 y 10 g de grasa.

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 hizo un mejor control en la velocidad de flujo en las columnas de purificación y fraccionamiento.

La figura 16 muestra el cromatograma obtenido de la muestra adicionada con el estándar EPA – 1613PAR, cuando 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.

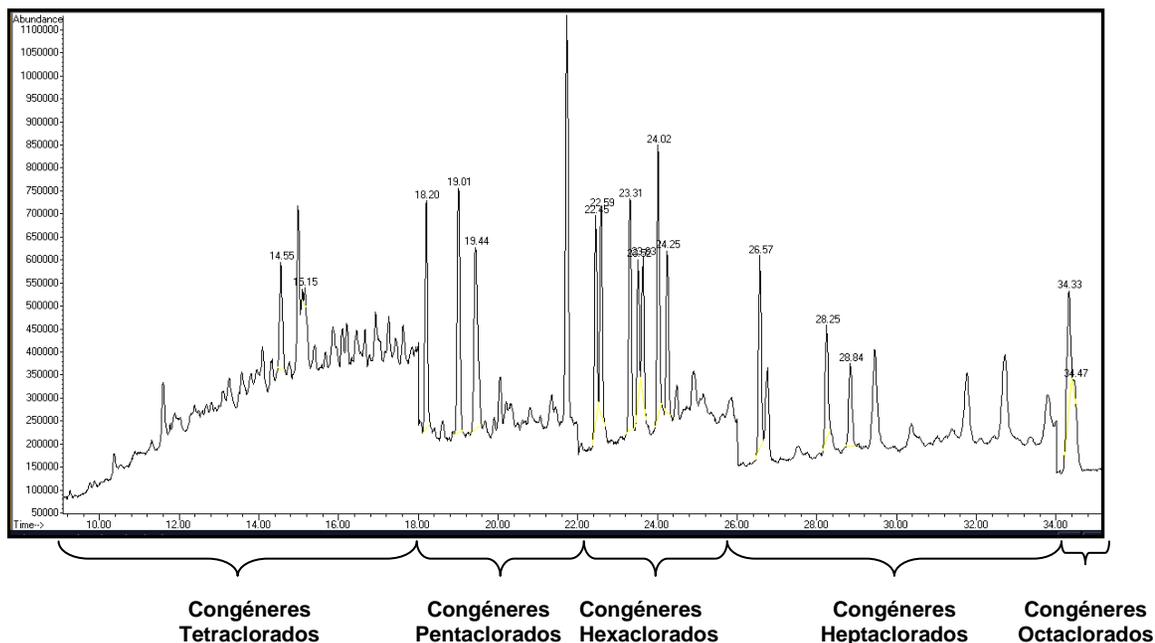


Figura 16. Cromatograma de la muestra de carne adicionada con el estándar EPA – 1613PAR, con control de la velocidad de flujo.

Considerando estos resultados, el método desarrollado de extracción y purificación de la muestra resultó ser el siguiente (Torres, 2006):

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.

4.3.2 Leche

Habiendo solucionado el problema de temperatura de laboratorio, cantidad de grasa y velocidad de flujo en las muestras de carne se procedió a trabajar con las muestras de leche. La figura 17 muestra el cromatograma obtenido de una muestra de leche adicionada con el estándar EPA – 1613PAR.

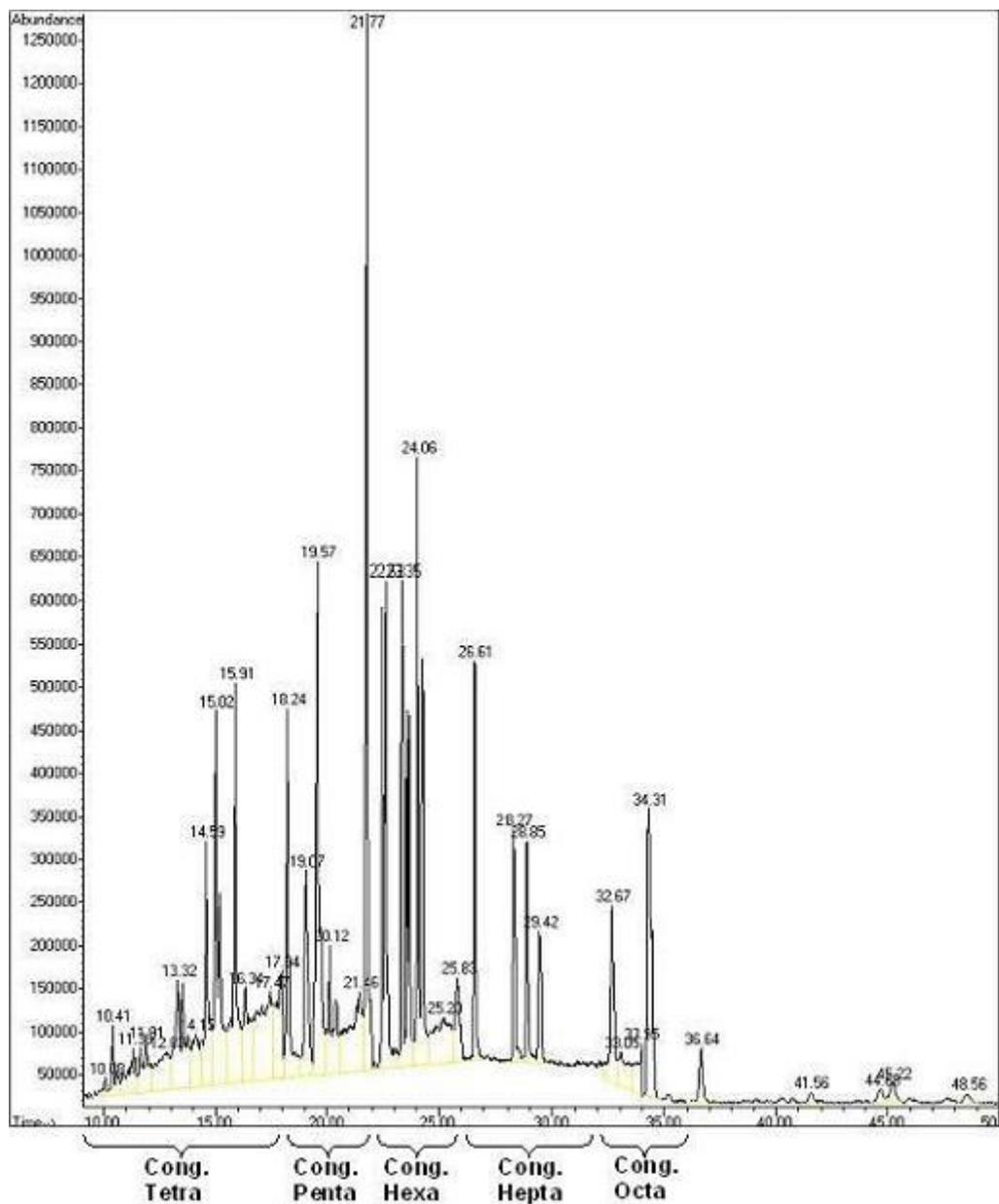


Figura 17. Cromatograma de la muestra de leche adicionada con el estándar EPA-1613PAR.

Considerando este resultado, el método desarrollado para leches resultó ser el siguiente:

- a) Tratamiento previo de la muestra
- Homogenizar la muestra y pesar 200 mL de leche para obtener entre 5 y 10 g de grasa.
 - Transferir a un embudo de separación de 2000 mL.
 - Agregar 2 g. de oxalato sódico, agitar 20 seg.
 - Agregar 200 mL de MeOH, agitar 10 seg.
 - Agregar 200 mL de dietiléter, estandar EPA 1613LCS y EPA 1613PAR en caso de recuperación, agitar 30 seg.
 - Agregar 200 mL de éter de petróleo, agitar 60 seg.
 - Reposar 24 hrs.
 - Transferir la fase orgánica y repetir desde la etapa de extracción con dietiléter.
- b) Extracción de las dioxinas
- c) Purificación y fraccionamiento
- Estas dos últimas etapas son las mismas que las correspondientes a carnes, debido a que se trata de los mismos analitos

4.4 Validación del método desarrollado

4.4.1 Porcentaje de recuperación en carnes

La exactitud del método se determinó en base al porcentaje de recuperación. En la tabla XXVIII se muestran los porcentajes de recuperación para los congéneres de PCDDs/PCDFs (Torres, 2006).

Tabla XXVIII. Porcentajes de recuperación para determinar los congéneres de PCDDs/PCDFs en carnes, n=19.

| Congéneres | Porcentaje de recuperación GC/LRMS | Porcentaje de recuperación establecido por 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% |

4.4.2 Precisión en carnes

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

Tabla XXIX. Precisión del método para determinar los 17 congéneres de PCDDs/PCDFs en carnes, n=19.

| Congéneres | Promedio %R | 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 |
| 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, 4, 7, 8, 9 – HpCDD | 112.67 | 16.07 | 14.26 |
| OCDD | 115.19 | 19.36 | 16.81 |

4.4.2 Porcentaje de recuperación en leches

En la tabla XXX se muestran los porcentajes de recuperación para los congéneres de PCDDs/PCDFs.

Tabla XXX. Porcentajes de recuperación para determinar los congéneres de PCDDs/PCDFs en leches, n=7.

| Congéneres | Porcentaje de recuperación GC/LRMS | Porcentaje de recuperación establecido por método USEPA 1613- HRGC/HRMS |
|-----------------------------|---------------------------------------|---|
| 2, 3, 7, 8 – TCDF | 79 – 133% | 24 – 169% |
| 1, 2, 3, 7, 8 – PeCDF | 89 – 120% | 24 – 185% |
| 2, 3, 4, 7, 8 – PeCDF | 67 – 102% | 21 – 178% |
| 1, 2, 3, 4, 7, 8 – HxCDF | 78 – 105% | 26 – 152% |
| 1, 2, 3, 6, 7, 8 – HxCDF | 80 – 96% | 26 – 123% |
| 2, 3, 4, 6, 7, 8 – HxCDF | 81 – 100% | 29 – 147% |
| 1, 2, 3, 7, 8, 9 – HxCDF | 83 – 100% | 28 – 136% |
| 1, 2, 3, 4, 6, 7, 8 – HpCDF | 82 – 131% | 28 – 143% |
| 1, 2, 3, 4, 7, 8, 9 – HpCDF | 82 – 93% | 26 – 138% |
| 2, 3, 7, 8 – TCDD | 134 – 162% | 25 – 164% |
| 1, 2, 3, 7, 8 – PeCDD | 126 – 153% | 25 – 181% |
| 1, 2, 3, 4, 7, 8 – HxCDD | 58 – 105% | 32 – 141% |
| 1, 2, 3, 6, 7, 8 – HxCDD | 57 – 110% | 28 – 130% |
| 1, 2, 3, 4, 7, 8, 9 – HpCDD | 78 – 125% | 23 – 140% |
| OCDD | 43 – 66% | 17 – 157% |

4.4.4 Precisión en leches

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

Tabla XXXI. Precisión del método para determinar los 17 congéneres de PCDDs/PCDFs en leches, n=7.

| Congéneres | Promedio %R | Desviación Estándar | % RSD |
|-----------------------------|----------------|------------------------|-------|
| 2, 3, 7, 8 – TCDF | 104.04 | 19.51 | 18.75 |
| 1, 2, 3, 7, 8 – PeCDF | 105.05 | 10.63 | 10.12 |
| 2, 3, 4, 7, 8 – PeCDF | 82.84 | 12.53 | 15.13 |
| 1, 2, 3, 4, 7, 8 – HxCDF | 94.89 | 11.77 | 12.40 |
| 1, 2, 3, 6, 7, 8 – HxCDF | 89.02 | 6.57 | 7.38 |
| 2, 3, 4, 6, 7, 8 – HxCDF | 93.60 | 6.29 | 6.72 |
| 1, 2, 3, 7, 8, 9 – HxCDF | 94.13 | 6.34 | 6.73 |
| 1, 2, 3, 4, 6, 7, 8 – HpCDF | 102.37 | 17.99 | 17.58 |
| 1, 2, 3, 4, 7, 8, 9 – HpCDF | 84.57 | 5.89 | 6.94 |
| 2, 3, 7, 8 – TCDD | 150.36 | 10.32 | 6.86 |
| 1, 2, 3, 7, 8 – PeCDD | 139.84 | 8.62 | 6.16 |
| 1, 2, 3, 4, 7, 8 – HxCDD | 92.09 | 15.95 | 17.32 |
| 1, 2, 3, 6, 7, 8 – HxCDD | 90.59 | 16.82 | 18.57 |
| 1, 2, 3, 4, 7, 8, 9 – HpCDD | 103.67 | 13.72 | 13.31 |
| OCDD | 53.47 | 9.08 | 16.90 |

4.5 Aplicación del método validado en muestras de carne y leche

4.5.1 Niveles de PCDDs/PCDFs en muestras de carne

La figura 18 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 pg/μL, 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 23.70 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.

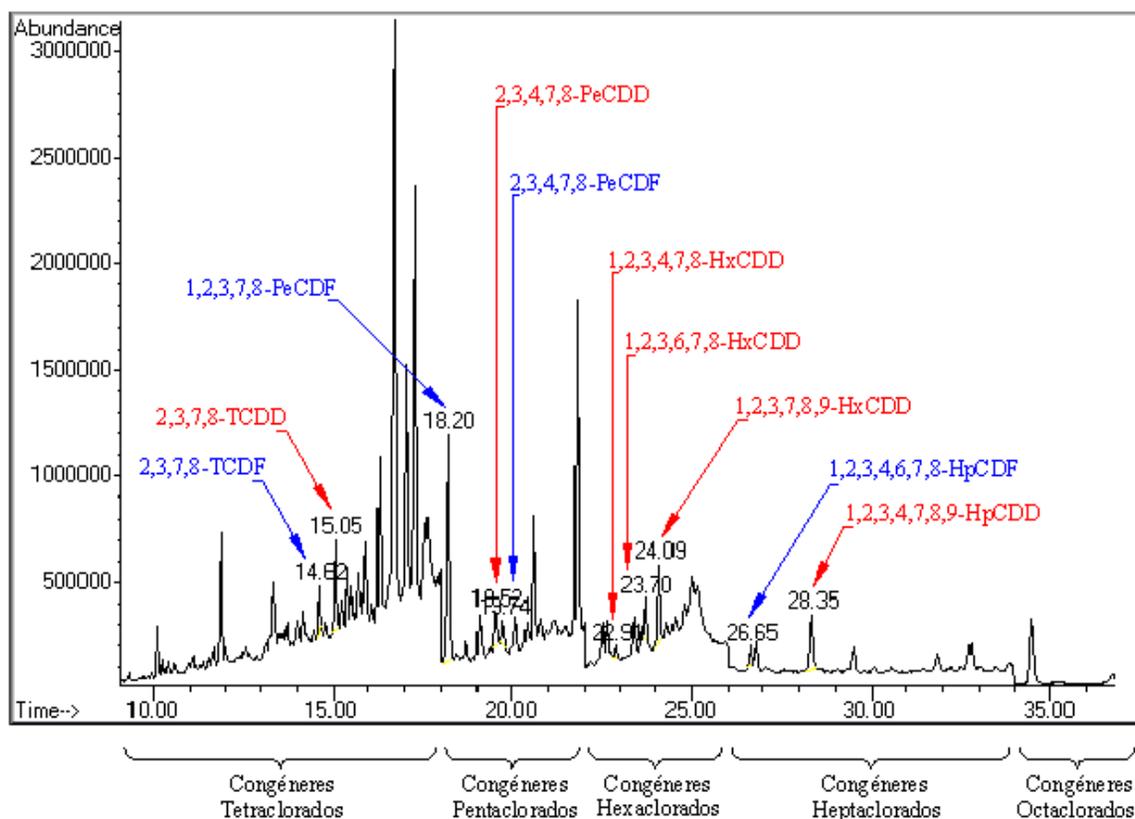


Figura 18. Cromatograma de PCDDs/PCDFs de una muestra de carne.

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 XXXII.

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

| Congéneres | C1 | C2 | C3 | C4 | C5 | C6 | C7 | C8 | C9 | C10 |
|-----------------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|------------|
| 2, 3, 7, 8 – TCDF | N.D. | 0.96 | N.D. | N.D. | N.D. | 1.57 | N.D. | N.D. | N.D. | N.D. |
| 1, 2, 3, 7, 8 – PeCDF | N.D. | 4.24 | N.D. | N.D. | 0.19 | 0.5 | ND | ND | 0.99 | N.D. |
| 2, 3, 4, 7, 8 – PeCDF | 0.28 | 6.06 | N.D. | N.D. | N.D. | N.D. | N.D. | 4.00 | N.D. | N.D. |
| 1, 2, 3, 4, 7, 8 – HxCDF | N.D. | N.D. | N.D. | N.D. | 1.95 | 1.41 | 1.11 | 21.8 | 7.96 | N.D. |
| 1, 2, 3, 6, 7, 8 – HxCDF | N.D. | N.D. | N.D. | N.D. | 0.42 | 0.27 | N.D. | 0.32 | N.D. | N.D. |
| 2, 3, 4, 6, 7, 8 – HxCDF | N.D. | N.D. | N.D. | N.D. | 0.21 | 0.27 | 0.21 | 2.50 | 0.50 | 0.38 |
| 1, 2, 3, 7, 8, 9 – HxCDF | N.D. | N.D. | N.D. | N.D. | N.D. | N.D. | 0.2 | 1.03 | N.D. | N.D. |
| 1, 2, 3, 4, 6, 7, 8 – HpCDF | 6.19 | 10.3 | 18.9 | 11.7 | 4.70 | 1.28 | 8.93 | N.D. | N.D. | N.D. |
| 1, 2, 3, 4, 7, 8, 9 – HpCDF | N.D. | N.D. | N.D. | N.D. | 0.33 | N.D. | N.D. | N.D. | N.D. | N.D. |
| OCDF | N.D. | N.D. | N.D. | N.D. | 1.03 | 0.82 | N.D. | N.D. | N.D. | N.D. |
| 2, 3, 7, 8 – TCDD | 2.84 | 0.67 | N.D. | N.D. | 0.14 | 0.14 | 1.75 | N.D. | 0.36 | 0.17 |
| 1, 2, 3, 7, 8 – PeCDD | 3.27 | 2.08 | N.D. | 2.48 | 0.25 | 0.27 | 0.40 | 0.28 | N.D. | 4.63 |
| 1, 2, 3, 4, 7, 8 – HxCDD | N.D. | 0.91 | N.D. | N.D. | 0.9 | 1.08 | N.D. | N.D. | N.D. | N.D. |
| 1, 2, 3, 6, 7, 8 – HxCDD | N.D. | 10.4 | N.D. | N.D. | 5.99 | N.D. | N.D. | N.D. | N.D. | N.D. |
| 1, 2, 3, 7, 8, 9 – HxCDD | N.D. | 4.55 | N.D. | N.D. | 0.33 | N.D. | N.D. | N.D. | N.D. | N.D. |
| 1, 2, 3, 4, 6, 7, 8 – HpCDD | N.D. | 15.4 | 6.65 | 0.78 | 32.5 | 7.56 | N.D. | 0.4 | N.D. | 0.56 |
| OCDD | N.D. | 17.6 | 1.58 | N.D. | 28.9 | 18.5 | N.D. | N.D. | 1.2 | N.D. |

N. D. = No Detectable.

4.5.2 Niveles de PCDDs/PCDFs en muestras de leche

La figura 19 muestra un cromatograma representativo de una muestra de leche. Se puede observar que se detectaron 4 congéneres de PCDDs/PCDFs, identificados como 2,3,4,7,8 – PeCDF a 19.48 min, el 1,2,3,4,7,8 – HxCDD a

23.11 min, el 1,2,3,6,7,8 – HxCDD a 23.26 min y el 1,2,3,4,6,7,8 – HpCDD a 28.12 min.

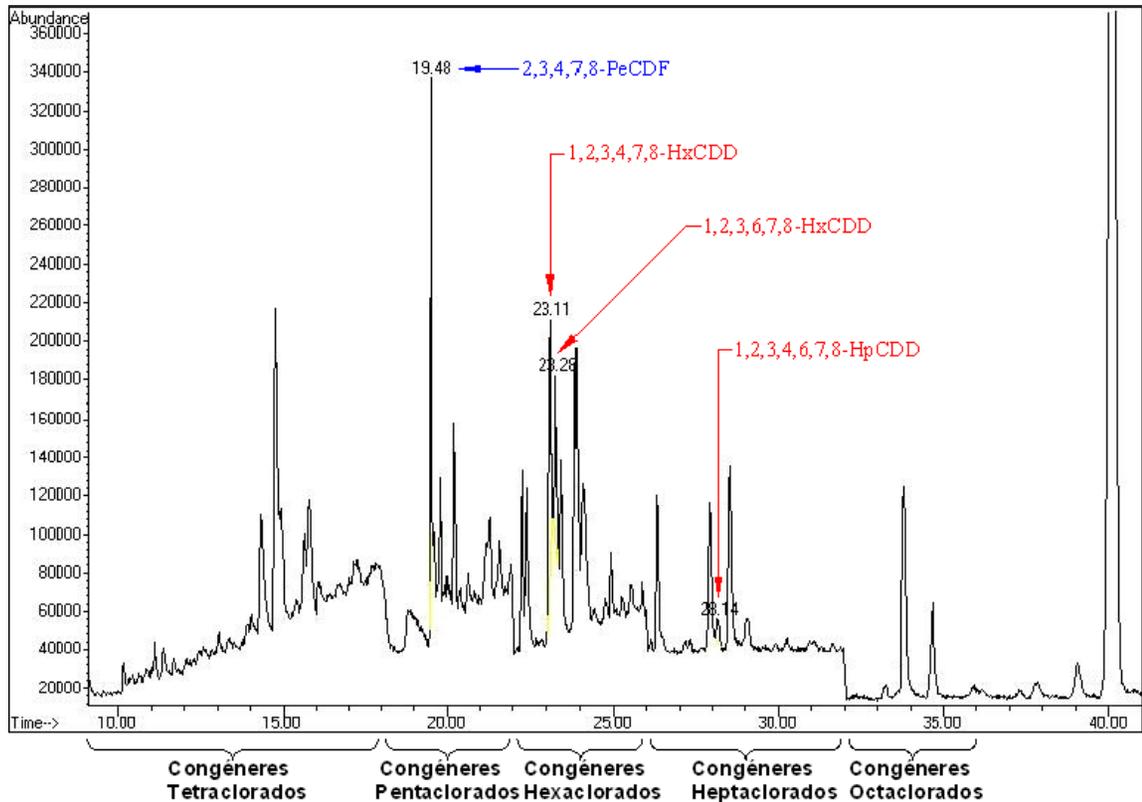


Figura 19. Cromatograma de PCDDs/PCDFs de una muestra de leche.

Los niveles de los congéneres de PCDDs/PCDFs determinados en las muestras de leche, se expresaron en pg/g de grasa, tal como se muestran en la tabla XXXIII.

Tabla XXXIII. Niveles de PCDDs/PCDFs en muestras de leche en pg/g de grasa.

| Congéneres | L1 | L2 | L3 | L4 | L5 | L6 | L7 | L8 | L9 | L10 |
|---------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|------------|
| 2,3,7,8-TCDF | N.D. | N.D. | 3.49 | N.D. |
| 1,2,3,7,8-PCDF | N.D. |
| 2,3,4,7,8-PCDF | N.D. | N.D. | N.D. | N.D. | 0.52 | N.D. | 2.64 | 1.9 | 3.17 | 3.40 |
| 1,2,3,4,7,8-HxCDF | N.D. | N.D. | N.D. | 1.43 | 5.34 | N.D. | N.D. | N.D. | N.D. | N.D. |
| 1,2,3,6,7,8-HxCDF | N.D. |
| 2,3,4,6,7,8-HxCDF | N.D. | N.D. | N.D. | N.D. | 1.28 | N.D. | N.D. | N.D. | N.D. | 1.27 |
| 1,2,3,7,8,9-HxCDF | N.D. |
| 1,2,3,4,6,7,8-HpCDF | 1.84 | 0.65 | 1.69 | 2.12 | 2.44 | 5.11 | 0.84 | N.D. | N.D. | 0.45 |
| 1,2,3,4,7,8,9-HpCDF | N.D. |
| OCDF | N.D. |
| 2,3,7,8-TCCD | N.D. |
| 1,2,3,7,8-PCCD | 1.92 | 2.80 | 2.11 | N.D. | N.D. | 1.99 | N.D. | N.D. | N.D. | N.D. |
| 1,2,3,4,7,8-HxCDD | N.D. | N.D. | N.D. | N.D. | N.D. | N.D. | 1.55 | 1.69 | 1.55 | 3.47 |
| 1,2,3,6,7,8-HxCDD | N.D. | N.D. | N.D. | N.D. | 3.36 | N.D. | 9.82 | 4.20 | 2.01 | 4.53 |
| 1,2,3,7,8,9-HxCDD | N.D. | N.D. | N.D. | N.D. | N.D. | N.D. | 0.43 | 0.46 | N.D. | 0.44 |
| 1,2,3,4,6,7,8-HpCDD | N.D. | 0.47 | 0.68 | N.D. | N.D. | N.D. | N.D. | 0.55 | 1.02 | 2.6 |
| OCDD | N.D. | 1.5 | N.D. |

N. D. = No Detectable.

4.6 Niveles de PCDDs/PCDFs de acuerdo a su Toxicidad

Multiplicando las concentraciones de PCDDs/PCDFs determinadas en las muestras de carne y leche por los valores WHO-TEF de cada congénere (tabla VI) se obtuvo los WHO-TEQ para cada una de las matrices analizadas. El total WHO-TEQ de PCDDs/PCDFs en cada muestra resulta de la suma de los WHO-TEQ de cada congénere.

4.6.1 Carne

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

Tabla XXXIV. Resultados de PCDDs/Fs en muestras de carne expresados como WHO-TEQ.

| Congéneres | C1 | C2 | C3 | C4 | C5 | C6 | C7 | C8 | C9 | C10 |
|--|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| 2,3,7,8-TCDF | N.D. | 0.096 | N.D. | N.D. | N.D. | 0.157 | N.D. | N.D. | N.D. | N.D. |
| 1,2,3,7,8-PCDF | N.D. | 0.212 | N.D. | N.D. | 0.01 | 0.025 | N.D. | N.D. | 0.045 | N.D. |
| 2,3,4,7,8-PCDF | 0.14 | 3.03 | N.D. | N.D. | N.D. | N.D. | N.D. | 0.20 | N.D. | N.D. |
| 1,2,3,4,7,8-HxCDF | N.D. | N.D. | N.D. | N.D. | 0.195 | 0.141 | 0.111 | 2.177 | 0.796 | N.D. |
| 1,2,3,6,7,8,-HxCDF | N.D. | N.D. | N.D. | N.D. | 0.042 | 0.027 | N.D. | 0.032 | N.D. | N.D. |
| 2,3,4,6,7,8-HxCDF | N.D. | N.D. | N.D. | N.D. | 0.021 | 0.027 | 0.021 | 0.25 | 0.05 | 0.038 |
| 1,2,3,7,8,9-HxCDF | N.D. | N.D. | N.D. | N.D. | N.D. | N.D. | 0.02 | 0.103 | N.D. | N.D. |
| 1,2,3,4,6,7,8-HpCDF | 0.062 | 0.103 | 0.189 | 0.117 | 0.047 | 0.013 | 0.089 | N.D. | N.D. | N.D. |
| 1,2,3,4,7,8,9-HpCDF | N.D. | N.D. | N.D. | N.D. | 0.003 | N.D. | N.D. | N.D. | N.D. | N.D. |
| OCDF | N.D. | N.D. | N.D. | N.D. | 0.001 | 0.001 | N.D. | N.D. | N.D. | N.D. |
| 2,3,7,8-TCCD | 2.84 | 0.67 | N.D. | N.D. | 0.14 | 0.14 | 1.75 | N.D. | 0.36 | 0.17 |
| 1,2,3,7,8-PCCD | 3.27 | 2.08 | N.D. | 2.48 | 0.25 | 0.27 | 0.40 | 0.28 | N.D. | 4.63 |
| 1,2,3,4,7,8-HxCDD | N.D. | 0.091 | N.D. | N.D. | 0.09 | 0.108 | N.D. | N.D. | N.D. | N.D. |
| 1,2,3,6,7,8-HxCDD | N.D. | 1.035 | N.D. | N.D. | 0.599 | N.D. | N.D. | N.D. | N.D. | N.D. |
| 1,2,3,7,8,9-HxCDD | N.D. | 0.455 | N.D. | N.D. | 0.033 | N.D. | N.D. | N.D. | N.D. | N.D. |
| 1,2,3,4,6,7,8-HpCDD | N.D. | 0.154 | 0.066 | 0.008 | 0.325 | 0.076 | N.D. | 0.004 | N.D. | 0.006 |
| OCDD | N.D. | 0.017 | 0.002 | N.D. | 0.029 | 0.018 | N.D. | N.D. | 0.001 | N.D. |
| TOTAL PCDD/F pg WHO-TEQ/g grasa | 6.31 | 7.94 | 0.26 | 2.61 | 1.79 | 1.00 | 2.39 | 3.05 | 1.25 | 4.84 |

N. D. = No Detectable.

4.6.2 Leche

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

Tabla XXXV. Resultados de PCDDs/Fs en muestras de leche expresados como WHO-TEQ.

| Congéneres | L1 | L2 | L3 | L4 | L5 | L6 | L7 | L8 | L9 | L10 |
|--|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|------------|
| 2,3,7,8-TCDF | N.D. | N.D. | 0.349 | N.D. | N.D. | N.D. | N.D. | N.D. | N.D. | N.D. |
| 1,2,3,7,8-PCDF | N.D. | N.D. |
| 2,3,4,7,8-PCDF | N.D. | N.D. | N.D. | N.D. | 0.260 | N.D. | 1.320 | 0.950 | 1.585 | 1.700 |
| 1,2,3,4,7,8-HxCDF | N.D. | N.D. | N.D. | 0.143 | 0.534 | N.D. | N.D. | N.D. | N.D. | N.D. |
| 1,2,3,6,7,8,-HxCDF | N.D. | N.D. |
| 2,3,4,6,7,8-HxCDF | N.D. | N.D. | N.D. | N.D. | 0.128 | N.D. | N.D. | N.D. | N.D. | 0.127 |
| 1,2,3,7,8,9-HxCDF | N.D. | N.D. |
| 1,2,3,4,6,7,8-HpCDF | 0.018 | 0.007 | 0.017 | 0.021 | 0.024 | 0.051 | 0.008 | N.D. | N.D. | 0.005 |
| 1,2,3,4,7,8,9-HpCDF | N.D. | N.D. |
| OCDF | N.D. | N.D. |
| 2,3,7,8-TCCD | N.D. | N.D. |
| 1,2,3,7,8-PCCD | 1.920 | 2.800 | 2.110 | N.D. | N.D. | 1.990 | N.D. | N.D. | N.D. | N.D. |
| 1,2,3,4,7,8-HxCDD | N.D. | N.D. | N.D. | N.D. | N.D. | N.D. | 0.155 | 0.169 | 0.155 | 0.347 |
| 1,2,3,6,7,8-HxCDD | N.D. | N.D. | N.D. | N.D. | 0.336 | N.D. | 0.982 | 0.42 | 0.201 | 0.453 |
| 1,2,3,7,8,9-HxCDD | N.D. | N.D. | N.D. | N.D. | N.D. | N.D. | 0.043 | 0.046 | N.D. | 0.044 |
| 1,2,3,4,6,7,8-HpCDD | N.D. | 0.005 | 0.007 | N.D. | N.D. | N.D. | N.D. | 0.006 | 0.010 | 0.026 |
| OCDD | N.D. | 0.002 | N.D. | N.D. |
| TOTAL PCDD/F WHO-TEQ (pg/g grasa) | 1.94 | 2.81 | 2.48 | 0.16 | 1.28 | 2.04 | 2.51 | 1.59 | 1.95 | 2.7 |

N. D. = No Detectable.

4.7 Comparación de Concentraciones de Equivalentes Tóxicos de PCDDs/PCDFs en muestras de carne y leche

Tres extractos obtenidos de muestras de carne y cinco extractos de muestras de leches procesadas se enviaron para analizar al Laboratorio de Dioxinas del

Instituto de Diagnóstico Ambiental y Estudios del Agua del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) en Barcelona, España, 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 XXXVI se presenta los resultados de los análisis de las tres muestras de carne por LRMS y HRMS.

Tabla XXXVI. Dioxinas de muestras de carne por GC/LRMS y HRGC/HRMS expresadas en pg WHO-TEQ/g grasa.

| Muestra | pg WHO-TEQ/ g grasa GC/LRMS | pg WHO-TEQ/ g grasa HRGC/HRMS |
|---------|--------------------------------|----------------------------------|
| 1 | 0.26 | 1.31 |
| 2 | 2.61 | 2.60 |
| 3 | 7.94 | 9.89 |

En la tabla XXXVII se presentan los resultados de los análisis de las cinco muestras de leche analizadas por LRMS y HRMS.

Tabla XXXVII. Dioxinas de muestras de leche por GC/LRMS y HRGC/HRMS expresadas en pg WHO-TEQ/g grasa.

| Muestra | pg WHO-TEQ/ g grasa GC/LRMS | pg WHO-TEQ/ g grasa HRGC/HRMS |
|-----------------|--------------------------------|----------------------------------|
| Mayo 2007 | 2.04 | 0.98 |
| Agosto 2007 | 2.51 | 0.58 |
| Agosto 2007 | 1.59 | 0.39 |
| Septiembre 2007 | 1.95 | 0.36 |
| Septiembre2007 | 2.70 | 0.32 |

En la tabla XXXVIII se presenta la comparación del perfil de los congéneres de una misma muestra de carne obtenida con LRMS y HRMS.

Tabla XXXVIII. Perfil de congéneres de PCDDs/PCDFs en muestra de carne.

| Congéneres | Muestra C | Muestra C |
|-----------------------------|-----------|-----------|
| | GC/LRMS | HRGC/HRMS |
| | pg/g | pg/g |
| 2, 3, 7, 8 – TCDF | 0.96 | 0.35 |
| 1, 2, 3, 7, 8 – PeCDF | 4.24 | 0.15 |
| 2, 3, 4, 7, 8 – PeCDF | 6.06 | 1.72 |
| 1, 2, 3, 4, 7, 8 – HxCDF | N. D. | 1.07 |
| 1, 2, 3, 6, 7, 8 – HxCDF | N. D. | 0.82 |
| 2, 3, 4, 6, 7, 8 – HxCDF | N. D. | 1.2 |
| 1, 2, 3, 7, 8, 9 – HxCDF | N. D. | 0.4 |
| 1, 2, 3, 4, 6, 7, 8 – HpCDF | 10.3 | 3.36 |
| 1, 2, 3, 4, 7, 8, 9 – HpCDF | N. D. | 0.65 |
| OCDF | N. D. | 0.94 |
| 2, 3, 7, 8 – TCDD | 0.67 | 0.34 |
| 1, 2, 3, 7, 8 – PeCDD | 2.08 | 1.34 |
| 1, 2, 3, 4, 7, 8 – HxCDD | 0.91 | 1.34 |
| 1, 2, 3, 6, 7, 8 – HxCDD | 10.35 | 36.49 |
| 1, 2, 3, 7, 8, 9 – HxCDD | 4.55 | 13.17 |
| 1, 2, 3, 4, 7, 8, 9 – HpCDD | 15.4 | 158.33 |
| OCDD | 17.6 | 216.22 |

N. D. = No Detectable.

En la tabla XXXIX se presenta la comparación del perfil de los congéneres de una misma muestra de leche obtenida con LRMS y HRMS.

Tabla XXXIX. Perfil de congéneres de PCDDs/PCDFs en muestra de leche.

| Congéneres | Muestra L12 | Muestra L12 |
|-----------------------------|-------------|-------------|
| | GC/LRMS | HRGC/HRMS |
| | pg/g | pg/g |
| 2, 3, 7, 8 – TCDF | N.D. | 0.157 |
| 1, 2, 3, 7, 8 – PeCDF | N.D. | 0.185 |
| 2, 3, 4, 7, 8 – PeCDF | 3.17 | 0.000 |
| 1, 2, 3, 4, 7, 8 – HxCDF | N. D. | 0.282 |
| 1, 2, 3, 6, 7, 8 – HxCDF | N. D. | 0.250 |
| 2, 3, 4, 6, 7, 8 – HxCDF | N. D. | 0.254 |
| 1, 2, 3, 7, 8, 9 – HxCDF | N. D. | 0.147 |
| 1, 2, 3, 4, 6, 7, 8 – HpCDF | N.D. | 0.282 |
| 1, 2, 3, 4, 7, 8, 9 – HpCDF | N. D. | 0.178 |
| OCDF | N. D. | 0.369 |
| 2, 3, 7, 8 – TCDD | N.D. | 0.147 |
| 1, 2, 3, 7, 8 – PeCDD | N.D. | 0.000 |
| 1, 2, 3, 4, 7, 8 – HxCDD | 1.55 | 0.223 |
| 1, 2, 3, 6, 7, 8 – HxCDD | 2.01 | 0.352 |
| 1, 2, 3, 7, 8, 9 – HxCDD | N.D. | 0.265 |
| 1, 2, 3, 4, 7, 8, 9 – HpCDD | 1.02 | 0.670 |
| OCDD | N.D. | 1.411 |

N. D. = No Detectable.

En la tabla XL 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 una suma total de WHO-TEQ de PCDDs/PCDFs de 7.94 en nuestro laboratorio y de 9.89 en el CSIC.

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

| Congéneres | Muestra C2 Dpto. Q. A. GC/LRMS | Muestra C2 CSIC HRGC/HRMS |
|--|---|--|
| 2, 3, 7, 8 – TCDF | 0.096 | 0.03 |
| 1, 2, 3, 7, 8 – PeCDF | 0.212 | 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 | 0.103 | 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 | 2.08 | 1.34 |
| 1, 2, 3, 4, 7, 8 – HxCDD | 0.091 | 0.13 |
| 1, 2, 3, 6, 7, 8 – HxCDD | 1.035 | 3.65 |
| 1, 2, 3, 7, 8, 9 – HxCDD | 0.455 | 1.32 |
| 1, 2, 3, 4, 7, 8, 9 – HpCDD | 0.154 | 1.58 |
| OCDD | 0.017 | 0.216 |
| TOTAL PCDD/F WHO-TEQ (pg/g grasa) | 7.94 | 9.89 |

N. D. = No Detectable.

En la tabla XLI se muestra la comparación de los resultados obtenidos de una muestra de leche en nuestro laboratorio con el equipo GC/LRMS y los obtenidos en Barcelona. Se puede observar que el total WHO-TEQ de PCDDs/PCDFs es de 1.95 en nuestro laboratorio y de 0.36 en el CSIC.

Tabla XLI. Comparación de Concentraciones de Equivalentes Tóxicos de PCDDs/PCDFs en muestra de leche.

| Congéneres | Muestra L12 Dpto. Q. A. GC/LRMS | Muestra L12 CSIC HRGC/HRMS |
|--|--|---|
| 2, 3, 7, 8 – TCDF | N.D | 0.016 |
| 1, 2, 3, 7, 8 – PeCDF | 1.585 | 0.009 |
| 2, 3, 4, 7, 8 – PeCDF | N.D. | 0.000 |
| 1, 2, 3, 4, 7, 8 – HxCDF | N.D | 0.028 |
| 1, 2, 3, 6, 7, 8 – HxCDF | N.D | 0.025 |
| 2, 3, 4, 6, 7, 8 – HxCDF | N.D | 0.025 |
| 1, 2, 3, 7, 8, 9 – HxCDF | N.D | 0.015 |
| 1, 2, 3, 4, 6, 7, 8 – HpCDF | N.D | 0.003 |
| 1, 2, 3, 4, 7, 8, 9 – HpCDF | N.D. | 0.002 |
| OCDF | N.D | 0.00004 |
| 2, 3, 7, 8 – TCDD | N.D | 0.147 |
| 1, 2, 3, 7, 8 – PeCDD | N.D | 0.000 |
| 1, 2, 3, 4, 7, 8 – HxCDD | 0.155 | 0.022 |
| 1, 2, 3, 6, 7, 8 – HxCDD | 0.201 | 0.035 |
| 1, 2, 3, 7, 8, 9 – HxCDD | N.D. | 0.026 |
| 1, 2, 3, 4, 7, 8, 9 – HpCDD | 0.010 | 0.007 |
| OCDD | N.D. | 0.0001 |
| TOTAL PCDD/F WHO-TEQ (pg/g grasa) | 1.95 | 0.36 |

N. D. = No Detectable.

4.8 Análisis Estadístico

En la figura 20 se presenta un diagrama de cajas donde se comparan los resultados obtenidos por las técnicas de detección LRMS vs HRMS en muestras de carne de res. En este diagrama se observa que los valores de tendencia central son muy similares entre las dos técnicas.

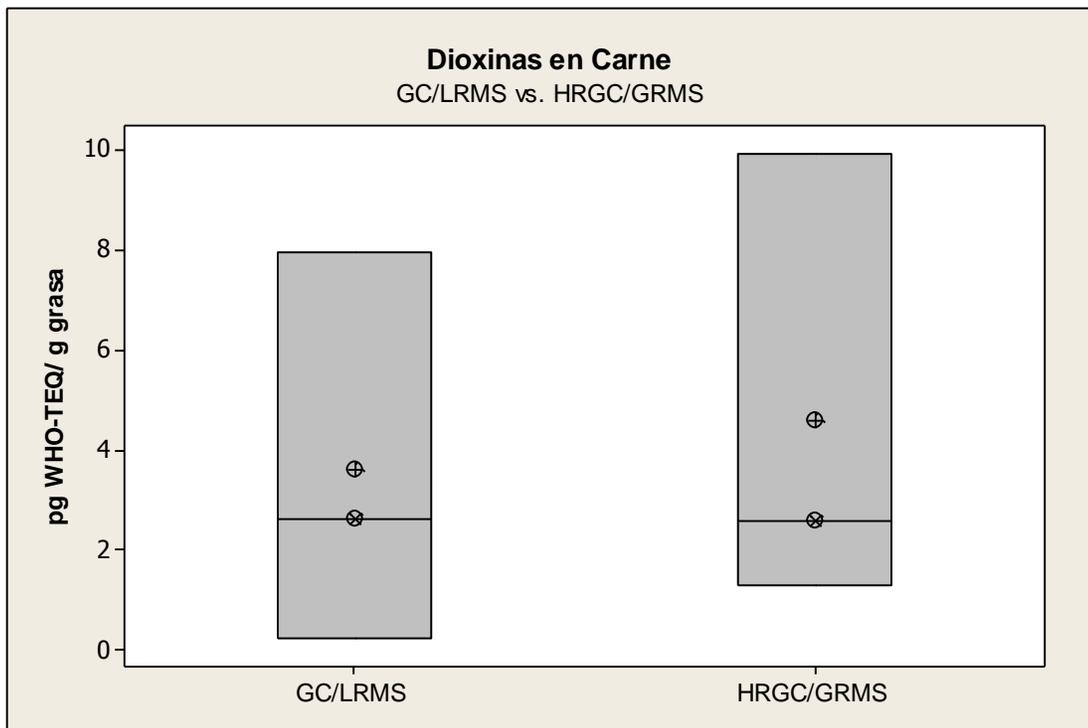


Figura 20. Comparación de WHO-TEQ obtenidos por las técnicas de detección de LRMS y HRMS).

En la figura 21 se presenta el resultado del análisis de regresión lineal de los valores WHO-TEQ obtenidos por GC/LRMS y HRGC/HRMS, para un nivel de significancia de 0.05.

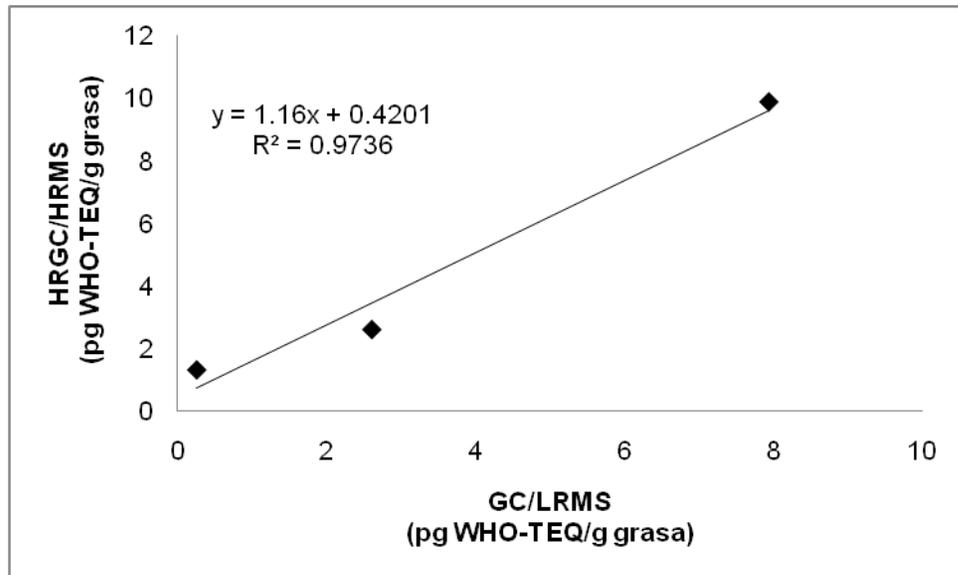


Figura 21. Analisis de regresión lineal entre WHO-TEQ-LRMS y WHO-TEQ HRMS para carnes.

En la figura 22 se presenta un diagrama de cajas comparando los resultados obtenidos por la técnica de detección LRMS vs HRMS para muestras de leche. En este diagrama se puede observar que existe una marcada diferencia entre los valores de tendencia central obtenidos mediante estas técnicas.

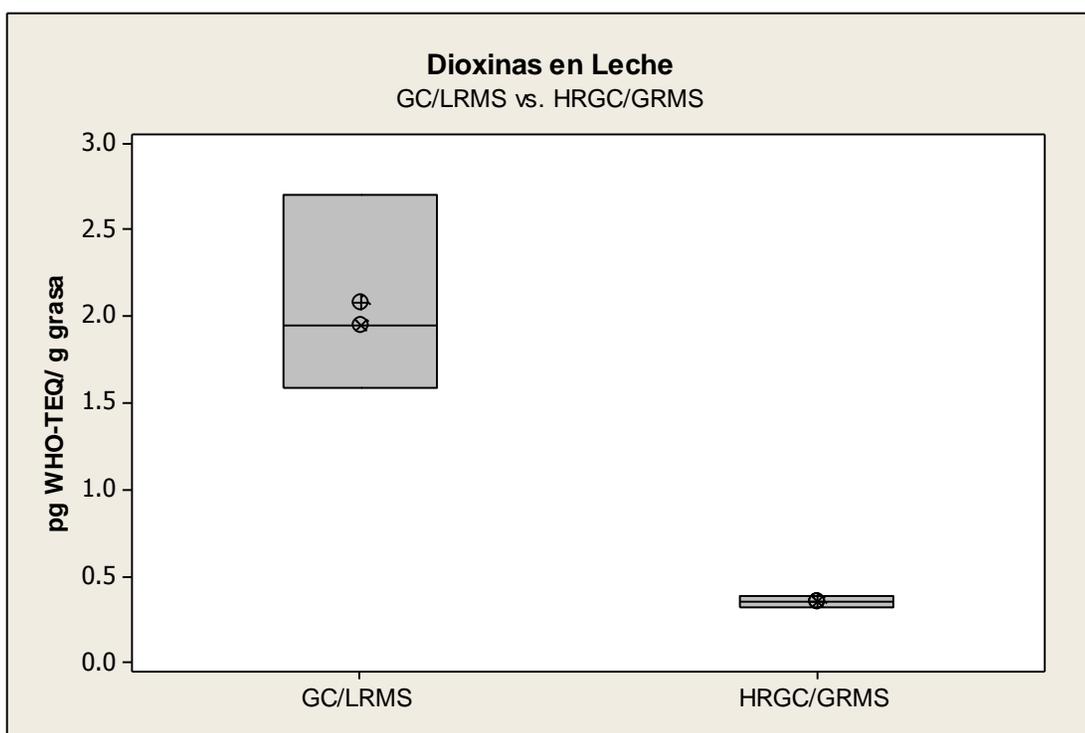


Figura 22. Comparación de WHO-TEQ obtenidos por las técnicas de detección de LRMS y HRMS.

En la figura 23 se presenta el resultado del análisis de regresión lineal de los valores WHO-TEQ obtenidos por GC/LRMS y HRGC/HRMS, para un nivel de significancia de 0.05.

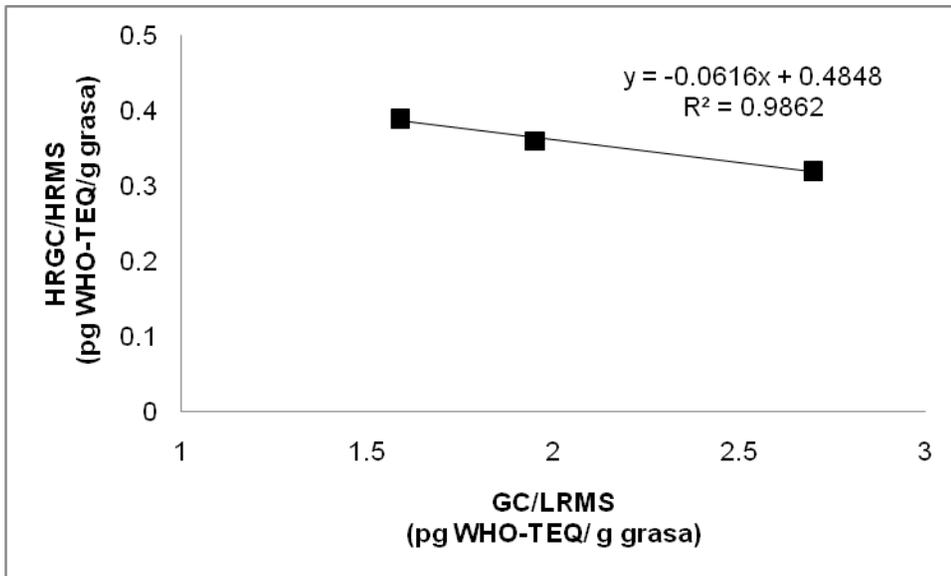


Figura 23. Análisis de regresión lineal entre WHO-TEQ-LRMS y WHO-TEQ-HRMS para leches.

4.9 Análisis de Riesgo de Dioxinas en Carne

En vista de los resultados obtenidos en las muestras de carne, se realizó un análisis de riesgo preliminar.

4.9.1 Dosis de exposición

Con los resultados de WHO-TEQ en las muestras de carne y aplicando las ecuaciones 8 y 9 se calculó la dosis de exposición a tres niveles de lo encontrado en las carnes: bajo, medio y alto. Los resultados de C y DE se muestran en la Tabla XLII.

Tabla XLII. Dosis de exposición a dioxinas por consumo de carne.

| Nivel de exposición | WHO-TEQ (pg/g de grasa) | Concentración de exposición (mg Dioxina/g carne fresca) | Dosis de exposición (mg/Kg/día) |
|---------------------|-------------------------|---|---------------------------------|
| Bajo | 0.26 | 3.9×10^{-11} | 2.26×10^{-11} |
| Medio | 3.12 | 4.68×10^{-10} | 2.72×10^{-10} |
| Alto | 7.94 | 1.19×10^{-9} | 6.92×10^{-10} |

4.9.2 Caracterización de riesgo

4.9.2.1 Efectos cancerígenos

En la base de datos del Sistema de Información Integrada de Riesgo (I.R.I.S.) de la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos se encontró que el Factor de Potencia Carcinogénica para el 2,3,7,8-TCDD es de 1.56×10^5 [mg/kg/día]⁻¹ (EPA 1985). Tomando en cuenta las dosis de exposición calculadas anteriormente y aplicando la ecuación 11 se obtuvieron los índices

de riesgo para cada uno de los niveles de exposición, los cuales se multiplicaron por los 3,595,294 habitantes del área metropolitana de Monterrey según el II Censo de Población y Vivienda 2005 del Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática (INEGI), para estimar el riesgo poblacional. Estos resultados se muestran en la tabla XLIII.

Tabla XLIII. Caracterización del riesgo carcinogénico.

| Nivel de exposición | Dosis de exposición (mg/Kg/día) | Índice de riesgo | Riesgo Poblacional (casos/habitantes) |
|---------------------|---------------------------------|-----------------------|---------------------------------------|
| Bajo | 2.26×10^{-11} | 3.5×10^{-6} | 13/3,595,294 |
| Medio | 2.72×10^{-10} | 4.24×10^{-5} | 152/3,595,294 |
| Alto | 6.92×10^{-10} | 10.8×10^{-5} | 388/3,595,294 |

4.9.2.2 Efectos no carcinogénicos

La Agencia para el registro de Enfermedades y Sustancias Tóxicas (ATSDR) de los Estados Unidos ha establecido un nivel mínimo de riesgo (MRL) en el Perfil Toxicológico para Dioxinas, para la 2,3,7,8-TCDD de 2×10^{-4} mg/kg/día para una exposición aguda por vía oral, basado en la habilidad de suprimir la actividad total en suero del complemento hemolítico en ratones B6C3F1. Así mismo ha establecido que, para una exposición crónica por vía oral, el MRL para la 2,3,7,8-TCDD es de 1×10^{-6} mg/kg/día, basado en interacciones sociales alteradas en monos expuestos prenatalmente y durante la lactancia (Schantz *et al.* 1992).

Tomando los MRL para exposición aguda y crónica por vía oral establecidos por la ATSDR y las dosis de exposición a Dioxinas por ingesta de carne se estimaron los índices de peligro (IP), los cuales se muestran en la tabla XLIV.

Tabla XLIV. Índices de peligro por ingesta de dioxina en carne.

| Nivel de exposición | Dosis de exposición (mg/Kg/día) | Índice de peligro exposición aguda | Índice de peligro exposición crónica |
|---------------------|---------------------------------|------------------------------------|--------------------------------------|
| Bajo | 2.26×10^{-11} | 1.13×10^{-7} | 2.26×10^{-5} |
| Medio | 2.72×10^{-10} | 1.39×10^{-6} | 2.79×10^{-4} |
| Alto | 6.92×10^{-10} | 2.90×10^{-6} | 5.80×10^{-4} |

CAPÍTULO 5

DISCUSIÓN

5.1 Análisis por Cromatografía de Gases/Espectrometría de Masas

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 lo es la Cromatografía de Gases acoplada a la Espectrometría de Masas.

En el presente trabajo se emplearon diferentes estándares certificados y recomendados por el método USEPA 1613. Los estándares EPA - 1613CS son soluciones de calibración y verificación (tabla XII) y se emplearon para la calibración del sistema cromatográfico. Con estos estándares se obtuvieron las respuestas relativas que se emplearon posteriormente en la cuantificación. El estándar EPA - 1613LCS es una solución stock de compuestos marcados isotópicamente (tabla XIII). Son los patrones internos de extracción y fueron empleados como patrón de referencia para la cuantificación final por el método de dilución isotópica. Permiten corregir las pérdidas de los congéneres nativos durante todo el análisis. El estándar EPA - 1613ISS es una solución de estándar interno (tabla XIII). Se empleó para calcular las recuperaciones de los patrones internos de extracción. El estándar EPA - 1613PAR es una solución

stock de recuperación y precisión. Se empleó para determinar el porcentaje de recuperación y la precisión del método (tabla XIII).

Inicialmente se trabajó empleando el sistema cromatográfico reportado por Oehme (1984), sin embargo, bajo esas condiciones los criterios de validación recomendados por el método USEPA 1613 no se cumplieron como por ejemplo la relación de abundancia de iones isotópicos. Además, se observó que los valores de los valles de los isómeros del grupo hexa fueron del 30%, siendo estos valores muy altos (figura 8). Para que las condiciones cromatográficas se consideren aceptables la relación entre la altura del valle que forman la 2,3,7,8 – TCDD respecto a la 1,2,3,7/1,2,3,8 – TCDD y la 1,2,3,4,7,8 – HxCDD respecto a la 1,2,3,6,7,8 – HxCDD, debe ser menor que 25%, según lo recomendado por el método EPA 1613. Esto, debido a que los tiempos de retención entre los isómeros mencionados son muy cercanos.

Por esta razón 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 (figura 10).

Inicialmente el GC/LRMS se operó en modo SCAN y posteriormente en modo SIM, para definir los tiempos de retención. En la figura 10 se observan los intervalos de tiempo definidos para cada grupo de analito. De acuerdo al orden de elución, dichos intervalos para los congéneres tetraclorados están entre 9 y

18 minutos, para los congéneres pentaclorados entre 18 y 22 minutos, para los congéneres hexaclorados entre 22 y 26 minutos, para los congéneres heptaclorados entre 26 y 32 minutos y para los congéneres octaclorados entre 32 y 36 minutos.

5.2 Validación del sistema cromatográfico

En la tabla XXVII se presenta el resumen de los datos de validación del sistema cromatográfico obtenidos. Se ha considerado sólo a la 2,3,7,8-TCDD y al 2,3,7,8-TCDF debido a que estos congéneres se encuentran en menor concentración y además la 2,3,7,8-TCDD es la más tóxica. Estos resultados 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%. El resultado obtenido fue de 16% para TCDD, 19.60% para HxCDD y 9.76% para HxCDF. Una vez cumplido el criterio para 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 cercanos y pudieron ser resueltos sin dificultad.

El criterio de relación de abundancia de iones isotópicos es importante por que los diferentes isómeros de las dioxinas y furanos se identifican específicamente por la señal que presentan dos de los iones característicos (ión primario M y ión secundario M+2 o M+4). En la tabla XV se muestra 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.

El nivel mínimo cuantificable (LOQ) está definido como la relación Señal/Ruido (S/N) de la concentración más baja de la mezcla de los estándares de calibración y verificación (estándar EPA - 1613CS). Esta relación debe ser superior a 10 y de acuerdo a los resultados obtenidos, esta relación se cumplió a partir de la concentración de 2 pg/μL para los PCDDs y de 1 pg/μL para los PCDFs. A una concentración de 0.5 pg/μL de TCDD se observó una relación señal ruido de 4.7, la cual se consideró como Límite de Detección. Para TCDF se observó una señal/ruido de 8.8 para la misma concentración. De esta manera se consideró que el Límite de Detección (LOD) fue 0.5 pg/μL para ambos y el Límite de Cuantificación es de 2 pg/μL para los PCDDs y de 1 pg/μL para los PCDFs. En la figura 12 se muestra la relación Señal/Ruido de TCDD a una concentración de 0.5 pg/μL. En la tabla XVI se muestra la relación S/N del resto de congéneres y las concentraciones señaladas corresponden al LOD de dichos congéneres.

Con respecto a los resultados de la linealidad, expresada como porcentaje del coeficiente de variación (CV) de las respuestas relativas, se presentan en las tablas XVII y XVIII para TCDD y TCDF respectivamente. Los CV de las respuestas relativas deben estar por debajo del 20% de acuerdo al método USEPA 1613. Se observó que para la TCDD se cumple a partir de 2 pg/μL y para el TCDF a partir de 0.5 pg/μL. De esta manera se estableció que para la

tetra dioxina el intervalo lineal fue de 2 a 200 pg/ μ L, con un CV de la respuesta relativa intradía de 4.09% y de interdía de 5.09%. Para el tetra furano el intervalo lineal fue de 0.5 a 200 pg/ μ L con un CV de respuesta relativa intradía de 16.65% y de interdía de 11.65%. Estos CV de las respuestas relativas mencionadas están por debajo del 20%, valor que recomienda el método USEPA 1613, y por tanto se aceptan.

El CV de las respuestas relativas del resto de congéneres de dioxinas y furanos están dentro de lo que recomienda la EPA como se demuestra en las tablas XIX, XX, XXI, XXII, XXIII, XXIV, XXV y XXVI.

5.3 Extracción y purificación de dioxinas en muestras de carne y leche

Se implementó el método USEPA 1613 con modificaciones realizadas en el Laboratorio de Dioxinas del Instituto de Diagnóstico Ambiental y Estudios del Agua del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) en Barcelona, España, (USEPA 1994; Abad *et al.*1997, 2000).

La metodología analítica empleada para la determinación de dioxinas comprende 4 etapas fundamentales:

1. **Toma de muestra**, que depende del tipo de matriz.
2. **Extracción**, que también depende del tipo de matriz. Por ejemplo, la extracción con soxhlet para muestras sólidas o la extracción líquido-líquido en el caso de muestras acuosas.

3. **Purificación y Fraccionamiento** del extracto, que se realizan con adsorbentes de diversa naturaleza, tales como sílice, florisil, alúmina o diferentes tipos de carbón activado.
4. **Separación y Detección** específica de los isómeros de interés mediante Cromatografía de Gases acoplada a la Espectrometría de Masas de Alta Resolución (HRGC/HRMS).

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 fue selectiva por el uso de los adsorbentes, y por lo tanto pudimos obtener muy buenos resultados para poder identificar muestras contaminadas (IARC, 1997; Eljarrat *et al.* 1995).

Se ha trabajado con Cromatografía de Gases acoplada a la Espectrometría de Masas de Baja Resolución (GC/LRMS), considerando el alto costo que representa la adquisición de un HRGC/HRMS.

Debido al carácter lipofílico de las dioxinas, éstas se encuentran en el contenido graso de los alimentos, de manera que primero se determinó el contenido graso de las carnes y las leches.

Una vez extraída la grasa, se procedió con la extracción de las dioxinas. Para esto se trabajó en grasa de muestras de carne a la que se le adicionó el estándar EPA-1613PAR que contiene la mezcla de los 17 congéneres nativos. 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. El objetivo de esta etapa analítica es recuperar en forma cuantitativa las dioxinas y los furanos contenidos en las muestras mediante procedimientos adecuados. Sin embargo, un gran número de sustancias son coextraídas simultáneamente. Esto obliga a incluir en la metodología etapas de purificación y fraccionamiento del extracto que permitan la eliminación de las sustancias interferentes y el aislamiento a un nivel aceptable de los analitos.

En la etapa de purificación y fraccionamiento conocida también como de “cleanup”, se emplearon tres tipos de columnas: de sílica gel modificada, de florisil y de alúmina. La columna de sílica gel modificada se acopló en tándem a la columna de florisil.

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, que está rellena de florisil, un adsorbente compuesto de dióxido de silicio y de óxido de magnesio, 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. El trabajo en tándem con la columna de sílice modificada y la columna de florisil, optimizada por Abad (2000), reduce el consumo de disolvente y se eliminan etapas intermedias, que hacen aumentar el tiempo de análisis y pueden dar lugar a pérdidas de los analitos (Abad *et al.* 2000; Ábalos 2009).

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.

La eficacia de cada una de las etapas de purificación y fraccionamiento descritas se evaluó mediante el análisis de los extractos correspondientes por GC/LRMS. Las fracciones 1 y 2 de la columna de alúmina no presentaron ninguno de los 17 congéneres analizados. De la misma manera la fracción 4 tampoco presentó ninguno de los congéneres.

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. Posiblemente las dioxinas fueron arrastradas por los solventes y por eso no aparecen las señales en el cromatograma (figura 13).

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 14). Si la cantidad de grasa era menor 5 g o mayor de 10 g no se alcanzaba a observar todos los congéneres. En caso escasez de grasa no se extraen todos los congéneres y cuando hay exceso de grasa se saturan. Así mismo, se controló la velocidad del flujo de la elución de los analitos en la etapa de purificación y fraccionamiento. A flujo rápido no se eluyen completamente los analitos, a flujo lento se eluyen mejor.

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 obtuvieron los mejores porcentajes de recuperación de todos los congéneres. Además de esto, los resultados fueron reproducibles (figura 16).

Optimizadas las condiciones de extracción de dioxinas en muestras de carne, se procedió a trabajar con muestras de leche, obteniéndose resultados satisfactorios figura 17.

5.4 Validación del método desarrollado

5.4.1 Porcentaje de recuperación en carnes

La exactitud del método se evaluó en base al porcentaje de recuperación. En la tabla XXVIII 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 ligeramente 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 ligeramente altos en el límite superior comparados con los de Ferrario *et al.* 1996, Petroske *et al.* 1998 y Huwe *et al.* 2005.

Ferrario (1996) empleó un sistema de extracción similar al nuestro, pero utilizó columna de carbón en vez de florisil y alúmina, el análisis se realizó con HRGC/HRMS, y los porcentajes de recuperación que obtuvo fueron de 48% a 139 %. Petroske (1998) utilizó un sistema automatizado de purificación y

fraccionamiento, y el análisis se llevó a cabo con 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).

5.4.2 Precisión en carnes

La precisión se calculó en función del porcentaje de desviación estándar relativa y los resultados se observan en la tabla XXIX. 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 establecido por la CE, que señala que debe ser menor que 30% (Commission Directive 2002/69 EC). Estos resultados fueron similares a los reportados por Ferrario *et al.* (1996), que fueron de de 9.6% para 1,2,3,7,8,9-HxCDD y de 16.7% para 1,2,3,4,7,8-HxCDF y fueron menores a los reportados para el sistema automatizado de purificación y fraccionamiento, que alcanzaron valores de hasta 25% (Petroske *et al.* 1998).

5.4.3 Porcentaje de recuperación en leches

La exactitud del método se evaluó en base al porcentaje de recuperación. La recuperación más baja fue de 43% para 1,2,3,6,7,8-HxCDD y la más alta de 162% para 2,3,7,8-TCDD (tabla XXX). En este caso todos los % de recuperación obtenidos se encuentran dentro de los rangos establecidos por el método USEPA, los cuales son variados para cada congéneres debido a su complejidad, como se observa en la tabla XXX (USEPA 1994; Ramos *et al.*,

1999). Ramos (1999), reportó un promedio de recuperación de 101% para 2,3,7,8-TCDD y 95% para 1,2,3,4,7,8-HxCDD, nosotros reportamos 150% y 92.09% respectivamente.

5.4.4 Precisión en leches

La precisión se calculó en función del porcentaje de desviación estándar relativa (RSD). Se obtuvieron resultados que van desde 6.16% hasta 18.75%, el primero correspondió al 1,2,3,7,8 – PeCDD y el segundo al 2,3,7,8 – TCDF, cumpliendo con el criterio establecido por la CE , que señala que debe ser menor que 30% (Commission Directive 2002/69) (Tabla XXXI). Ramos (1999), reportó una RSD de 6.9% para TCDD y para 1,2,3,4,7,8-HxCDD 11%, nosotros reportamos 6.86% y 17.32% respectivamente.

5.5 Niveles de PCDDs/PCDFs en muestras de carne

En la figura 18 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 extrajeron y analizaron 10 muestras de carne. Las concentraciones de los congéneres individuales variaron desde no detectados (N.D) hasta 32.54 pg/g en base al peso lipídico. Todos los valores fueron ajustados al contenido graso de la muestra dividiendo la concentración encontrada entre el % de lípido de cada muestra (tabla XXXII).

Uno de los aspectos interesantes de la presencia de PCDDs/PCDFs en la carne de res, se refiere a la existencia particular de mezcla compleja de congéneres tóxicos y no tóxicos. En la distribución de congéneres los más dominantes fueron las dioxinas, siendo la más abundante el 1,2,3,4,7,8,9-HpCDD con un rango de 0.40 a 32.54 pg/g grasa, seguido de la OCDD con un rango de 1.20 a 28.93 pg/g grasa (tabla XXXII). Sin embargo estos valores altos no son importantes en el valor TEQ, debido a que sus valores TEF son bajos de 0.01 y 0.0001 respectivamente. Lo mismo sucede con el 1,2,3,4,7,8-HxCDF que se encontró en un rango de 1.11 a 21.74 pg/g grasa cuyo valor TEF es de 0.1. Sin embargo, la presencia de 2,3,7,8-TCDD y 1,2,3,7,8-PeCDD con niveles de 0.11 a 2.84 pg/g grasa y 0.25 a 4.63 pg/g grasa respectivamente, y cuyos valores TEF son de 1, indica la existencia de muestras contaminadas, que pudieran significar un factor de riesgo.

Los congéneres dominantes en nuestras muestras fueron, en caso de los furanos: 2,3,4,7,8-PeCDF y 1,2,3,4,7,8-HxCDF, y, entre las dioxinas: 1,2,3,6,7,8-HxCDD y 1,2,3,7,8,9-HxCDD, la concentración más baja encontrada fue para la 1,2,3,4,7,8-HxCDD (tablas XXXII y XXXVIII). El perfil de congéneres hallado fue muy similar al reportado por otros autores en carne de res como Schechter *et al.* (1994) en EE.UU, Focant *et al.* (2002) en Bélgica y Kim *et al.* (2008) en Corea.

Eljarrat *et al.* (2002) en España, también encontraron altas concentraciones de 1,2,3,4,6,7,8-HpCDD y OCDD (18.75 y 46.60 pg/g de grasa, respectivamente) en muestras de carne de res, siendo similares a valores reportados en el

presente trabajo para estos congéneres. Huwe *et al.* (2005) reportan resultados similares para 1,2,3,4,6,7,8-HpCDD (6.04 pg/g grasa) en carne de res de mercados de Carne de Estados Unidos, siendo este congéneres el de más alta concentración.

5.6 Niveles de PCDDs/PCDFs en muestras de leche

En la figura 19 se muestra el cromatograma de una muestra de leche. Se puede observar que se detectaron 4 congéneres de PCDDs/PCDFs, identificados como el 2,3,4,7,8-PeCDF a 19.48 min, la 1,2,3,4,7,8-HxCDD a 23.11 min, la 1,2,3,6,7,8-HxCDD a 23.26 min y la 1,2,3,4,6,7,8-HpCDD a 28.12 min.

Con el método validado se analizaron 10 muestras de leche. Las concentraciones de los congéneres individuales variaron desde no detectados (ND) hasta 9.82 pg/g en base al peso lipídico. En la tabla XXXIII se muestran los contenidos de los congéneres encontrados en las muestras analizadas expresados en pg/g de grasa. Todos los valores fueron ajustados al contenido graso de la muestra. Para calcular el promedio de cada congéneres también se tomaron en cuenta las muestras donde no se detectaron, asignándoles el valor de cero. El LOD de los congéneres individuales estuvieron entre 0.14 a 0.71 pg/g grasa.

Los valores máximos reportados de cada congéneres en las muestras de leches, fueron semejantes a los reportados por países industrializados (Liem *et al.*

1990; Focant *et al.* 2003). La 2,3,7,8-TCDD no fue detectada. La 1,2,3,6,7,8-HxCDD fue la más abundante (tablas XXXIII y XXXIX), con un rango de 2.01 a 9.82 pg/g grasa, con una media de 2.39 siendo este valor mayor que el reportado por Liem *et al.* (1990) con una media de 2 pg/g grasa.

Dentro de los PCDFs, el más abundante fue el 1,2,3,4,7,8-HxCDF con un rango de 1.43 a 5.34 pg/g grasa; estos valores son menores a los reportados por Turrio-Baldassarri *et al.* (2009) que son de 4.5 a 11.9 pg/g grasa en leches de vaca en Brescia, Italia.

5.7 Niveles de PCDDs/PCDFs de acuerdo a su Toxicidad en carnes

Los grados de toxicidad de los PCDDs/PCDFs se expresan a nivel mundial en pg WHO-TEQ/ g grasa (Van den Berg *et al.* 1998). Para ser expresados de esta forma se emplearon las concentraciones determinadas de cada congénere y los valores TEF de cada uno de ellos. Los valores pg WHO-TEQ/g en base al contenido graso de las muestras de carne analizadas se presentan en la tabla XXXIV.

Los niveles encontrados varían entre 0.26 a 7.94 pg WHO-TEQ/g grasa, con un promedio de 3.12. Estos resultados son muy similares a los reportados por Liem *et al.* (2000), los cuales están en el rango de 0.3 a 7.2 WHO-TEQ pg/g grasa en muestras de carne de res.

El valor promedio determinado es mayor al reportado por Eljarrat en 2002, en un programa de vigilancia de PCDDs/PCDFs en diferentes alimentos, para carne el valor reportado fue 1.19 pg WHO-TEQ/g grasa, sin embargo la cantidad más alta que reportó fue de 3.91 pg WHO-TEQ/g grasa de carne de res, considerándose por tanto que ellos también detectaron muestras contaminadas debido a que sobrepasaron los límites permisibles de la CE (Eljarrat *et al.* 2002).

En la Fig. 18 se muestra el cromatograma de una muestra de carne contaminada (7.94 pg WHO-TEQ/g grasa), en la cual se detectó 0.67 pg/g grasa de 2,3,7,8-TCDD.

Cuatro muestras de las 10 analizadas presentaron concentraciones de 6.31, 7.94, 3.05 y 4.84 pg WHO-TEQ/g grasa. Estas concentraciones exceden el límite máximo permitido por la regulación de la Comunidad Europea que es de 3 pg WHO-TEQ PCDDs/PCDFs/g peso grasa (Commission Regulation 199/2006/EC). Por tanto las 4 muestras se identificaron como muestras contaminadas. Estos resultados son un foco de alarma que nos señala la existencia de alimentos contaminados en nuestro país.

Por otro lado, debido a que es necesario conocer el origen de esta contaminación, conviene realizar estudios para evaluar el pienso o las áreas de pastizales, tal como se señala en la literatura (Bernard *et al.* 1999; Ferrario *et al.*

2000; Malish, 2000; Llerena *et al.* 20003; Hoogenboon *et al.* 2007; Kim *et al.* 2008).

Es importante señalar que en México no existen reportes de casos de contaminación en 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.

5.8 Niveles de PCDDs/PCDFs de acuerdo a su Toxicidad en leches

La tabla XXXV presenta las concentraciones de PCDDs y PCDFs expresados en pg WHO-TEQ/g en base al contenido graso de las leches analizadas. Los niveles encontrados varían entre 0.16 y 2.81 pg WHO-TEQ/g grasa con un promedio de 1.95, los cuales están por debajo del límite máximo permitido por la Comunidad Europea que es de 3 pg WHO-TEQ/g grasa de leche (Commission Regulation 199/2006/EC), por tanto ninguna muestra de las analizadas se considera contaminada.

Al comparar con los datos disponibles en la literatura sobre leches y productos lácteos con los resultados obtenidos, se observa que los niveles medidos en el presente estudio no son tan diferentes a los niveles determinados en diferentes países de la Unión Europea. Así, Ramos *et al.* (1997) reportó un promedio de 0.73 pg I-TEQs/ g grasa en leches pasteurizadas de vaca y un rango de 0.67 a 3.80 pg I-TEQs/ g grasa en leche bronca de vaca, en un estudio realizado en

Asturias, España. Eljarrat *et al.* (2002), también en España, en un programa de vigilancia de PCDDs/PCDFs en diferentes alimentos reportó para leches un promedio de 0.81 pg WHO-TEQ/g grasa con una cantidad máxima de 1.14 pg WHO-TEQ/g grasa de leche. Fernández *et al.* (2004) en un estudio realizado también en España, reporta un promedio de 0.89 pg WHO-TEQ/g grasa para leches pasteurizadas de vaca. Focant *et al.* (2002) en un estudio realizado en Bélgica reporta para leches pasteurizadas de vaca de 0.86 a 1.59 pg WHO-TEQ/g grasa de leche.

5.9 Comparación de Concentraciones de Equivalentes Tóxicos de PCDDs/PCDFs en muestras de carne y leche

Carnes

Para validar el método de LRMS, tres muestras de carne procesadas fueron enviadas al Laboratorio de Dioxinas del CSIC de Barcelona, España, donde se analizaron en un equipo de Cromatografía de Gases de Alta Resolución con un Detector de Espectrometría de Masas de Alta Resolución (HRGC/HRMS); esto debido a que los métodos oficiales de la EPA y CE se han establecido con equipos de alta resolución. Con este equipo se reportaron valores desde 1.31 hasta 9.89 pg WHO-TEQ de PCDDs/PCDFs/ g grasa mientras que en nuestro laboratorio se reportaron valores de 0.26 a 7.94 para las mismas muestras (tabla XXXVI). En la muestra donde se detectó 7.94 pg WHO-TEQ de PCDDs/PCDFs/ g grasa por LRMS, se detectó 9.89 pg WHO-TEQ de PCDDs/PCDFs/ g grasa por HRMS (tabla XL). Ambas muestras fueron identificadas como muestra contaminada según lo establecido por la

Comunidad Europea. Los congéneres no detectados en GC/LRMS, pudieron ser detectados en HRGC/HRMS, pero están en concentraciones pequeñas, y además no influyen mucho en el valor total WHO-TEQ. Las otras dos muestras analizadas por los dos métodos se reportaron como no contaminadas. En estas muestras se detectó 0.26 y 2.61 pg WHO-TEQ de PCDDs/PCDFs/ g grasa por LRMS, 1.31 y 2.60 pg WHO-TEQ de PCDDs/PCDFs/ g grasa por HRMS.

Leches

Del mismo modo, para validar el método de LRMS para leches, cinco muestras de leche procesadas en nuestro laboratorio por el método desarrollado fueron enviadas al Laboratorio de Dioxinas del CSIC de Barcelona, España, donde se analizaron en un equipo de Cromatografía de Gases de Alta Resolución con un Detector de Espectrometría de Masas de Alta Resolución (HRGC/HRMS); esto también debido a que los métodos oficiales de la EPA y CE se han establecido con equipos de alta resolución. Con este equipo se reportaron valores desde 0.32 hasta 0.98 pg WHO-TEQ de PCDDs/PCDFs/ g grasa mientras que en nuestro laboratorio se reportaron valores de 1.59 a 2.70 para las mismas muestras (Tabla XXXVII).

Aún cuando se obtuvieron resultados de concentración mayores a los obtenidos en el laboratorio de referencia, ambos coinciden en señalar que las muestras no están contaminadas según lo establecido por la Comunidad Europea. Se puede observar que existen congéneres que no se han detectado en GC/LRMS y que en HRGC/HRMS han sido detectados en concentraciones muy bajas. A su vez,

existen congéneres detectados en mayor concentración en GC/LRMS que en HRGC/HRMS (tabla XLI), esto se puede deber a que debido al menor poder de resolución del equipo utilizado es probable que se cuantifiquen compuestos diferentes al compuesto de interés.

5.10 Análisis Estadístico

Se realizó un análisis de varianza ($\alpha < 0.05$) con los resultados obtenidos por GC/LRMS y HRGC/HRMS en carnes, para saber si existía diferencia significativa entre las técnicas de detección (GC/LRMS vs HRGC/HRMS); se encontró que no hay diferencia significativa entre las dos técnicas ($p = 0.7903$), esto mismo se comprueba en el diagrama de cajas (figura 20), donde se puede observar que la distribución de los datos son similares.

Luego se procedió a realizar un análisis de regresión lineal, con la finalidad de encontrar un modelo que permita describir la relación entre los WHO-TEQ detectados por ambas técnicas. Los resultados obtenidos indicaron la existencia de una correlación lineal ($r^2 = 0.9736$) entre los WHO-TEQ obtenidos por GC/LRMS y HRGC/HRMS (figura 21). Por lo cual se puede concluir que es posible estimar los valores WHO-TEQ-HRMS en base a los valores de WHO-TEQ-LRMS con una confianza del 95 %.

Del mismo modo, se realizó un análisis de varianza ($\alpha < 0.05$) con los resultados de las muestras de leche, para saber si existía diferencia significativa entre las técnicas de detección (GC/LRMS vs HRGC/HRMS), encontrándose que hay

una diferencia significativa entre las dos técnicas ($p=0.0062$), como se puede observar en el diagrama de cajas (figura 22), en el cual se aprecia que con la técnica de HRMS los valores tienden a ser bajos mientras que en LRMS tienden a ser altos, esta tendencia se puede deber a la sensibilidad de los equipos, ya que con LRMS al acercarse la concentración de Dioxinas a los límites de detección no puede discriminar las señales espurias arrojando un resultado mayor que con HRMS.

Posteriormente se procedió a realizar un análisis de regresión lineal, con la finalidad de encontrar un modelo que permita describir la relación entre los WHO-TEQ detectados por ambas técnicas. Los resultados obtenidos indicaron la existencia de una correlación lineal negativa ($r^2=0.9862$) entre los WHO-TEQ obtenidos por GC/LRMS y HRGC/HRMS (figura 23). Por esto se puede concluir que es posible estimar los valores WHO-TEQ-HRMS en base a los valores de WHO-TEQ-LRMS con una confianza del 95 %. Por tanto, el método de GC/LRMS se puede utilizar para el monitoreo de dioxinas en leche, sobre todo en los países en vías de desarrollo, ya que el equipo de alta resolución cuesta 10 veces más que el de baja resolución.

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.

5.11 Análisis de riesgo

5.11.1 Riesgo carcinogénico

Las Dioxinas han sido asociadas a cáncer de pulmón, estómago, linfoma No Hodgkin y sarcoma de tejidos suaves (Zahm *et al.* 1990; Fingerhut 1991; Manz 1991; Hardell *et al.* 1991; Cantor *et al.* 1992). La actualización de los estudios de cohorte de Fingerhut *et al.* (1991) realizados por Steenland *et al.* (1999), detectaron una tendencia positiva entre exposición a dioxinas e incremento en mortalidad por todo tipo de cáncer, e inclusive lograron asociar algunos incrementos en mortalidad por cánceres específicos, entre ellos el de pulmón y sarcoma de tejidos suaves. Estos resultados son consistentes con estudios de laboratorio con ratas y ratones machos expuestos a TCDD donde se ha observado un exceso de tumores de pulmón, estos experimentos con animales también han sugerido la hipótesis de que existe un mecanismo hormonal de protección al riesgo de cáncer pulmonar en las hembras, lo cual no ha sido probado en el caso de humanos, pues los estudios epidemiológicos se han enfocado principalmente en hombres, y los estudios en donde se han incluido mujeres arrojan datos contradictorios acerca del cáncer de mama.

Los resultados de este estudio indican que con los niveles de dioxinas encontrados en las muestras de carne analizadas existe un riesgo poblacional o incidencia esperada de cáncer de 13 casos para la dosis más baja y 388 casos para la dosis más alta (tabla XLIII). Considerando que la población del área metropolitana de Monterrey es de 3, 595, 294 se podría esperar una tasa cruda para todo tipo de cáncer de hasta 10.79/100 000 habitantes debido a la

exposición a Dioxinas. Dado que en el año 2005 el total de defunciones por cáncer en Nuevo León fue de 1043, la tasa cruda de cáncer es de 29/100 000 habitantes (SINAIS, 2005). Así mismo, los datos del Sistema Nacional de Información en Salud (SINAIS), nos muestran que hay una diferencia entre las tasas de cáncer pulmonar entre hombres y mujeres del estado de Nuevo León siendo de 7.2/100 000 habitantes para mujeres y de 94/100 000 habitantes para hombres. De acuerdo a los reportes del SINAIS se conoce que hay 107 muertes por cáncer pulmonar en mujeres de Nuevo León (Tasa cruda 2.97/100 000 habitantes) y 324 muertes por cáncer pulmonar en hombres de Nuevo León (Tasa cruda 9.01/100 000 habitantes). Por lo cual se debe considerar el desarrollar un proyecto de “vigilancia epidemiológica” intenso.

5.11.2 Riesgo no carcinogénico

Los resultados obtenidos durante la caracterización del riesgo a la salud por la ingesta de carne mostraron que los niveles de dioxinas presentes en la carne que se expende en el área metropolitana de Monterrey probablemente no causen efectos de tipo sistémico, tanto por exposición aguda como crónica, debido a que los IP encontrados en función de las DE determinadas son menores a 1 (tabla XLIV).

CAPÍTULO 6

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

6.1 Conclusiones

1. Se desarrolló un método analítico económico y confiable para la determinación de dioxinas en carnes de res y leches pasteurizadas empleando GC/LRMS.
2. Los niveles de dioxinas detectados en carnes de res están comprendidos entre 0.26 y 7.94 pg WHO-TEQ PCDDs/PCDFs/g de grasa. De estas muestras, cuatro de ellas exceden el límite máximo permitido por la Comunidad Europea, el cual es de 3 pg WHO-TEQ PCDDs/PCDFs /g grasa.
3. Los niveles de dioxinas detectados en leches pasteurizadas están comprendidos entre 0.16 y 2.81 pg WHO-TEQ PCDDs/PCDFs/g de grasa. Estos niveles están por debajo del límite máximo permitido por la Comunidad Europea, el cual es de 3 pg WHO-TEQ PCDDs/PCDFs/g grasa.

4. Los resultados obtenidos con el equipo de GC/LRMS permiten afirmar que se puede realizar el monitoreo de dioxinas en carnes de res y leches pasteurizadas con este tipo de equipo, sobre todo en los países en vías de desarrollo, ya que el equipo de alta resolución cuesta 10 veces más que el de baja resolución.
5. El presente trabajo de investigación es el primero acerca del análisis de dioxinas en carnes y leches en México y genera un precedente para el monitoreo de dioxinas en otros alimentos.
6. Dada la importancia de que en México exista una legislación para el control de estos contaminantes, el presente trabajo coadyuva al establecimiento de tal legislación.

6.2 Perspectivas

1. Continuar con el monitoreo de dioxinas en carnes de res.
2. Aplicar el método desarrollado para el análisis de dioxinas en otros productos cárnicos y derivados lácteos.
3. Investigar la presencia de dioxinas en matrices ambientales, de las cuales el aire es la principal vía de dispersión de estos contaminantes.

REFERENCIAS

- Abad E., Caixach J., Rivera J. 1997. 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* 786:125-134.
- Abad E., Sauló J., Caixach J., Rivera J. 2000. Evaluation of a new automated cleanup system for the analysis of polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins and dibenzofurans in environmental samples. *Journal of Chromatography A* 893:383-391.
- Abad Holgado E. 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.
- Ábalos M., Parera J., Abad E, Rivera J. 2009. PCDD/Fs and DL-PCBs in feeding fats obtained as co-products or by-products derived from the food chain. *Chemosphere* 71:1115-1126.
- Ábalos M., Parera J., Rivera J., Abad E. 2010. PCDD/F and DL-PCB levels in meat from broilers and rabbits fed with fish-oil enriched feeds. *Chemosphere* 78:175-184.
- Badui Salvador. 2006. *Química de los Alimentos*. 4ª edición, Ed. PEARSON, México, pp 213-216.

- Baron C., Borresen T. and Jacobsen Ch. 2005. UV Treatment of Fishmeal: A Method to Remove Dioxins? *Journal of Agricultural And Food Chemistry* 53: 7091-7097.
- Belitz H. D., Grosch W. 1992. *Química de los Alimentos*. 2ª edición, Ed. ACRIBIA, S. A, Zaragoza (España), pp. 603-638.
- Bernard A., Hermans C., Broeckaert F., Poorter G., Cock A, Houins, G. 1999. Food contamination by PCBs and dioxins. An isolated episode in Belgium is unlikely to have affected public health. *Nature* 401: 231-232.
- Bernes C. 1998. *Persistent Organic Pollutants. A Swedish view of an international problem*. Swedish Environmental Protección Agency. Estocolmo.
- Bertazzi P.A., Consonni D., Bachetti S., Rubagotti M., Baccarelli A., Zocchetti C., Pesatori A.C. 2001. Health effects of dioxin exposure: a 20-year mortality study. *American Journal of Epidemiology* 153 (11): 1031-1044.
- Bodner K.M., Collins J.J., Bloemen L.J., Carson M.L. 2003. Cancer risk for chemical workers exposed to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *Occupational and Environmental Medicine* 60: 672-675.
- Brouwer A., Longnecker M.P., Bimbaum L.S. 1999. Characterization of potential endocrine-related health effects at low-dose levels of exposure to PCBs. *Environmental Health Perspective* 107:639-649.
- Brucker-Davis F. 1998. Effects of environmental synthetic chemicals on thyroid function. *Thyroid* 8:827-856.
- Cañedo-López Y. and Macias-Zamora J.V. 2007. Polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins and dibenzofurans in fish from four different regions of Mexico. *Ciencias Marinas* 33: 217-227.

- Cantor K.P., Blair A., Everett G. 1992. Pesticides and other agricultural risk factors for non-Hodgkin's lymphoma among men in Iowa and Minnesota. *Cancer Research* 52:2447-2455.
- 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.
- Chao H.R., Wang S.L., Lee C.C., Yu H.Y., Lu Y.K., Papke O. 2004. Level of polychlorinated dibenzo- *p*-dioxins, dibenzofurans and biphenyls (PCDD/Fs, PCBs) in human milk and the input to infant body burden. *Food and Chemical Toxicology* 42: 1299-1308.
- Colles A., Koppen G., Hanot V., Nelen V., Dewolf M.C., Noel E., Malisch R., Kotz A., Kypke K., Biot P., Vinkx C., Schoeters G. 2008. Fourth WHO-coordinated survey of human milk for persistent organic pollutants (POPs): Belgian results. *Chemosphere* 73: 907-914.
- Commission Directive 2002/69/EC of July 2002, 2002. *Official Journal of the European Communities* 6.8:5-14.
- Commission Regulation (EC) N° 199/2006 of 3 February 2006 amending Regulation (EC) N° 466/2001 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs as regards dioxin and dioxin-like PCBs. *Official Journal of the European Union* L 32:37.
- Diagnóstico del Sector Agropecuario y Acuícola del Estado de Nuevo León. Nuevo León Gobierno del Estado. Monterrey, N.L. 10 de Septiembre de 2008. México.
- Díaz Ferrero J. Determinación de Dioxinas, Furanos, PCB coplanares: Desarrollo de métodos y estudio de niveles en muestras de interés

ambiental y biológico. Tesis Doctoral. Universidad Ramón Llull, Institut Químic de Sarrià. 2000.

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

Eljarrat E., Monjonell A., Caixach J. and Rivera J. 2002. Toxic Potency of Polychlorinated Dibenzo-*p*-dioxins, Polychlorinated Dibenzofurans, and Polichlorinated Biphenyls in Food Samples from Catalonia (Spain). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50:1161–1167.

EPA. 1985. Health assessment document for polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins. Washington, DC: U.S. Environmental Protection Agency, Office of Health and Environmental Assessment. EPA report no. 600/8-84/014.

Feil V.J. and Ellis R.L. 1998. The USDA Perspective on Dioxin Concentrations in Dairy and Beef. *Journal of Animal Science* 76:152-159.

Fernández M.A., Gómara B., Bordajandi L.R., Herrero L., Abad E., Abalos M., Rivera J. and González M.J. 2004. Dietary intakes of polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins, dibenzofurans and dioxin-like polychlorinated biphenyls in Spain. *Food Additives and Contaminants* 21: 983-993.

Fernández-Bremaunts A., Yarto-Ramírez M. y Castro-Díaz J. 2005. Las sustancias tóxicas persistentes. Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales. Instituto Nacional de Ecología. México.

Ferrario J.B., Byrne C.J., Cleverly D.H. 2000. 2,3,7,8-Dibenzo-*p*-dioxins in mined clay products from the United States: Evidence for possible natural origin. *Environ. Sci. Technol.* 34:4524-4532.

Fiedler H. 1996. Sources of PCDD/F and impact on the environment. *Chemosphere* 32: 55-64.

- Fingerhut M.A., Halperin W.E., Marlow D.A. 1991. Cancer mortality in workers exposed to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin. The New England Journal of Medicine 324:212-218.
- Focant J.F, Eppe G, Pirard C, Massart A.C, André J.E, De Pauw E. 2002. Levels and congener distributions of PCDDs, PCDFs and non-*ortho* PCBs in Belgian foodstuffs Assessment of dietary intake. Chemosphere. 48:167-179.
- Focant J.F., Pirard C., Massart A.C., De Pauw E. 2003. Survey of commercial pasteurised cow's milk in Wallonia (Belgium) for the occurrence of polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins, dibenzofurans and coplanar polychlorinated biphenyls. Chemosphere 52: 725-733.
- Fries G.F. 1995. A review of the significance of animal food products as potential pathways of human exposures to dioxins. Journal of Animal Science 73: 1639-1650.
- Galli C.L., Marinovich M.1999. Dioxin and diet: A real risk?. Organohalogen Compounds 44: 427- 431.
- GAO 2002. Environmental Health Risks: Information on EPA's Draft Reassessment of Dioxins. United States General Accounting Office. 45-47.
- Gies A., Neumeier G., Rappolder M., Konietzka R. 2007. Risk assessment of dioxins and dioxin-like PCBs in food-Comments by the German Federal Environmental Agency. Chemosphere 67:S344-S349.
- Goldman L.R. 1999. Children's exposure to dioxins and related compounds: A call for urgency for international action on the global POPs convention. Organohalogen Compounds 43: 487- 490.

- Goncharov N.P., Nizhnik A.N., Dobracheva A.D. 1999. Dioxin impact of male reproductive system in samara region of Rusia. *Organohalogen Compounds* 42:61-65.
- Gorrachategui M. 2001. Seguridad Alimentaria: Dioxinas. XVII Curso de Especialización FEDNA. Madrid. 190-198.
- Hardell L., Eriksson M., Axelson O. 1991. Dioxin and mortality from cancer. (Letter). *The New England Journal of Medicine* 324:1810-1811.
- Hoogenboom L.A.P., van Eijkeren J.C.H., Zeilmaker M.J., Mengelers M.J.B., Herbes R., Immerzeel J., Traag WA. 2007. A novel source for dioxins present in recycled fat from gelatin production. *Chemosphere* 68:814-823.
- Huwe J.K. 2002. Dioxins in food: A modern agricultural perspective. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 50: 1739–1750.
- Huwe J.K. and Larsen G.L. 2005. Polychlorinated Dioxins, Furans and Biphenyls, and Polybrominated Diphenyl Ethers in a U.S. Meat Market and Estimates of Dietary Intake. *Environmental Science Technology* 39:5606–5611.
- IARC. 1997. 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. Vol. 69: 1-2, 105-133.
- INEGI. 2006. II Censo de Población y Vivienda 2005. Sistema Nacional de Información Estadística y Geográfica (SNIEG). Instituto Nacional de Estadística y Geografía. México.

- Institute of Medicine of National Academies. 2003. Dioxins and Dioxins-like Compounds in the food Supply: Strategies to decrease exposures. 37-74
- Jensen E. and Bolger P.M. 2001. Exposure assessment of dioxins/furans consumed in dairy foods and fish. *Food Additives and Contaminant*. 18: 395–403.
- Jiménez B., Merino R., Rodríguez-Estrella R., Gómez G., Rivera L., González J.M., Abad E. and Rivera J. 2005. Results and evaluation of the first study of organochlorine contaminants (PCDDs, PCDFs, PCBs and DDTs) heavy metals and metalloids in birds from Baja California, Mexico. *Environmental Pollution* 133:139–146.
- Kim M., Kim D., Yun S.J., Son S. 2008. Relationship of PCDD/Fs congener profiles between beef and raw milk in South Korea. *Chemosphere*. 70: 1563-1567.
- Kirk R., Sawyer R. and Egan H. 2002. *Composición y Análisis de Alimentos de Pearson*. 3ª edición Ed. Compañía Editorial Continental S. A. de C. V., México, pp 517-537.
- Kogevinas M. 2001. Human health effects of dioxins: cancer, reproductive and endocrine system effects. *Human Reproduction Update* 7 (3): 331-339.
- Larsen J.Ch., Farland W. and Winters D. 2000. Current risk assessment approaches in different countries. *Food Additives and Contaminants*. 17:359–369.
- Li J.G., Wu Y.N., Zhang L. and ZhaoY.F. 2006. Dietary intake of polychlorinated dioxins, furans and dioxin-like polychlorinated biphenyls from foods of animal origin in China. *Food Additives and Contaminants* 24:186–193.
- Liem A.K.D., Fürst P. and Rappe C. 2000. Exposure of populations to dioxins and related compounds. *Food Additives and Contaminants* 17:241–259.

- Lim Y., Yang J., Kim Y., Chang Y. and Shin D. 2004. Assessment of human health risk of dioxin in Korea. *Environmental Monitoring and Assessment* 92:211–228.
- Llerena J.J., Abad E., Caixach J., Rivera J. 2003. An episode of dioxin contamination in feedingstuff: the choline chloride case. *Chemosphere* 53:679-683.
- Lundqvist C., Zuurbier M., Leij M., Johansson C., Ceccatelli S., Saunders M., Schoeters G., Tusscher G.T. and Koppe J. 2006. The effects of PCB_S and dioxins on child health. *Acta Paediatrica* 95: 55–64.
- Malisch R. 2000. Increase of the PCDD/F-contamination of milk, butter and meat samples by use of contaminated citrus pulp. *Chemosphere* 40:1041-1053.
- Manz A., Berger J., Dwyer J.H. 1991. Cancer mortality among workers in chemical plant contaminated with dioxin. *Lancet* 338:959-964.
- Martí-Cid R., Bocio A. and Domingo J.L. 2008. Dietary exposure to PCDD/PCDFs by individuals living near a hazardous waste incinerator in Catalonia, Spain: Temporal trend. *Chemosphere*. 70:1588–1595.
- Norma Oficial Mexicana. NOM-155-SCFI-2003, Leche, fórmula láctea y producto lácteo combinado – Denominaciones. 2003.
- Norma Oficial Mexicana. NOM-158-SCFI-2003, Jamón-Denominación y clasificación comercial. 2003.
- Oehme M. and Kirschmer P. 1984. Isomer Selective Determination of Tetrachlorodibenzo-p-dioxins Using Hydroxyl Negative Ion Chemical Ionization Mass Spectrometry Combined with High-Resolution Gas Chromatography. *Analytical Chemistry* 56:2754-2759.

- Ohsako S., Miyabara Y., Sakaue M., Kurosawa S. 1998. Effects of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) on the development of male reproductive organs in the rats. *Organohalogen Compounds* 42:19-22.
- OMS. 2010. Las dioxinas y sus efectos en la salud humana. Nota descriptiva 225. Organización Mundial de la Salud.
- Petroske E., Zaylskie R. G. and Feil V. J. 1998. Reduction in Polychlorinated Dibenzodioxin and Dibenzofuran Residues in Hamburger Meat during Cooking. *Journal of Agricultural And Food Chemistry*. 46: 3280-3284.
- Potter N., Hotchkiss J. 2007. *Ciencia de los Alimentos*. 5ª. edición, Ed. ACRIBIA, S.A. Zaragoza (España), pp. 307-310.
- Ramos L., Eljarrat E., Hernández L.M., Alonso L., Rivera J, González M.J. 1997. Levels of PCDDs and PCDFs in faro cow's milk located near potencial contaminants sources in Asturias (Spain). Comparison with levels found in control, rural farm and commercial pasteurized cow's milks. *Chemosphere* 35 (10): 2167-2179.
- Ramos L., Eljarrat E., Hernández L.M., Rivera J., González M.J. 1999. Comparative study of methodologies for the analysis of PCDDs and PCDFs in powdered full-fat milk. PCB, PCDD and PCDF levels in commercial samples from Spain. *Chemosphere* 38 (11): 2577-2589.
- Roeder R.A., Garber M.J., Scheling G.T. 1998. Assessment of dioxin in foods from animal origins. *Journal of Animal Science* 76:142-151.
- Safe S. 1990. Polychlorinated biphenyls (PCBs), dibenzo-p-dioxins (PCDDs), dibenzofurans (PCDFs) and related compounds: Environmental mechanistic considerations which support the development of toxic equivalent factors (TEFs). *Critical Reviews in Toxicology* 21:51-88.

- Safe S. and Wormke M. 2003. Inhibitory Aryl Hydrocarbon Receptor-Estrogen Receptor α Cross-Talk and Mechanisms of Action. *Chemical Research Toxicology* 16 (7):807-816.
- Schantz S, Bowman R.E. 1989. Learning in monkeys exposed perinatally to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzop-dioxin (TCDD). *Neurotoxicology and Teratology* 11:13-19.
- Schechter A., Startin J., Wright C., Kelly M., Pöpke O., Lis A., Ball M., Olson JR. 1994. Congener-specific levels of Dioxins and Dibenzofurans in U.S. food and estimated daily Dioxin Toxic Equivalent intake. *Environmental Health Perspectives*. 102 (11):962-966.
- SEMARNAT, Guía Técnica para orientar la elaboración de estudios de evaluación de riesgo ambiental de sitios contaminados. Dirección General de Gestión Integral de Materiales y Actividades Riesgosas. Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales. 1^a edición. México D.F. Julio 2006.
- SIAP 2008. Boletín de Leche. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. Oct.-Dic. 12. México.
- SINAIS- Mortalidad en mujeres (estandarizada por edad) por enfermedades no transmisibles, según entidad federativa de residencia habitual, 2005. Sistema Nacional de Información en Salud. México.
- SINAIS-Mortalidad en Hombres (estandarizada por edad) por enfermedades no transmisibles, según entidad federativa de residencia habitual, 2005. Sistema Nacional de Información en Salud. México.
- Slater J., Bolton-Smith C., Burns J., Cheshier A., Church S., Platt S., Price R., Stainer T., Whitehead R., Wiseman M., Sélér S. 1998. National Food Survey 1997: Annual report on food expenditure, consumption and

nutrient intakes. Ministry of Agriculture, Fisheries and FOOd (MAFF). The Stationary Office, London, UK.

Steenland K., Bertazzi P., Baccarelli A., Kogevinas M. 2004. Dioxin revisited: Developments since the 1997 IARC classification of dioxin as a human carcinogen. *Environmental Health Perspective* 112 (13): 1265-1268.

Steenland K., Piacitelli L., Deddens J., Fingerhut M., Chang LI. 1999. Cancer, heart disease and diabetes in workers exposed to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *Journal National Cancer Institute* 91 (9): 545-546

Tard A., Gallotti S., Leblanc J.C. and Volatier J.L. 2007. Dioxins, furans and dioxin-like PCBs: Occurrence in food and dietary intake in France. *Food Additives and Contaminants* 24:1007–1017.

Torres Cirio A. Implementación de un método de extracción para la determinación de dioxinas en carnes. Tesis de Maestría, UANL. 2006.

Turrio-Baldassarri L., Alivernini S., Carasi S., Casella M., Fuselli S., Iacovella, N., Iamiceli A.L., La Rocca C., Scarcella C., Battistelli C.L. 2009. PCB, PCDD and PCDF contamination of food of animal origin as the effect of soil pollution and the cause of human exposure in Brescia. *Chemosphere* 76: 278-285.

UNEP. United Nations Environment Programme. 1999. Dioxin and Furan inventories. National and Regional Emissions of PCDD/PCDF. Geneva, Switzerland.

US EPA. United States Environmental Protection Agency. 1992. Guidelines for Exposure Assessment. Risk Assessment Forum, Washington, DC, 600Z-92/001.

- US EPA. United States Environmental Protection Agency. 1994. Method 1613: Tetra-through Octa-Chlorinated Dioxins and Furans by isotopic dilution HRGC/HRMS. Washington, DC.
- US EPA. United States Environmental Protection Agency. 2000. Supplementary Guidance for Conducting Health Risk Assessment of Chemical Mixtures. Washington, DC, EPA/630/R-00/002.
- US EPA. United States Environmental Protection Agency. 2005. Guidelines for Carcinogen Risk Assessment. Washington, DC, EPA/630/P-03/001F.
- Vallack H.W., Bakker D.J., Brandt I., Brostöm-Lundén E., Brower A. Bull K.R., Gough C., Guardans R., Holoubek I., Jansson B., Koch R., Kuylenstierna J., Lecloux A., Mckay D., McCutcheon P., Mocarlli P., Taalman R.D.F. 1998. Controlling persistent organic pollutants-what next?. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 6:143-175.
- 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., Cúbica 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. 1998. Toxic equivalency factors (TEFs) for PCBs, PCDDs, PCDFs for humans and wildlife. *Environmental Health Perspectives* 106:775–792.
- Van Leeuwen F.X.R., Feeley M., Schrenk D., Larsen C., Farland W. and Younes M. 2000. Dioxins: Who's tolerable daily intake (TDI) revisited. *Chemosphere*. 40:1095–1101.
- Weisglas-Kuperus N., Patandin S., Berbers G.A.M., Sas T.C.J., Mulder P.G.H., Sauer P.J.J., Hooijkaas H. 2000. Immunologic effects of background exposure to polychlorinated biphenyls and dioxins in Dutch preschool children. *Environmental Health Perspective* 108 (12):1203-1207.

- WHO 1998. 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. World Health Organization.
- WHO 2001. PCDDs, PCDFs and Coplanar PCBs, Safety Evaluation of Certain Food and Food Additive and Contaminants. Who Food Additives Series: 48. Geneva: World Health Organization.
- Yaktine A. L, Harrison G.G, Lawrence R.S. 2006. Reducing exposure to Dioxin and Related Compounds through Foods in the Next generation. Nutrition Reviews 64:403-409.
- Zahm S.H., Weisenburger D.D., Babbitt P.A. 1990. A case-control study of non-Hodgkin's lymphoma and the herbicide 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) in eastern Nebraska. Epidemiology 1:349-356.

RESUMEN AUTOBIOGRÁFICO

Lidia Runia Naccha Torres

Candidato para el Grado de

Doctor en Ciencias con Acentuación en Alimentos

Tesis: CUANTIFICACIÓN DE DIOXINAS POR CROMATOGRAFÍA DE GASES/ESPECTROMETRÍA DE MASAS DE BAJA RESOLUCIÓN (GC/LRMS) EN CARNES Y LECHE CONSUMIDOS EN NUEVO LEÓN.

Campo de Estudio: Ciencia de Alimentos

Biografía:

Datos Personales: Nacida el 29 de Julio de 1950 en Ayacucho Perú, hija de Porfirio Naccha Alca y Donatilda Torres Del Villar.

Escolaridad:

Licenciatura: Químico Farmacéutico. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima, Perú. (1975).

Maestría: En Ciencia e Ingeniería de Alimentos. Universidad Politécnica de Valencia. Valencia, España. (1989).

Experiencia Profesional:

Profesor de tiempo completo de la Facultad de Ingeniería Pesquera y de Alimentos de la Universidad Nacional del Callao, Perú, de 1976 a 1992. Profesor de tiempo completo de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León desde 1992. Actividades de investigación científica desde 1977 en el área de Ciencia y Tecnología de Alimentos. Director de Tesis de Maestría premiadas por la UANL y la SQM. Publicaciones en revistas nacionales e internacionales. Maestro con perfil PROMEP. Miembro de la Sociedad Química de México (SQM), desde 1994 y de la Asociación Mexicana de Química Analítica (AMQA), desde 1995.

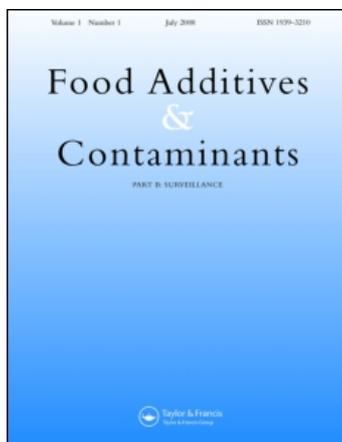
This article was downloaded by: [Waksman, Noemi]

On: 18 March 2010

Access details: Access Details: [subscription number 920020644]

Publisher Taylor & Francis

Informa Ltd Registered in England and Wales Registered Number: 1072954 Registered office: Mortimer House, 37-41 Mortimer Street, London W1T 3JH, UK



Food Additives and Contaminants: Part B

Publication details, including instructions for authors and subscription information:

<http://www.informaworld.com/smpp/title~content=t783462596>

Dioxins in beef samples from Mexico using a low resolution GC/MS screening method

Lidia Naccha ^{ab}; Guadalupe Alanis ^b; Anabel Torres ^a; Esteban Abad ^c; Manuela Ábalos ^c; Josep Rivera ^c; Lorenzo Heyer ^d; Alberto Morales ^e; Noemí Waksman ^a

^a Universidad Autónoma de Nuevo León, Facultad de Medicina, Departamento de Química Analítica,

Nuevo León, México ^b Facultad de Ciencias Biológicas, Cd. Universitaria, Nuevo León, México ^c

Laboratory of Dioxins, Department of Environmental Chemistry, Institute of Environmental Assessment and Water Research (IDAEA-CSIC), Jordi Girona Salgado 18-26, 08034 Barcelona, Spain ^d

Unidad Académica Multidisciplinaria Agronomía y Ciencias, Centro Universitario Victoria, Cd.

Victoria Tamaulipas, Mexico ^e Consorcio Técnico del Noreste de México, Guadalupe, N.L., México

Online publication date: 18 March 2010

To cite this Article Naccha, Lidia, Alanis, Guadalupe, Torres, Anabel, Abad, Esteban, Ábalos, Manuela, Rivera, Josep, Heyer, Lorenzo, Morales, Alberto and Waksman, Noemí(2010) 'Dioxins in beef samples from Mexico using a low resolution GC/MS screening method', Food Additives and Contaminants: Part B, 3: 1, 64 – 72

To link to this Article: DOI: 10.1080/19440040903552382

URL: <http://dx.doi.org/10.1080/19440040903552382>

PLEASE SCROLL DOWN FOR ARTICLE

Full terms and conditions of use: <http://www.informaworld.com/terms-and-conditions-of-access.pdf>

This article may be used for research, teaching and private study purposes. Any substantial or systematic reproduction, re-distribution, re-selling, loan or sub-licensing, systematic supply or distribution in any form to anyone is expressly forbidden.

The publisher does not give any warranty express or implied or make any representation that the contents will be complete or accurate or up to date. The accuracy of any instructions, formulae and drug doses should be independently verified with primary sources. The publisher shall not be liable for any loss, actions, claims, proceedings, demand or costs or damages whatsoever or howsoever caused arising directly or indirectly in connection with or arising out of the use of this material.



Dioxins in beef samples from Mexico using a low resolution GC/MS screening method

Lidia Naccha^{ab}, Guadalupe Alanis^b, Anabel Torres^a, Esteban Abad^c, Manuela Ábalos^c, Josep Rivera^c, Lorenzo Heyer^d, Alberto Morales^e and Noemí Waksman^{a*}

^aUniversidad Autónoma de Nuevo León, Facultad de Medicina, Departamento de Química Analítica, Avenida Madero y Dr. Aguirre Pequeño S/N, Col. Mitras Centro, Monterrey, Nuevo León, México; ^bFacultad de Ciencias Biológicas, Cd. Universitaria, Av. Pedro de Alba s/n, San Nicolás de los Garza, Nuevo León, México; ^cLaboratory of Dioxins, Department of Environmental Chemistry, Institute of Environmental Assessment and Water Research (IDAEA-CSIC), Jordi Girona Salgado 18-26, 08034 Barcelona, Spain; ^dUnidad Académica Multidisciplinaria Agronomía y Ciencias, Centro Universitario Victoria, Cd. Victoria Tamaulipas, Mexico; ^eConsortio Técnico del Noreste de México, A.C. UGRNL, Carretera Reynosa Km. 4.5, Terrenos de Exposición Ganadera, Guadalupe, N.L., México

(Received 10 July 2009; final version received 13 December 2009)

Dioxins in beef were quantified by high resolution gas chromatography coupled to low-resolution mass spectrometry (GC/LRMS). The analyses were performed according to the minimum requirements described in the USEPA 1613 method with some minor modifications. Levels found in the samples were in the range 1.02–8.04 pg WHO-TEQ PCDDs/PCDFs g⁻¹ fat. For comparison purposes, the maximum level allowed by the European Union is 3 pg WHO-TEQ PCDDs/PCDFs g⁻¹ fat, and some of these samples surpassed the above-mentioned limit and can be considered as contaminated food. The results confirm that a preliminary screening of dioxins in beef can be performed by GC/LRMS. As far as we know, this is the first report of dioxins in beef in Mexico. After the appropriated tests, the applied methodology could be considered as an alternative screening method for the analysis of PCDD/Fs in other food products.

Keywords: chromatography; GC/MS; method validation; quality assurance; dioxins; TEQs; animal products; meat

Introduction

Dioxins are persistent polychlorinated global pollutants, widely distributed in the environment and which tend to accumulate in fatty foods. They have been considered the most toxic man-made compounds. The term “dioxins” refers to two classes of compounds, namely polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins (PCDDs) and polychlorinated dibenzofurans (PCDFs), with similar structures characterized by the planarity conferred by the union of two benzene rings through an oxygen atom in furans and two oxygen atoms in dioxins (UNEP 1999; Huwe 2002). Depending on the number of chlorine atoms and their positions in the benzene ring, 210 different compounds, known as congeners (135 PCDFs and 75 PCDDs), can be generated. Of these, 17, in which chlorine atoms are substituted in the 2,3,7,8 positions (10 furans and 7 dioxins), are considered toxic. The most toxic is 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD), which is classified as carcinogenic for humans by the International Agency for Research on Cancer (IARC) and other international organizations (WHO 1997; Jansen et al. 2001; Huwe 2002; Fernandez et al. 2004).

Depending on exposure, different toxicological effects, including chloracne, as illustrated in the case of Ukraine President, Yushchenko, in 2004, metabolic and hormonal changes, alteration of the reproductive system, fetal effects, immune and hepatic damages, teratogenicity, and carcinogenicity (Lim et al. 2004; Lundqvist et al. 2006). PCDDs and PCDFs are found in environmental and biological matrices as complex mixtures.

On the basis of their similar toxic mechanisms, the concepts of toxic equivalency factor (TEF) and toxic equivalency concentration (TEQ) were introduced to facilitate the evaluation of risk from a sample for both humans and animals. These terms were also used for legislative purposes. The TEF system assigns to each toxic congener a factor reflecting its toxicity, compared with the most toxic compound, namely 2,3,7,8-TCDD. In 1997, the data were revised and updated by the World Health Organization (WHO) to fix unique TEF values (Van den Berg et al. 1998).

Human exposure to dioxins can occur through different routes: air inhalation, dermal absorption and food intake. WHO estimates that 90% of current human exposure to dioxins is through their diet,

*Corresponding author. Email: nwaksman@gmail.com

mainly from meat, fish and dairy products (WHO 1998; Lundqvist et al. 2006).

The determination of congener-specific profiles of PCDDs/PCDFs in food of animal origin, such as meat and milk, may reflect the sources of the contaminants. Kim et al. (2008) reported that congener-specific profiles of PCDDs/PCDFs in beef and raw milk were very similar. PCDFs, particularly 2,3,4,7,8-PCDF, 1,2,3,4,7,8-HxCDF, 1,2,3,6,7,8-HxCDF, and 2,3,4,6,7,8-HxCDF, were dominant congeners in both beef and raw milk, suggesting that source of contaminant may not significantly differ nationwide. The profiles of PCDDs/PCDFs in domestic beef and raw milk in this study were closer to the profiles of emission from metal industries, although Korea imports over 75% of feedstuffs. Schechter et al. (1994) to estimate intake of these highly toxic compounds, we performed congener-specific dioxin analyses for the first time on US food for 18 dairy, meat and fish samples from a supermarket in upstate New York. TCDD toxic equivalents (TEQs) on a wet weight basis for the dairy products ranged from 0.04 to 0.7 ppt, meat TEQs ranged from 0.03 to 1.5 ppt, and fish TEQs ranged from 0.02 to 0.13 ppt.

After the crisis in Belgium in 1999, extensive research on levels of PCDDs/PCDFs in Belgian foodstuffs has been conducting. Focant et al. (2002) reported the levels and congener distribution of PCDD/Fs in 197 foodstuffs samples of animal origin from Belgium during years 2000 and 2001. All investigated matrices (except horse) had background levels lower than the Belgian non-commercialization value of 5 pg TEQ g⁻¹ fat. The relative contribution of 2,3,7,8-TCDD, 2,3,7,8-TCDF, 1,2,3,7,8-PeCDD and 2,3,4,7,8-PeCDF to the PCDD/Fs TEQ was 85 ± 7.9% for all investigated matrices.

In the past decade, international institutions, such as the WHO, IARC and European Commission Scientific Committee on Food (EC-SCF), have paid great attention to research concerning the distribution of relative risk of dioxins. As a result, a tolerable daily intake (TDI) limit has been established. In recent years, the WHO suggested reducing the tolerable daily intake from 1–10 pg TEQ kg⁻¹ bodyweight (bw) to 1–4 pg TEQ kg⁻¹ bw. The US Agency for Toxic Substances and Disease Registry accepts 1 pg TEQ kg⁻¹ bw day⁻¹ as the Minimal Risk Level (Larsen et al. 2000; Van Leeuwen et al. 2000; Fernandez et al. 2004). Nowadays, countries such as USA, Germany, France, Spain and China regulate the intake of these compounds through exhaustive monitoring programs that identify and reduce exposure routes (Huwe et al. 2005; Bocio and Domingo 2005; Li et al. 2006; Gies et al. 2007; Tard et al. 2007; Martí-Cid et al. 2008).

Considering their risk, special efforts have been made to analyze these compounds in foods as well as in the environment; however, due to the complexity and

high costs of these determinations, only some industrialized countries can afford to develop and apply the appropriate methods in samples of different origins.

In contrast to the industrialized countries, information in Mexico on dioxin contamination is scarce. Jiménez et al. (2005) reported the presence of organochloride compounds (including PCDDs/PCDFs) in birds from Baja California. Cañedo and Macías (2007) reported the presence of PCDDs/PCDFs in fish from four different regions in México. However, until now, no reports about the presence of dioxins and furans in environmental matrices or foods had been available. Moreover, no analytical method had been established to determine dioxin levels in the aforementioned matrices.

The objective of the present research was to develop an analytical method using gas chromatography/low-resolution mass spectrometry (GC/LRMS) to quantify dioxin levels in beef samples from Monterrey, Nuevo Leon, Mexico.

Materials and methods

Samples

Ten beef samples were supplied by the Animal Committee of Nuevo Leon. These samples were obtained from the Federal Inspection Type bovine slaughterhouse of Nuevo Leon, Mexico. These samples were mixtures representative (3 kg) of various cuts, such as neck, chest and leg.

Chemicals reagents and standard solutions

USEPA method 1613 standard solution, comprising extended calibration, low level (EPA-1613CSL and EPA-1613CS0.5), calibration and verification solutions CS1–CS5 (EPA-1613CS1–CS5), labeled compound stock solution (EPA-1613LCS), internal standard spiking solution (EPA-1613ISS), and precision and recovery stock solution (EPA-1613PAR), was purchased from Willington Labs (Guelph, Ontario, Canada) for instrument calibration, quantification and recovery of PCDDs/PCDFs. Solvents for organic trace analysis (acetone, dichloromethane, toluene, n-hexane and cyclohexane) were purchased from Merck (Darmstadt, Germany); nonane was purchased from Fluka (Steinheim, Switzerland); ethyl ether ACS and Florisil from EMD (Darmstadt, Germany); sulfuric acid 95–97% and silica gel 60 of film thickness 0.063–0.2 mm from Merck; silver nitrate, sodium hydroxide and anhydrous sodium sulphate ACS from J.T. Baker (Xalostoc, Mexico); and basic Alumina Super I, from Sorbent Technologies (Atlanta, GA, USA).

Analysis

Dioxin determinations were made following minimum requirements described in USEPA 1613 (USEPA 1994; Abad et al. 1997, 2000). Briefly, the method consists of an extraction step and a cleanup step comprising purification and fractionation. Prior to sample extraction, the meat samples were submitted to a pretreatment consisting of homogenization, grinding, freezing and lyophilized. Afterwards, a weighed sample of lyophilized meat (75 g fresh weight (fw) or 20 g dry weight (dw)) containing 5–10% fat was Soxhlet extracted using a solvent mixture of toluene/cyclohexane (400 ml, 1:1, v/v). Samples were spiked with known amounts of mixtures of $^{13}\text{C}_{12}$ -PCDD/Fs (5 μl EPA-1613LCS; Wellington Laboratories Inc., Guelph, Ontario, Canada). Fat was dissolved in hexane (100 ml). Concentrated sulfuric acid (twice with 50 ml each time) was used to remove interferences until the aqueous phase showed a brownish color. The organic extract containing dioxins and furans was concentrated in a rotary evaporator to a volume of 3 ml prior to the cleanup process.

The manual cleanup procedure is based on the sequential use of multilayer silica, Florisil and basic alumina packed in glass columns. The first column (silica multilayer, 200 \times 15 mm) is composed of different sequential layers: (2 g) Na_2SO_4 | (0.5 g) SiO_2 | (10 g) SiO_2 - H_2SO_4 | (0.5 g) SiO_2 | (5 g) SiO_2 - NaOH | (0.5 g) SiO_2 | (2 g) SiO_2 - AgNO_3 |. Florisil (5 g) and basic alumina (6 g) were activated overnight at 600 and 300°C, respectively, and packed in glass columns (200 mm length \times 10 mm I.D.). The multilayer silica column was coupled to the Florisil column. Hexane (50 ml) was used to condition the column. After applying the hexanic extract, the first fraction eluted with n-hexane (250 ml) was discarded, the silica column was withdrawn, and the Florisil column was further eluted using toluene/ethyl ether (150 ml, 90:10) to recover the mixture of dioxins and furans (Abad et al. 2000; Ábalos et al. 2008 and 2010).

The concentrated extract was passed through the basic alumina column. The first two fractions eluted with n-hexane (25 ml) and n-hexane/dichloromethane (20 ml, 98:2, v/v), respectively, were discarded. The mixture of PCDDs/PCDFs was eluted with n-hexane/dichloromethane (50 ml, 50:50, v/v). The extract was concentrated to dryness and reconstituted with 5 μl nonane. Then, 5 μL EPA-1613ISS standard was added as a recovery standard. This extract was analyzed with an Agilent Technologies (Wilmington, DE, USA) Model 6890N gas chromatograph coupled with a 5973N mass selective detector (MSD) using an electron impact source and quadrupole mass analyzer.

Chromatographic separation was achieved in a HP-5ms (Agilent Technologies) capillary column, (60 m \times 0.25 mm I.D. \times 0.25 μm), using helium as the

carrier gas (3.4 ml min $^{-1}$) in splitless injection mode (2 μl).

The temperature program was: 180°C (1 min), increasing to 200°C at 25°C min $^{-1}$, then to 270°C at 3°C min $^{-1}$ (44 min). The injector temperature was 300°C, ion source temperature, 200°C, and the interface and quadrupole temperatures, 270 and 120°C, respectively, with ionization energy 70 eV. The resolution power was 1000 and the mass interval was m/z 304–472. Data was acquired in SIM mode.

Quantification was carried out by the isotopic dilution method using a mixture of $^{13}\text{C}_{12}$ -labeled and unlabeled standards (USEPA 1994). Relative response factors were calculated for each individual congener by analysis of five different mixtures of labeled and unlabeled standards. Results are reported in pg WHO-TEQ g $^{-1}$ fat weight.

Complementary analysis was also achieved by high resolution mass spectrometry coupled to high resolution mass spectrometry (HRGC/HRMS). Instrumental analysis has been extensively documented in the literature (Abad et al. 1997; Ábalos et al. 2008).

Quality control

The quality control of the method was evaluated using the criteria of USEPA method 1613. The system was assessed using EPA-1613CSL and EPA-1613CS1–CS5 standards. In addition, specific isomers valley, ion abundance ratios, minimum quantifiable level, retention time windows and linearity were also checked. The criteria for ensuring the quality dioxin analysis include the application of some quality control measures, such as a continuous monitoring of laboratory contamination, based on the determination of a blank sample covering the whole analytical procedure, including extraction, cleanup and quantification. The other common performance parameter considered in this work was accuracy, expressed as recovery rates. For the limit of detection and limit of quantification for PCDD/PCDF, signal-to-noise ratio equal to 2.5 and 10, respectively, were considered (USEPA, 1994).

Results and discussion

Quality control

Retention time windows

The GC/LRMS was first run in SCAN mode and then in SIM mode to define the retention times (RTs). Considering the elution orders, the tetrachloride congeners appeared between 9 and 18 min, pentachlorides between 18 and 22 min, hexachlorides between 22 and 26 min, heptachlorides between 26 and 34 min, and octachlorides between 34 and 36 min.

Specific isomer valleys

This value must be lower than 25%, for 2,3,7,8-TCDD with respect to 1,2,3,7/1,2,3,8-TCDD pairs, which are isomers with very close RTs. Our result was 16%. For 1,2,3,4,7,8-HxCDD and 1,2,3,6,7,8-HxCDF the values were 20 and 10%, respectively. After attaining good resolution in this parameter, it was possible to continue with the validation procedure, as the other congeners could be resolved without difficulty.

Specific ion abundance ratios

This is a very important criterion, as the different dioxin and furan isomers are identified through the signals presented by two of their specific ions. The specific ion abundance ratios for PCDDs and PCDFs at concentrations ranging from 0.5 to 200 pg μl^{-1} were all within the limits accepted by the USEPA (method 1613).

Minimum quantifiable level

This parameter is defined by the signal-to-noise ratio (S/N) at the lowest concentration of the calibration and verification standards. According to the acceptance criterion, this value must be higher than 10. Our results satisfy the criterion at 1 pg μl^{-1} and higher for PCDDs and PCDFs. At 0.5 pg μl^{-1} , S/N ratios of 2.5 for TCDD and 5.4 for TCDF were observed; therefore, this was considered the detection limit. The detection and quantification limits were 0.5 and 1 pg μl^{-1} , respectively, for all congeners. In addition, LOD was also determined for real samples.

Linearity

To determine linearity, the relative response (RR) was calculated. The variation coefficient (VC) must be less than 20%. For 2,3,7,8-TCDD, the RR was within this limit at 1 pg μl^{-1} and higher. For 2,3,7,8-TCDF, the VC % values were below the limit for concentrations of at least 0.5 pg μl^{-1} . Therefore, for tetradioxins, the resulting linearity interval was 1–200 pg μl^{-1} , intraday VC was 4%, and interday 5%. For tetrafurans, the linearity interval was 0.5–200 pg μl^{-1} , intraday VC was 17%, and interday 12%, which are in accordance with USEPA method 1613.

Recovery and precision

The accuracy of the method was evaluated on the basis of the recoveries. The % recoveries for labelled PCDDs and PCDFs standards had values between 70 and 166%; these are within the accepted range for USEPA method 1613 for both furans and dioxins.

The results for precision are reported as relative standard deviations (RSD %). Results ranging from

8 to 20% were obtained. The lowest RSD was obtained for 1,2,3,6,7,8-HxCDD, and the highest for 1,2,3,7,8-PeCDD. The European Union Commission directive demands that this value be lower than 30% when using GC/LRMS (Commission Directive 2002). Therefore, our results are within the required range.

PCDDs/PCDFs levels in beef samples

The results presented here were obtained from 10 samples processed according to the method already described. Figure 1 shows a chromatogram of a real sample where 10 signals from PCDDs/PCDFs congeners can be seen. RTs were verified using a standard containing a mixture of 17 congeners. Table 1 shows the concentration, average, median and maximum values for each sample and congener expressed in pg g^{-1} fat. The concentrations are reported on a lipid-adjusted basis. The concentration of each congener ranged from undetectable up to 32.54 pg g^{-1} fat. Mean concentrations were calculated assuming that all values lower than the LOD are equal to this LOD (upperbound). The LOD of the individual congeners ranged between 0.14 and 0.82 pg g^{-1} fat, depending on the congener. Taking into account these figures, the minimum quantifiable method is 0.77 pg WHO-TEQ g^{-1} lipid basis. This is consistent for screening methods, such as low resolution mass spectrometry techniques; however, these figures do not meet the minimum requirements indicated by UE for these reference techniques for which a guarantee of a minimum of 1/5 of the limit value (0.6 pg WHO-TEQ g^{-1} lipid basis for beef) must be achievable.

The mixture of toxic congeners of PCDDs/PCDFs in beef samples analyzed is remarkable. The concentrations of dioxin congeners were the highest, particularly 1,2,3,4,6,7,8-HpCDD (concentrations found: 0.30–32.54 pg g^{-1} fat), followed by OCDD (concentrations found: 0.71–28.93 pg g^{-1} fat). However, these high concentrations are not important in terms of TEQ values, because the TEF values for these compounds are very low at 0.01 and 0.0001, respectively. The same applies to 1,2,3,4,7,8-HxCDF found in the range 0.35–21.77 pg g^{-1} fat, with a TEF value of 0.1. On the other hand, the presence of 2,3,7,8-TCDD and 1,2,3,7,8-PeCDD (TEF values of 1 for both) in concentrations ranging from 0.14 to 2.84 pg g^{-1} fat and 0.25 to 4.63 pg g^{-1} fat, respectively, point to contaminated samples (Figure 2).

In the congeners profile, 2,3,4,7,8-PeCDF and 1,2,3,4,7,8-HxCDF were dominant, similar to those reported in beef by Schecter et al. (1994), Focant et al. (2002) and Kim et al. (2008). Likewise HxCDDs has a similar distribution, dominated by 1,2,3,6,7,8-HxCDD, followed by 1,2,3,7,8,9-HxCDD and the lowest concentration found for the 1,2,3,4,7,8-HxCDD. This is in accordance to figures reported in USA beef by

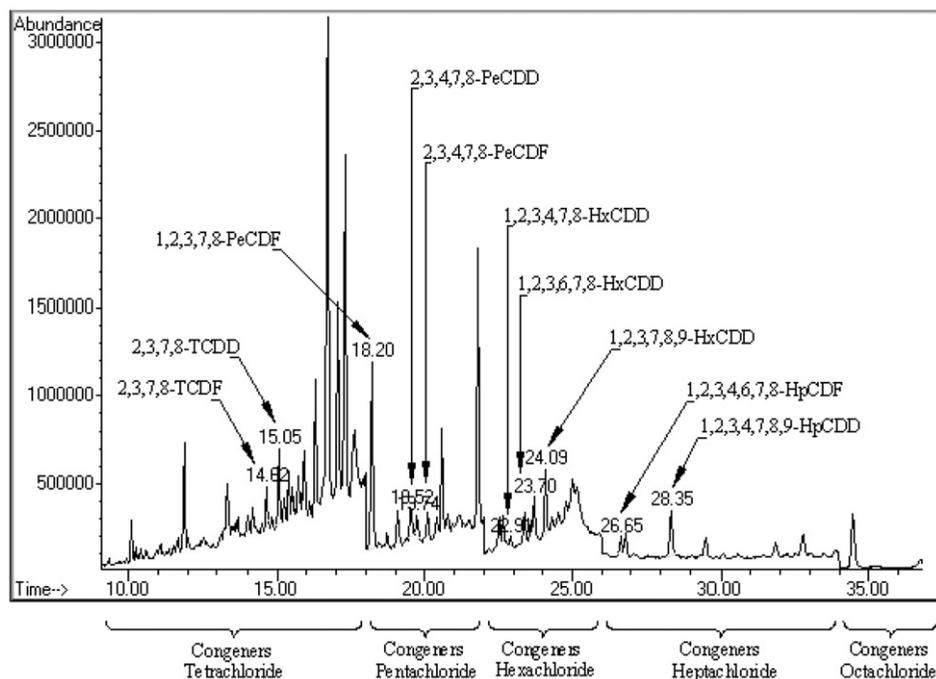


Figure 1. GC (HP-5ms)-LRMS (EI)-SIM chromatogram of PCDDs/PCDFs in a beef extract.

Schechter et al. (1994), beef from Belgium reported by Focant et al. (2002) and beef from Korea reported by Kim et al. (2008).

Eljarrat et al. (2002) also found high concentrations of 1,2,3,4,6,7,8-HpCDD and OCDD (18.75 and 46.60 pg g^{-1} fat, respectively) in beef samples, similar to our values. Huwe et al. (2005) report similar results for 1,2,3,4,6,7,8-HpCDD (6.04 pg g^{-1} fat) in beef samples from the US Meat Market Basket.

Using the concentrations obtained for each congener and their TEF values, pg WHO-TEQ g^{-1} fat values were calculated. Levels found were between 1.02 and 8.04 pg WHO-TEQ g^{-1} fat, with a mean value of 3.44 (Table 1). These results coincide with those reported by Liem and Telen (2000) of 0.3–7.2 pg WHO-TEQ g^{-1} fat, but the mean value is higher than that reported by Eljarrat et al. (2002). In a surveillance program of PCDDs/PCDFs in different foods, they found 1.19 pg WHO-TEQ g^{-1} fat in meat, with the highest quantity reported being 3.91 pg WHO-TEQ g^{-1} fat.

Four of the 10 analyzed samples presented concentrations higher than the maximum limit allowed by the EU of 3 $\text{pg WHO-TEQ PCDDs/PCDFs g}^{-1}$ fat (Commission Regulation 199/2006/EC), namely, 6.55, 8.04, 3.25 and 5.19 $\text{pg WHO-TEQ PCDDs/PCDFs g}^{-1}$ fat. Four samples were found to be contaminated. With current data, it is difficult to determine the source of pollution. However, taking into account the results by LRMS, confirmed by HRMS, it would be appropriate to conduct a new study to assess the feed or pasture areas, as noted in the literature, which may be

the origin of such contamination (Bernard et al. 1999; Ferrario et al. 2000; Malish 2000; Lerena et al. 2003; Hoogenboon et al. 2007; Kim et al. 2008).

Comparison of PCDDs/PCDFs TEQ values in beef samples

Some of the processed samples were complementarily analyzed by high resolution gas chromatography coupled with high resolution mass spectrometry (HRGC/HRMS). A good correlation was early achieved in terms of recovery rates for labelled standards (Table 1). In addition, findings revealed the capability to detect potential contamination episode since one sample recording 8.04 $\text{pg WHO-TEQ PCDDs/PCDFs g}^{-1}$ fat was confirmed by the reference method of 9.89 $\text{pg WHO-TEQ PCDDs/PCDFs g}^{-1}$ fat. Some congeners not detected by our GC/LRMS method were detected by HRGC/HRMS at very low concentrations. Therefore, they do not greatly influence total WHO-TEQ values.

In Figure 3, WHO-TEQ values obtained by HRMS and LRMS are compared. In general, a good correlation was achieved; nevertheless, LRMS showed the drawbacks mentioned previously regarding pentachlorinated and octachlorinated compounds. HRGC/HRMS has the advantage of high selectivity, sensitivity, specificity and simplicity, without the need for excessive purification, because it can discriminate between interferences with similar masses. On the other hand, the specificity of an analytical method based on LRMS can be improved by selection of

Table 1. LOD, and average, median, maximum and minimum levels of 2,3,7,8-PCDDs/PCDFs (pg g⁻¹ fat weight) in beef samples (n = 10).

| Compounds | C1 | C2 | C3 | C4 | C5 | C6 | C7 | C8 | C9 | C10 | LOD | Average | Median | Minimum | Maximum |
|--|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|------|---------|--------|---------|---------|
| 2,3,7,8-TCDD | 2.84 | 0.67 | n.d. (0.14) | n.d. (0.14) | n.d. (0.14) | n.d. (0.14) | 1.75 | n.d. (0.14) | 0.36 | 0.17 | 0.14 | 1.16 | 0.67 | 0.17 | 2.84 |
| 1,2,3,7,8-PCDD | 3.27 | 2.8 | n.d. (0.25) | 2.08 | n.d. (0.25) | 0.27 | 0.40 | 0.28 | n.d. (0.25) | 4.63 | 0.25 | 1.96 | 2.08 | 0.27 | 4.63 |
| 1,2,3,4,7,8-HxCDD | n.d. (0.24) | 0.91 | n.d. (0.24) | n.d. (0.24) | n.d. (0.24) | 1.08 | n.d. (0.24) | n.d. (0.24) | n.d. (0.24) | n.d. (0.24) | 0.24 | 1.00 | 1.00 | 0.91 | 1.08 |
| 1,2,3,6,7,8-HxCDD | n.d. (0.35) | 10.35 | n.d. (0.35) | n.d. (0.35) | 5.99 | n.d. (0.35) | 0.35 | 8.17 | 8.17 | 5.99 | 10.35 |
| 1,2,3,7,8,9-HxCDD | n.d. (0.33) | 4.55 | n.d. (0.33) | 0.33 | 4.55 | 4.55 | 4.55 | 4.55 |
| 1,2,3,4,6,7,8-HpCDD | 0.4 | 15.42 | 6.65 | 0.78 | 32.54 | 7.56 | n.d. (0.3) | 0.4 | n.d. (0.3) | 0.56 | 0.3 | 8.04 | 3.72 | 0.4 | 32.54 |
| OCDD | n.d. (0.71) | 17.59 | 15.8 | n.d. (0.71) | 28.93 | 18.45 | n.d. (0.71) | n.d. (0.71) | 12 | n.d. (0.71) | 0.71 | 18.55 | 17.59 | 12 | 28.93 |
| 2,3,7,8-TCDF | n.d. (0.14) | 0.96 | n.d. (0.14) | n.d. (0.14) | n.d. (0.14) | 1.57 | n.d. (0.14) | n.d. (0.14) | n.d. (0.14) | n.d. (0.14) | 0.14 | 1.27 | 1.27 | 0.96 | 1.57 |
| 1,2,3,7,8-PCDF | n.d. (0.19) | 4.24 | n.d. (0.19) | n.d. (0.19) | n.d. (0.19) | 0.5 | n.d. (0.19) | n.d. (0.19) | 0.99 | n.d. (0.19) | 0.19 | 1.91 | 0.99 | 0.5 | 4.24 |
| 2,3,4,7,8-PCDF | n.d. (0.28) | 6.06 | n.d. (0.28) | 0.28 | 6.06 | 6.06 | 6.06 | 6.06 |
| 1,2,3,4,7,8-HxCDF | n.d. (0.35) | n.d. (0.35) | n.d. (0.35) | n.d. (0.35) | 1.95 | 1.41 | 1.11 | 21.77 | 7.96 | 0.35 | 0.35 | 5.76 | 1.68 | 0.35 | 21.77 |
| 1,2,3,6,7,8-HxCDF | n.d. (0.3) | n.d. (0.3) | n.d. (0.3) | n.d. (0.3) | 0.42 | n.d. (0.3) | n.d. (0.3) | 0.32 | n.d. (0.3) | n.d. (0.3) | 0.3 | 0.37 | 0.37 | 0.32 | 0.42 |
| 2,3,4,6,7,8-HxCDF | n.d. (0.27) | 2.50 | 0.50 | 0.38 | 0.27 | 1.13 | 0.50 | 0.38 | 2.5 |
| 1,2,3,7,8,9-HxCDF | n.d. (0.2) | 1.03 | n.d. (0.2) | n.d. (0.2) | 0.2 | 1.03 | 1.03 | 1.03 | 1.03 |
| 1,2,3,4,6,7,8-HpCDF | 6.19 | 10.26 | 18.93 | 11.7 | 4.70 | 1.28 | 8.93 | n.d. (0.35) | n.d. (0.35) | n.d. (0.35) | 0.35 | 8.86 | 8.93 | 1.28 | 18.93 |
| 1,2,3,4,7,8,9-HpCDF | n.d. (0.33) | n.d. (0.33) | n.d. (0.33) | n.d. (0.33) | 0.47 | n.d. (0.33) | 0.33 | 0.47 | 0.47 | 0.47 | 0.47 |
| OCDF | n.d. (0.82) | n.d. (0.82) | n.d. (0.82) | n.d. (0.82) | 1.03 | n.d. (0.82) | 0.82 | 1.03 | 1.03 | 1.03 | 1.03 |
| WHO-TEQ (PCDD/F) | 6.55 | 8.04 | 1.02 | 2.71 | 1.87 | 1.22 | 2.69 | 3.25 | 1.81 | 5.19 | 0.77 | 3.44 | 2.7 | 1.02 | 8.04 |
| Complementary analysis by HRGC/HRMS (pg WHO-TEQ/g ⁻¹ lipid) | - | 9.89 | 1.31 | 2.60 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |

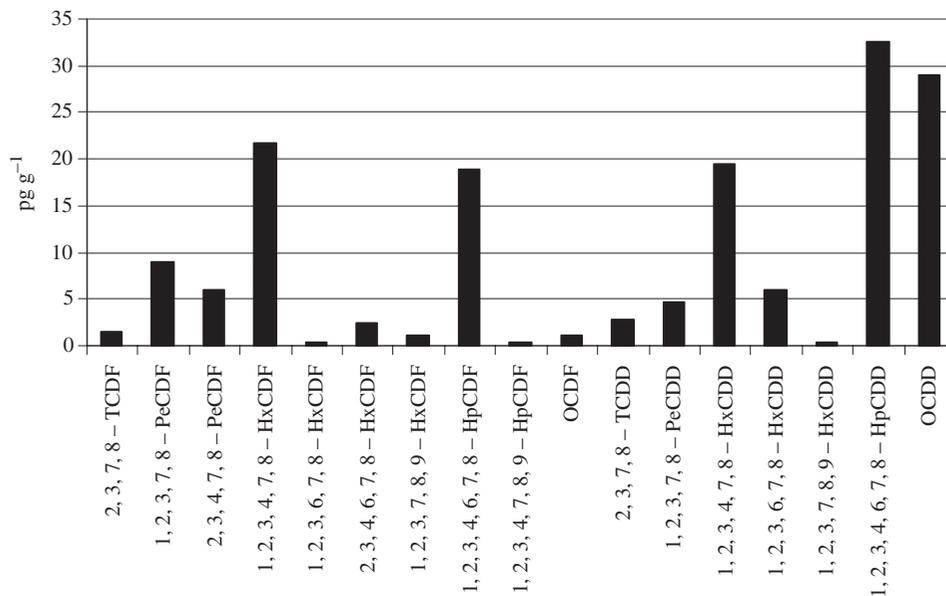


Figure 2. PCDDs/PCDFs distribution in meat samples (data expressed in pg g⁻¹ fat).

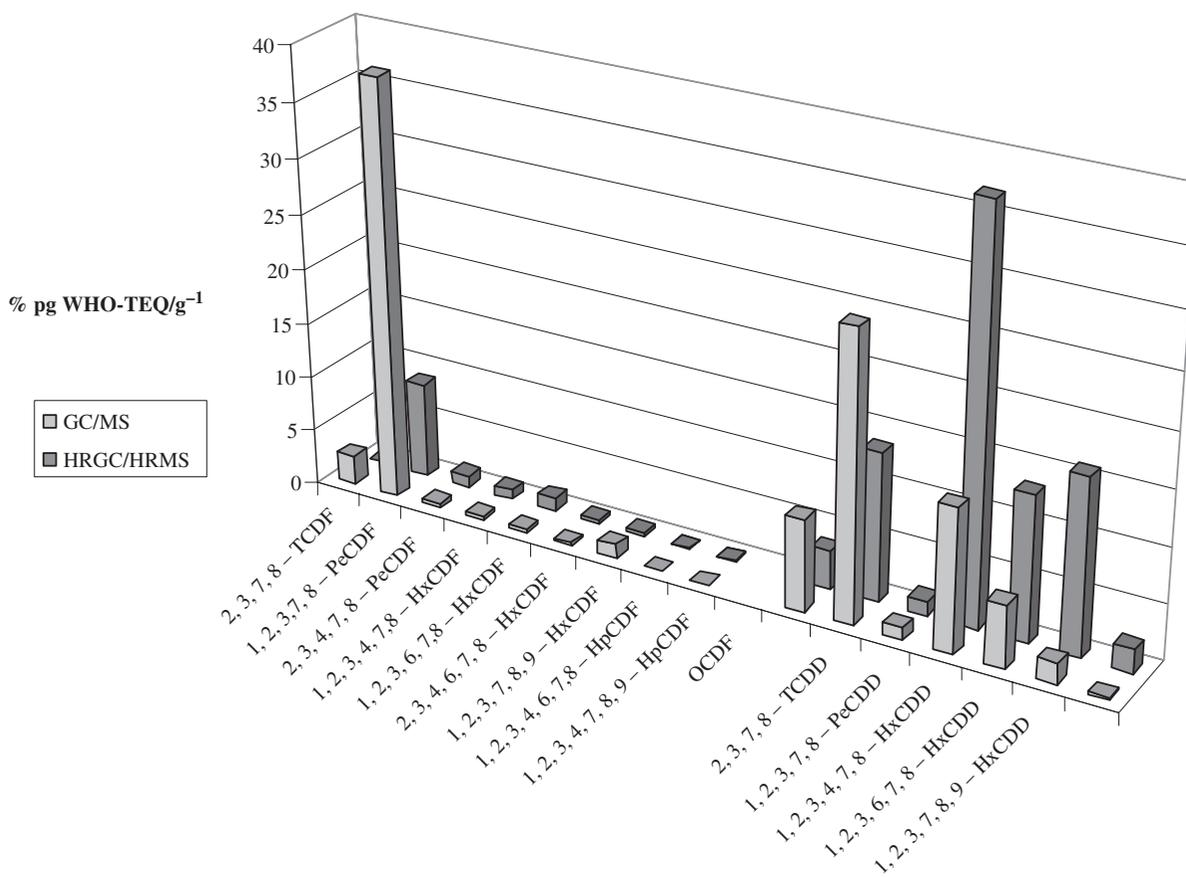


Figure 3. Comparison of individual congeners of 2,3,7,8-PCDD/F analyzed by HRGC/HRMS and GC/MS (data expressed in % WHO-TEQ).

appropriate purification steps. In the present case, the purification and fractionation technique was selective on account of the different adsorbents used. Therefore, good results could be obtained to identify contaminated samples (Eljarrat et al. 1995), making screening for dioxin-contaminated beef samples possible in Mexico, particularly in Monterrey, Nuevo Leon.

Conclusions

An analytical method was developed for the quantification of dioxins in beef using GC/LRMS. Concentrations ranged from 1.02 to 8.04 pg WHO-TEQ PCDDs/PCDFs g⁻¹ fat. Therefore, contamination of some beef samples exceeded the maximum limit allowed by the EU of 3 pg WHO-TEQ PCDDs/PCDFs g⁻¹ fat. Despite limitation and drawbacks in using GC/LRMS for analysis of PCDDs/PCDFs, the results demonstrate the viability of screening method beef for dioxins and they point to the importance of having legislation in Mexico to control these pollutants in beef. To our knowledge, this is the first report on the detection of dioxin-contaminated beef in Mexico.

Acknowledgements

We wish to thank SAGARPA-CONACYT 2002-C01-1140, CONCYTEC and PAICYT CA440-04 for financial support, as well as CONACYT for financial support in the form of a fellowship for ATC.

References

- Abad E, Caixach J, Rivera J. 1997. 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. *J Chromatogr A*. 786:125-134.
- Abad E, Sauló J, Caixach J, Rivera J. 2000. Evaluation of a new automated cleanup system for the analysis of polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins and dibenzofurans in environmental samples. *J Chromatogr A*. 893:383-391.
- Ábalos M, Parera J, Abad E, Rivera J. 2008. PCDD/Fs and DL-PCBs in feeding fats obtained as co-products or by-products derived from the food chain. *Chemosphere*. 71:1115-1126.
- Ábalos M, Parera J, Rivera J, Abad E. 2010. PCDD/F and DL-PCB levels in meat from broilers and rabbits fed with fish-oil enriched feeds. *Chemosphere*. 78:175-184.
- Bernard A, Hermans C, Broeckaert F, de Poorter G, de Cock A, Houins G. 1999. Food contamination by PCBs and dioxins. An isolated episode in Belgium is unlikely to have affected public health. *Nature*. 401:231-232.
- Bocio A, Domingo JL. 2005. Daily intake of polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins/polychlorinated dibenzofurans (PCDD/PCDFs) in foodstuffs consumed in Tarragona, Spain: a review of recent studies (2001-2003) on human PCDD/PCDF exposure through the diet. *Environ Res*. 97:1-9.
- Cañedo-López Y, Macías-Zamora JV. 2007. Polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins and dibenzofurans in fish from four different regions of Mexico. *Ciencias Marinas*. 33: 217-227.
- Commission Directive 2002/69/EC of July 2002. 2002. *Off J Eur Commun*. 6.8:5-14.
- Commission Regulation (EC) N° 199/2006 of 3 February 2006 amending Regulation (EC) N° 466/2001 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs as regards dioxin and dioxin-like PCBs. *Off J Eur Union L32*:37.
- Eljarrat E, Casanovas J, Muro R, Huguet X, Caixach J, Rivera J. 1995. Determination of chlorinated dioxins and furans by high resolution gas chromatography coupled to mass spectrometry: comparative study of LRMS and HRMS. *Química Analítica*. 14:89-95.
- Eljarrat E, Monjonell A, Caixach J, Rivera J. 2002. Toxic potency of polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins, polychlorinated dibenzofurans, and polichlorinated biphenyls in food samples from Catalonia (Spain). *J Agric Food Chem*. 50:1161-1167.
- Fernández MA, Gómara B, Bordajandi LR, Herrero L, Abad E, Abalos M, Rivera J, Gonzáles MJ. 2004. Dietary intakes of polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins, dibenzofurans and dioxin-like polychlorinated biphenyls in Spain. *Food Addit Contam*. 21: 983-993.
- Ferrario JB, Byrne CJ, Cleverly DH. 2000. 2,3,7,8-Dibenzo-*p*-dioxins in mined clay products from the United States: Evidence for possible natural origin. *Environ Sci Technol*. 34:4524-4532.
- Focant J-F, Eppe G, Pirard C, Massart A-C, André J-E, De Pauw E. 2002. Levels and congener distributions of PCDDs, PCDFs and non-*ortho* PCBs in Belgian foodstuffs Assessment of dietary intake. *Chemosphere*. 48:167-179.
- Gies A, Neumeier G, Rappolder M, Konietzka R. 2007. Risk assessment of dioxins and dioxin-like PCBs in food-Comments by the German Federal Environmental Agency. *Chemosphere*. 67:S344-S349.
- Hoogenboom LAP, van Eijkeren JCH, Zeilmaker MJ, Mengelers MJB, Herbes R, Immerzeel J, Traag WA. 2007. A novel source for dioxins present in recycled fat from gelatin production. *Chemosphere*. 68:814-823.
- Huwe JK, Larsen GL. 2005. Polychlorinated dioxins, furans and biphenyls, and polybrominated diphenyl ethers in a US Meat Market and estimates of dietary intake. *Environ Sci Technol*. 39:5606-5611.
- Huwe JK. 2002. Dioxins in food: A modern agricultural perspective. *J Agric Food Chem*. 50:1739-1750.
- Jensen E, Bolger PM. 2001. Exposure assessment of dioxins/furans consumed in dairy foods and fish. *Food Addit Contam*. 18:395-403.
- Jiménez B, Merino R, Rodríguez-Estrella R, Gómez G, Rivera L, Gonzáles JM, Abad E, Rivera J. 2005. Results and evaluation of the first study of organochlorine contaminants (PCDDs, PCDFs, PCBs and DDTs) heavy metals and metalloids in birds from Baja California, Mexico. *Environ Pollut*. 133:139-146.
- Kim M, Kim D, Yun SJ, Son S. 2008. Relationship of PCDD/Fs congener profiles between beef and raw milk in South Korea. *Chemosphere*. 70:1563-1567.

- Larsen JCh, Farland W, Winters D. 2000. Current risk assessment approaches in different countries. *Food Addit Contam.* 17:359–369.
- Li JG, Wu YN, Zhang L, Zhao YF. 2006. Dietary intake of polychlorinated dioxins, furans and dioxin-like polychlorinated biphenyls from foods of animal origin in China. *Food Addit Contam.* 24:186–193.
- Liem AKD, Fürst P, Rappe C. 2000. Exposure of populations to dioxins and related compounds. *Food Addit Contam.* 17:241–259.
- Lim Y, Yang J, Kim Y, Chang Y, Shin D. 2004. Assessment of human health risk of dioxin in Korea. *Environ Monit Assess.* 92:211–228.
- Lundqvist C, Zuurbier M, Leij M, Johansson C, Ceccatelli S, Saunders M, Schoeters G, Tusscher GT, Koppe J. 2006. The effects of PCBs and dioxins on child health. *Acta Paediatr.* 95:55–64.
- Llerena JJ, Abad E, Caixach J, Rivera J. 2003. An episode of dioxin contamination in feedingstuff: the choline chloride case. *Chemosphere.* 53:679–683.
- Malisch R. 2000. Increase of the PCDD/F-contamination of milk, butter and meat samples by use of contaminated citrus pulp. *Chemosphere.* 40:1041–1053.
- Martí-Cid R, Bocio A, Domingo JL. 2008. Dietary exposure to PCDD/PCDFs by individuals living near a hazardous waste incinerator in Catalonia, Spain: Temporal trend. *Chemosphere.* 70:1588–1595.
- Schechter A, Startin J, Wright C, Kelly M, Pöpke O, Lis A, Ball M, Olson JR. 1994. Congener-specific levels of dioxins and dibenzofurans in US food and estimated daily dioxin toxic equivalent intake. *Environ Health Perspect.* 102(11):962–966.
- Tard A, Gallotti S, Leblanc JC, Volatier JL. 2007. Dioxins, furans and dioxin-like PCBs: Occurrence in food and dietary intake in France. *Food Addit Contam.* 24:1007–1017.
- United Nations Environment Programme (UNEP). 1999. National and Regional Emissions of PCDD/PCDF. Geneva, Switzerland: UNEP.
- United States Environmental Protection Agency (USEPA). 1994. Method 1613: Tetra-through octa-chlorinated dioxins and furans by isotopic dilution HRGC/HRMS. Washington, DC: USEPA.
- Van den Berg M, Birnbaum L, Bosveld BTC, Brunström B, Cook P, Feeley M, Giesy JP, Hanberg A, Hasegawa R, Kennedy SW, et al. 1998. Toxic equivalency factors (TEFs) for PCBs, PCDDs, PCDFs for humans and wildlife. *Environ Health Perspect.* 106:775–792.
- Van Leeuwen FXR, Feeley M, Schrenk D, Larsen JC, Farland W, Younes M. 2000. Dioxins: WHO's tolerable daily intake (TDI) revisited. *Chemosphere.* 40:1095–1101.
- World Health Organization (WHO)/International Agency for Research on Cancer. 1997. IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risk to human. Polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins and polychlorinated dibenzofurans. Vol. 69. Lyon: IARC.
- World Health Organization (WHO). 1998. 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: WHO.