



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**EXTRACCIÓN E IDENTIFICACIÓN DE CLOROFENOLES
COMO UN MÉTODO DE CONTROL DE HÍGADO DE RES
CONTAMINADO: CINÉTICAS DE ABSORCIÓN**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICA DE ALIMENTOS**

PRESENTA

LILIANA OLVERA GUILLÉN



MÉXICO, D.F.

2012



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Profesor: I.Q. Miguel Ángel Hidalgo Torres
VOCAL: Profesor: M. en C. Lucia Cornejo Barrera
SECRETARIO: Profesor: Dr. Pandiyan Thangarasu
1er. SUPLENTE: Profesor: Dra. Hilda Elizabeth Calderón Villagómez
2° SUPLENTE: Profesor: Q.F.B. Bertha Julieta Sandoval Guillén

**SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA: LABORATORIO 114 EDIFICIO F.
FACULTAD DE QUÍMICA. CIUDAD UNIVERSITARIA.**

ASESOR DEL TEMA: DR. PANDIYAN THANGARASU _____
SUPERVISOR TÉCNICO: DRA. HILDA E. CALDERÓN VILLAGÓMEZ _____
SUSTENTANTE: LILIANA OLVERA GUILLÉN _____



ÍNDICE

No.	Tema	Página
1.	ANTECEDENTES	1
1.1.	Alimentos	1
1.2.	Alimentos de origen animal	2
1.3.	Consumo de carne en México	3
1.4.	Importancia del hígado de res en la alimentación de la población mexicana	4
1.5.	Contaminación de alimentos	5
1.5.1.	Contaminación y sus efectos	7
1.6.	Clorofenoles en los alimentos	8
1.6.1.	Vías de ingreso de clorofenoles al ambiente y toxicología	10
1.6.2.	Efectos agudos y crónicos sobre la salud	10
1.6.3.	Vías de ingreso de clorofenoles a los alimentos	11
1.6.4.	Legislación mexicana sobre clorofenoles en carne	12
2	JUSTIFICACIÓN	18
3.	HIPÓTESIS	18
4.	OBJETIVOS	19
4.1.	Objetivo general	19
4.2.	Objetivos particulares	19



5.	MATERIALES Y MÉTODOS	20
5.1.	Materiales	20
5.2.	Métodos	20
5.2.1.	Estandarización del método de identificación y extracción	21
5.2.2.	Niveles de absorción de clorofenoles y fenol en hígado de res	22
5.2.3.	Extracción de grasa	23
6.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	25
6.1.	Curvas de calibración de estándares	25
6.2.	Validación del procedimiento	29
6.2.1.	Porcentajes de recuperación de estándares	29
6.2.2.	Reproducibilidad del método	30
6.3.	Porcentajes de absorción	32
a)	Fenol	32
b)	4-clorofenol	37
c)	2,4- diclorofenol	40
d)	2,4,6-triclorofenol	43
6.4.	Análisis estadístico de los niveles máximos de absorción del fenol, clorofenol, diclorofenol y triclorofenol	47
6.5.	Obtención de los valores de la Constante de absorción (k_a) y tiempo de vida media $t_{1/2}$	49
7.	CONCLUSIONES	54
8.	RECOMENDACIONES	55



9.	BIBLIOGRAFÍA	56
10.	APENDICE I	64
11.	APENDICE II	68



AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Pandiyan Thangarasu por su apoyo y confianza para la realización de este trabajo.

A la Dra Hilda Calderón V. por todo el tiempo dedicado, por ser mi guía para culminar este trabajo ya que sin su apoyo no existiría.
GRACIAS

A la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA IN226310-3) por el apoyo económico para la adquisición de reactivos, materiales y equipo para la realización de este trabajo

A Carlos y Tala por hacer que la parte experimental fuera más fácil para mí, gracias por todo su apoyo y asesoría en todo este tiempo.

Tania y Kipsa gracias por estar conmigo y soportar mis traumas que me provoco este trabajo era más fácil después de hablar con ustedes regresar a trabajar, gracias por tantas porras y palabras de aliento, Tanis después de tanto "no hacer nada" terminamos.

Al mejor equipo que pude encontrar en esta facultad: Isabel, Erika, Marina y Yanet, por ustedes la vida estresante en las aulas y laboratorios de la facultad fue más divertida, gracias por esas horas de estudio, redacción de prácticas pero sobre todo por todos esos momentos en que tuve un hombro en el que podía llorar, alguien con quien compartir alegrías, tristezas, miedos y risas, gracias por todos los momentos que compartimos y que han quedado grabados en mi memoria pero sobre todo en mi corazón.

A mi equipo en la material más complicada que curse todo este tiempo: la de la vida, Angie y Sarahi gracias por todo lo que hemos compartido, por estar ahí cuando necesito un consejo, una abrazo, alguien que me diga que estoy mal, por su constante apoyo y sobre todo por dejarme entrar en su vida, Sarahi gracias por dejarme compartir la etapa más importante de tú vida: ser mamá y por dejarme estar cerca de Alex y poder ser su Tía. Nenas espero que esto sea solo el inicio de muchas aventuras y momentos juntas, no sé que no depara el futuro pero espero que me permita estar cerca de ustedes. Las quiero

Arcadio por todos tus consejos y regaños en los primeros años de la facultad. Bere por preocuparte por mí y por dejarme descubrir a la linda persona que eres.

Y a todos aquellos que estuvieron en mi vida a lo largo de mi aventura para ser Q.A.

Gala y Mía por que me caen bien.



DEDICATORIAS

A mis padres por ser mi más grande e incondicional apoyo, por creer en mí cuando yo misma dudaba, por ser mi ejemplo, por no dejar que me rindiera cuando creía no poder, gracias por los consejos, regaños, y el gran amor que me dan, ya que así lograron hacer de mí la mujer que hoy soy. Este logro es de ustedes por todos los sacrificios y esfuerzos que hicieron para que fuera posible. Fueron, son y serán siempre mi más grande inspiración. Los Amo

Para Ale, Ali y Claus, por todo su apoyo y cariño que me dan (hay una que disimula muy bien que no me quiere pero sé que me adora). Las quiero y si se pudo.

Y por el simple hecho de existir a Dany y Andy.

A mi cielito de cielo por todo su apoyo, paciencia, consejos y amor.



I. ANTECEDENTES

1.1. Alimentos

Un alimento puede ser un órgano, un tejido, una secreción o el organismo entero de una especie, que contiene cantidades significativas de uno o más nutrientes disponibles. Los nutrientes pueden definirse como los compuestos químicos que se obtienen a través de los alimentos para proporcionar energía durante el crecimiento, desarrollo y mantenimiento del organismo; debido a su carencia habrá cambios químicos o fisiológicos en el organismo (García, 1994). Los nutrientes se pueden clasificar como macronutrientes (hidratos de carbono, proteínas y lípidos) y micronutrientes (vitaminas y minerales). Además la ingesta de alimentos debe de ser 1) inocua en las circunstancias habituales de consumo, 2) fácilmente accesible por su amplia disponibilidad y bajo precio, 3) atractiva para los sentidos, 4) aceptable al menos por una cultura y por todo estas características es utilizado por el ser humano con propósitos alimentarios (García,1994, Bourges,2000, Merí, 2005, Gil,2010). Los alimentos procesados, son aquellos que han llevado algún tratamiento físico o químico con el objetivo (casi siempre) de conservarlo en buenas condiciones por mayor tiempo. El creciente interés de los consumidores sobre la información nutricional de los alimentos, ha llevado a la necesidad de clasificarlos de acuerdo a los beneficios de su consumo, raciones y tipo para cubrir las necesidades de nutrientes de acuerdo al estilo de vida de cada individuo (tabla 1).

Tabla 1. Clasificación de los alimentos (Serra y Aranceto, 2006)

Parámetro de clasificación	Clasificación
Origen o procedencia	Vegetal o animal
Composición (teniendo en cuenta la riqueza en uno u otro componente inmediato)	Hidrocarbonados Lipídicos Proteicos
Aporte de energía	Muy energéticos o poco energéticos
Función que desempeñan en el organismo	Energéticos Plásticos Reguladores



1.2. Alimentos de origen animal

Los alimentos de origen animal están considerados como la mejor fuente de proteínas, debido a su contenido y calidad. De acuerdo a su origen, los alimentos se clasifican en animal y vegetal (Gil, 2010). De acuerdo con la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura FAO por sus siglas en Inglés (Food and Agriculture Organization), los principales alimentos de origen animal son: carne, leche (productos lácteos), huevo (productos de huevo) (FAO, 1998), la mayor parte de ellos provienen de mamíferos domesticados (Rodríguez, 2008). De acuerdo a la normatividad Mexicana existen varias definiciones de carne (tabla 2).

Tabla 2. Definición de carne en Normas (oficiales y mexicanas) (Secretaría de Economía, México)

Norma	Definición de carne
NOM-004-ZOO-1994	Estructura compuesta por fibra muscular estriada, acompañada o no de tejido conectivo, elástico, fibras nerviosas, vasos linfáticos y sanguíneos
NOM-009-ZOO-1994	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 el consumo humano
NMX-FF-081-SCFI-2003	Tejidos muscular, conjuntivo y elástico, grasa, vasos linfáticos y sanguíneos, nerviosos, etc., que constituyen las masas musculares que cubren el esqueleto del animal
NOM-158-CSFI-2003	Resultado de la transformación experimentada por el tejido muscular del animal, a través de una serie conectada de procesos fisicoquímicos y bioquímicos



Además, en diversos trabajos se define como la porción comestible de animales sanos destinados para consumo humano, que está constituida primordialmente por tejido muscular y cantidades variables de tejido conectivo, epitelial, nervioso y adiposo, según la localización anatómica, edad, género y especie animal (Hui *et al.*, 2006).

Otros autores la definen desde un punto de vista bromatológico, como el producto alimenticio resultante de la transformación experimentada por el tejido muscular del animal a través de una serie de procesos fisicoquímicos y bioquímicos, que se desarrollan como consecuencia del sacrificio del animal (Gil, 2010). Para fines de este trabajo se define como el producto de la transformación que experimenta el tejido del animal, durante el proceso pos-mortem.

1.3. Consumo de carne en México

En México los tres tipos de carne con mayor consumo per cápita en el 2008 fueron: la carne de pollo (26.3 kg), la de bovino (17.3) kg, y la de cerdo (14.8 kg). Se espera que para el 2012 el consumo per cápita sea de 27.5 kg carne de pollo, 17.1 kg de carne de bovino y de 13.9 kg de carne de cerdo (SAGARPA, 2009), en este aspecto la inocuidad de ésta y de sus derivados es importante para garantizar al consumidor su calidad. Durante la producción de carne de res, no solo se obtiene la canal que es el producto de mayor importancia, también se obtienen las vísceras que son subproductos en la obtención de la canal y que en la gastronomía mexicana se utilizan para la preparación de diferentes platillos. En México se consume mayoritariamente el hígado de res, a diferencia de otros países, por implicaciones socioculturales ya que forma parte de la gastronomía Nacional, y por ser un alimento de bajo costo y nutritivo (Gironella y De'Angeli, 2006).

Desde el punto de vista anatómico, el hígado es una víscera, (König *et al.*, 2005) y en la NOM-008-ZOO-1994, se denomina como víscera roja, ya que está contenido en la cavidad torácica. Para el Codex es un producto de categoría B (productos de origen animal) ubicado en la sección de despojos de mamíferos al igual que la carne de mamífero y la carne de aves (CAC/GL 33-1999).



1.4. Importancia del hígado de res en la alimentación de la población mexicana

Con base en las propiedades nutrimentales que tiene el hígado de res se considera como un alimento rico en hierro y se recomienda para prevenir y disminuir la anemia en la población y necesario para el desarrollo físico óptimo de los niños. Es una fuente importante de hierro que se asimila mejor que el hierro contenido en otros alimentos (frutas y verduras) por el contenido de vitamina C la cual mejora la asimilación del mineral, por lo cual es un alimento ideal para satisfacer las deficiencias de hierro en la dieta de la población (García, 1994).

Estudios realizados en México sobre la prevalencia de anemia, mostraron que el 20% de las mujeres de 12 a 49 años no embarazadas a nivel nacional padecen anemia. La mitad de ellas fueron sometidas a un tratamiento a base de una dieta rica en hígado de res, y al realizar nuevamente las pruebas se encontró que solo el 2% seguían presentado esta condición médica (FAO, 2003). Se sabe que de 100 gramos de hígado de res el 98% es comestible, que tiene una humedad del 69.9% y no contiene fibra. En la tabla 3 se observa el contenido nutricional de 100 g de hígado de res de acuerdo con el Instituto Nacional de Nutrición Salvador Zubirán (INEGI, 2009):

Tabla 3. Contenido nutricional en 100 g de hígado de res (INEGI, 2009)

Característica	Contenido
Contenido energético	143.0 kcal
Proteínas	20.0 g
Calcio:	6.0 g
Hierro:	6.8 g
Retinol	10.50 mg
Ácido ascórbico	2.0 mg
Tiamina	3 mg
Riboflavina	2.8 mg
Niacina:	12.8 mg



De acuerdo con el INEGI, el hígado es uno de los alimentos que se consumen en el país con mayor contenido de hierro, 100 gramos de este alimento proporcionan 6.8 mg, este contenido solo está por debajo del germen de trigo (9.4 mg), el pan de caja (28.4 mg), garbanzo (8.9 mg), haba seca (7.3 mg) ajonjolí (9.5 mg), semilla de calabaza (9.2 mg), chile guajillo (10.1 mg), hígado de cerdo (23.3 mg) y con un contenido semejante al de las hojuelas de maíz (6.3 mg), calabaza criolla (6.4 mg), hojas de quelite de trapo (6.2 mg) ostiones sin concha (6.3 mg) y con valores superiores que los que presentan las frutas, la carne de aves (guajolote, pollo y pato), las carnes procesadas, pescados y mariscos (a excepción de los ostiones sin concha), los productos lácteos y el huevo (INEGI, 2009).

1.5. Contaminación de alimentos

El Codex Alimentarius define a la inocuidad como la garantía de los alimentos a no causar daño al consumidor cuando se preparen y/o consuman de acuerdo con el uso a que se destinan (CAC/RCP 1-1969). Durante la cadena de producción, se puede comprometer la inocuidad del alimento y provocar su contaminación; un alimento contaminado de forma accidental y no por su incorporación en forma consciente representan un riesgo para la salud del consumidor (Forsythe y Hayes 2010).

Para el Codex Alimentarius un contaminante es cualquier agente biológico o químico, materia extraña u otras sustancias no añadidas intencionalmente a los alimentos y que puedan comprometer la inocuidad o la aptitud de los alimentos (CAC/RCP 1-1969). Un contaminante para la FAO es cualquier sustancia no añadida intencionalmente al alimento, que está presente en dicho alimento como resultado de la producción (incluidas operaciones realizadas en agricultura, zootecnia y medicina veterinaria), fabricación, elaboración, preparación, tratamiento, envasado empaquetado, transporte o almacenamiento de dicho alimento o como resultado de la contaminación ambiental (FAO, 1998). Aunque se tienen dos definiciones de contaminante ambas coinciden en que están en el alimento de forma accidental.

Para clasificar la contaminación de un alimento se pueden tomar en cuenta diversos parámetros como son:



-
- El agente causal de la contaminación de los alimentos. 1) Contaminación Biótica: debida a la presencia de microorganismos patógenos, parásitos, virus y productos tóxicos de origen biológico y 2) Contaminación Abiótica: por la presencia de productos químicos o residuos y contaminantes radioactivos (Mello, 2003). Por otra parte, las fuentes de contaminación son varias y algunas de ellas son: El propio alimento, el agua con los que se obtienen, manejan o procesan, las superficies con las que está en contacto el alimento, los seres vivos (hombre, animales domésticos, etc.), y productos derivados del ser humano (Casabal, 2007).
 - El mecanismo de contaminación: 1) Contaminación primaria o de origen: si se genera durante el proceso mismo de producción del alimento. 2) Contaminación directa: a causa de la exposición de los alimentos a los agentes contaminantes ya sea por la persona que los manipula, las superficies con las que entra en contacto y la exposición a los mismos. 3) Contaminación cruzada: está relacionada con el paso de cualquier contaminante (bacteria, producto químico, elemento físico), desde un alimento o materia prima contaminados a otro que no lo está, o bien la exposición de superficies que se encuentran limpias (mesas, equipos, utensilios) con alimentos contaminados (Márquez, 2008).
 - El nivel de contaminación depende del proceso de producción de un alimento. En el caso de los no procesados la contaminación puede darse a nivel producción, transporte, almacenamiento o distribución. Para alimentos procesados puede ser en materias primas, procesamiento, transporte, almacenamiento y distribución.

De acuerdo con la Agencia de registro de enfermedades y Sustancias tóxicas de los Estados Unidos de Norteamérica, A.T.S.D.R (2011) por sus siglas en inglés (Agency for Toxi Substances & Disease Registry U.S.A) se observa:

1) Contaminación biológica alimentaria: Debida a la invasión de microorganismos patógenos durante la elaboración, manipulación, transporte y distribución al público de los alimentos, o también es originada por el mismo consumidor. Causada



principalmente por: a) Animales enfermos, b) Personas enfermas que manipulan alimentos y c) falta de condiciones y personal adecuado.

2) Contaminación química alimentaria: Se origina por la presencia de residuos (principio activo original y/o metabolitos provenientes de la biotransformación del compuesto con el cual se estuvo en contacto) de elementos o sustancias químicas procedentes de actividades humanas y por la adición a los alimentos de sustancias tóxicas; causada por: a) Metales pesados (plomo, arsénico, mercurio, cadmio, cobalto, estaño y manganeso), b) Pesticidas (biocidas o agrotóxicos,) utilizados en los cultivos para el control de plagas (carbamatos, insecticidas organofosforados, fungicidas y herbicidas), c) Restos de medicamentos y sustancias de crecimiento (antibióticos y hormonas) aplicados a los animales, d) Aditivos utilizados en la elaboración de alimentos ya sea para intensificar sus características propias o, para evitar su deterioro (biológico o fisicoquímico) y, e) Sustancias tóxicas naturales como micotoxinas y alérgenos (Márquez, 2008).

Existen compuestos que están en contacto con los animales de los cuales se obtienen productos para consumo humano, como son los clorofenoles ,que pueden entrar en contacto directo con el animal o por medio de contaminación indirecta del medio, ya que se utilizan en múltiples industrias (Wade, 1993).

3) Contaminación física: Debida a la presencia de fragmentos de vidrio o de metal de la maquinaria, polvo y humo nocivo.

1.5.1. Contaminación y sus efectos

Dada la complejidad para la cuantificación, observación y detección de daños colaterales y consecuencias adversas por el ingreso al organismo de alimentos contaminados, el consumo de estos puede provocar efectos directos en la salud (alergias, resistencia microbiana, carcinogenicidad, mutagenicidad, teratogenicidad), cambios morfo-fisiológicos (por sustancias hormonales), alteraciones en el depósito de calcio en los huesos (oxitetraciclina), anemia aplásica (cloranfenicol), y alteraciones en el sistema nervioso (Márquez, 2008).



El garantizar la inocuidad de los alimentos tiene como principales objetivos a) La salud pública y b) El comercio internacional. En el caso de la salud pública, la inocuidad de los alimentos garantiza la salud del consumidor. En el comercio internacional el obtener productos de origen animal que cumplan con todas las especificaciones sanitarias da la pauta para exportarlos a países con los más altos estándares de calidad. En la actualidad, la producción de alimentos inocuos, de origen animal constituye una preocupación importante a escala mundial y demanda soluciones urgentes por sus implicaciones en la salud pública y el comercio de alimentos a nivel internacional y nacional.

1.6. Clorofenoles en los alimentos

Los clorofenoles se utilizan en procesos de síntesis de diferentes compuestos químicos como son materia prima para la elaboración de plaguicidas y preservadores de pieles, telas y maderas, recubrimientos aislantes e intermediarios en la producción de fármacos y medicamentos de uso veterinario; y en el caso de los mono y diclorofenoles, estos se utilizan también para la síntesis de clorofenoles superiores (tetra o pentaclorofenoles), elaboración de desinfectantes, y soluciones fotográficas, debido a ello existe un alto riesgo de contacto con los animales y el humano por residuos de estos en el ambiente. Los clorofenoles se obtienen por cloración directa del fenol. Son compuestos químicos orgánicos, en los cuales se han reemplazado uno o más de los átomos de hidrógeno del fenol por uno o más átomos de cloro. Se han identificado cinco tipos básicos de clorofenoles: monoclorofenoles, diclorofenoles, triclorofenol, tetraclorofenol y pentaclorofenol. El número total de clorofenoles es de 19, de acuerdo a la posición y número de átomos de cloro en la molécula del fenol (Wade, 1993, Martínez, 2002, Gil, 2010).



Los clorofenoles en los cuales se enfoca este trabajo se presentan en la figura 1 (Huerta, 2011):

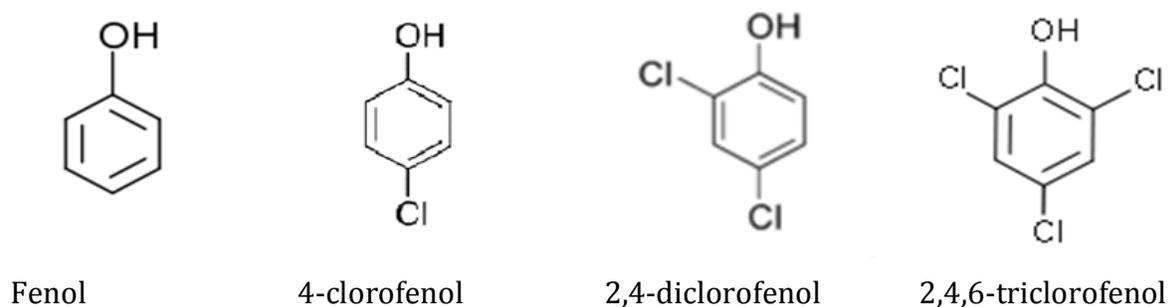


Figura 1. Estructura química del fenol, 4-clorofenol, 2,4-diclorofenol y 2,4,6-triclorofenol.

Al analizar la densidad electrónica de los cuatro compuestos (figura 2) se puede observar que al aumentar el número de sustituyentes cloro disminuye la densidad electrónica dentro del anillo aromático (aparición del color azul), causando un aumento en las fuerzas de atracción de los electrones libres del OH hacia el centro de la molécula para disminuir la deficiencia electrónica (Huerta, 2011).

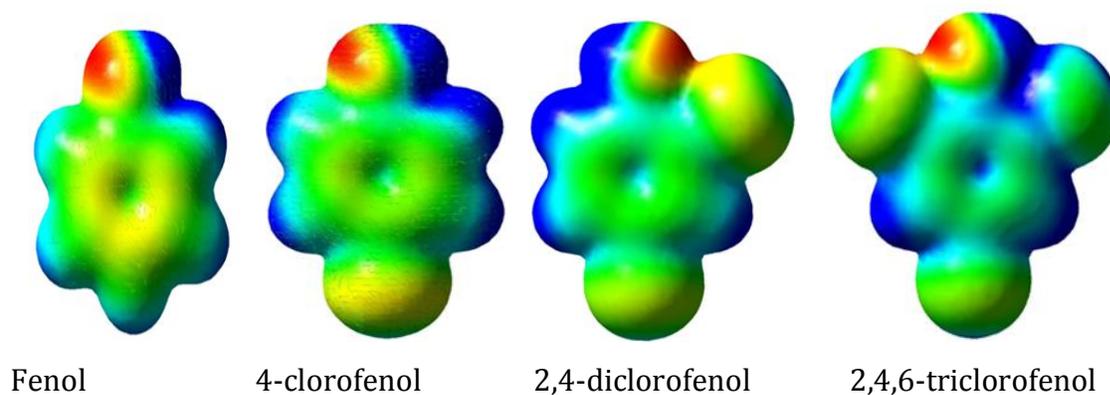


Figura 2. Densidad electrónica del fenol, 4-clorofenol, 2,4-diclorofenol y del 2,4,6-triclorofenol.



1.6.1. Vías de ingreso de clorofenoles al ambiente y toxicología

La mayoría de los clorofenoles liberados en el ambiente se depositan en el agua, y en pocas cantidades en las partículas del aire. Además, durante la desinfección con cloro de las aguas residuales se llegan a formar clorofenoles en pequeñas cantidades, lo cual se favorece por la presencia de algunos contaminantes presentes en el agua tratada que reacciona con el cloro (Wade, 1993; Gil, 2010).

De acuerdo con estudios realizados por la Organización de las Naciones Unidas (ONU, 2001), la exposición a nivel mundial de humanos adultos a los clorofenoles se estimó en 15 mg al día, siendo los alimentos la vía de exposición con mayor contribución (40%), siguiendo el agua (19%), el aire y el ambiente (28%) y otros (13%). Cuando un individuo está expuesto a los clorofenoles la absorción por el organismo es rápida y fácil, ya sea por vía respiratoria, oral y dérmica.

1.6.2. Efectos agudos y crónicos sobre la salud

En diferentes estudios, se han encontrado que estos compuestos se acumulan principalmente en el hígado y los riñones de los animales de experimentación y en menor grado en el cerebro, músculo y grasa.

El 4-clorofenol es corrosivo; provoca irritación e incluso quemaduras en la piel y ojos. Puede irritar la nariz, la garganta y los pulmones causando tos, respiración con silbido y/o falta de aire. La exposición prolongada puede causar dolores de cabeza, mareos, fatiga, agitación, debilidad muscular, temblores, ataques, coma y hasta la muerte. Es posible que cause daño al hígado y a los riñones (Servicio Ocupacional, 1999a).

El 2,4-diclorofenol al ser inhalado y/o absorbido por la piel, puede irritar y quemar la piel y los ojos (Servicio Ocupacional, 1999b), irritar la nariz, la garganta y los pulmones, causando tos, respiración con silbido o falta de aire. Puede ocasionar daños al hígado y a los riñones, la exposición repetida puede afectar al sistema nervioso, causando dolor de cabeza, mareo, náusea, vómitos, debilidad e incluso coma. No existe evidencia concreta para la identificación de este compuesto como carcinógeno, pero se aconseja su manipulación con precaución. No representa riesgo para la reproducción.



Al aumentar el número de sustituyentes en la molécula del fenol, aumentan los efectos tóxicos de los clorofenoles. Una intoxicación aguda de un organismo por clorofenoles con menos de 3 sustituyentes cloro en la molécula tienen como consecuencia en el organismo: contracciones musculares, espasmos, temblores, debilidad, ataxia, convulsiones y desvanecimiento (ONU, 2001)

1.6.3. Vías de ingreso de clorofenoles a los alimentos

Las principales vías de ingreso de los clorofenoles son aire, suelo, agua, seres vivos y alimentos los cuales constituyen contaminación de tipo ambiental. 1) Consumo de aguas contaminadas provenientes de arroyos, lagos o ríos por el ganado, causado por los desechos de industrias que emplean clorofenoles para síntesis, o como productos de ellas. Representando una fuente de contaminación cruzada al obtenerse subproductos alimenticios que transportan clorofenoles y por consiguiente ingresan al cuerpo humano. De acuerdo con reportes de la A.T.S.D.R (2011) por sus siglas en inglés (Agency for Toxic Substances & Disease Registry U.S.A), los niveles en aguas residuales de monoclórofenol son de 10-20 $\mu\text{g/L}$, de diclorófenol y triclorófenol son de 130 $\mu\text{g/L}$ cada uno, en aguas procedentes de la industria papelera, farmacéutica, eléctrica, y la industria productora de plásticos. Además, al clorar el agua de consumo pueden originarse clorofenoles, estudios realizados en Canadá muestran la presencia de clorofenoles en sistemas acuáticos donde se incluyen plantas de tratamiento de agua, y agua para consumo humano.

2) Arrastre de clorofenoles por viento o lavado de suelos por el agua de lluvia. Al aplicar plaguicidas en forma aérea, el viento transporta los contaminantes de la zona de aplicación a zonas aledañas, incrementando el riesgo del ganado por la ingesta de pastos contaminados con residuos de clorofenoles y, de esta forma, la presencia en productos derivados. Un ejemplo de ello, en los años 60's es la presencia de pesticidas organoclorados y con ellos compuestos fenólicos en la Isla Ross en la Antártida pese a la poca actividad antropogénica. Se llegó a la conclusión de que la presencia de estos compuestos en esa región se debía al transporte atmosférico. En la década de los 80's



se encontraron residuos de plaguicidas organoclorados en peces y zooplanton procedentes de la misma región de la Isla Ros (Calva y Torres, 1998).

3) Uso de clorofenoles para el control de plagas en el ganado, con ello los animales de crianza y los humanos pueden intoxicarse al estar en contacto directo con estos compuestos mediante absorción dérmica o por inhalación. En estudios realizados en regiones productoras de plaguicidas se ha detectado una alta incidencia de menarca temprana (primera menstruación) en las niñas que viven en los alrededores de estas zonas. Lo cual se debió a la exposición a clorofenoles, ya que éstos interaccionan con los receptores a esteroides los cuales están involucrados en la respuesta de los genes reguladores, y que provocan acciones estrogénicas o antiestrogénicas (Mendoza, 2008)

4) Tratamiento con plaguicidas de materias primar (heno, ensilaje y otros) para la elaboración de alimento para ganado. De esta forma ingresan clorofenoles al ganado y con ello a la gran variedad de subproductos que llegan a los consumidores. Estudios realizados en el ganado lechero (Prado *et al.*, 1998) han encontrado plaguicidas en leche ($0.05 \mu\text{g}/\text{g}$ - $0.12\mu\text{g}/\text{g}$).

5) Pastoreo de ganado en campos tratados con plaguicidas, lo que implica contaminación del ganado y de las fuentes de agua, por el arrastre de lodos en época de lluvias. En las últimas décadas los clorofenoles se han distribuido ampliamente en el ambiente terrestre y acuático, al ser utilizados constantemente para combatir plagas en la industria, la agricultura, la ganadería, e incluso durante campañas de salud para el control de la malaria (Calva y Torres, 1998).

1.6.4. Legislación mexicana sobre clorofenoles en carne

Se han mencionado los efectos de los clorofenoles sobre la salud de los seres vivos, y las vías por las cuales pueden entrar a los alimentos de origen animal; sin embargo, en la legislación mexicana no se considera el análisis de estos compuestos en la carne.



De acuerdo con la Secretaría de Economía de los Estados Unidos Mexicanos, existen 25 Normas Oficiales (actualmente vigentes) que garantizan la inocuidad de la carne (tabla 4):

Tabla 4. Normas vigentes relacionadas con el control e ingesta de carne (Secretaría de Economía. México)

Norma	Descripción
NOM-004-ZOO-1994	Control de residuos tóxicos en carne, grasa, hígado y riñón de bovinos, equinos, porcinos y ovinos.
NOM-007-ZOO-1994	Campaña Nacional contra la Enfermedad de Aujesky.
NOM-008-ZOO-1994	Especificaciones zoosanitarias para la construcción y equipamiento de establecimientos para el sacrificio de animales y los dedicados a la industrialización de productos cárnicos.(modificada)
NOM-009-ZOO-1994	Proceso sanitario de la carne.
NOM-010-ZOO-1994	Determinación de cobre, plomo y cadmio en hígado, músculo y riñón de bovinos, equinos, porcinos, ovinos y aves, por espectrometría de absorción atómica.
NOM-011-ZOO-1994	Determinación de sulfonamidas en hígado y músculo de bovinos, ovinos, equinos, porcinos y aves por cromatografía capa fina densitometría.
NOM-014-ZOO-1994	Determinación de cloranfenicol en músculo de bovinos equinos, porcinos, ovinos y aves, por cromatografía de gases.
NOM-015-ZOO-1994	Análisis de arsénico, en hígado, músculo y riñón de bovinos, equinos, porcinos, ovinos y aves por espectrometría de absorción atómica.
NOM-016-ZOO-1994	Análisis de mercurio en hígado, músculo y riñón de bovinos, equinos, porcinos, ovinos y aves, por espectrometría de absorción atómica.
NOM-017-ZOO-1994	Análisis de bencimidazoles en hígado y músculo de bovinos, equinos, porcinos, ovinos y aves por cromatografía de líquidos alta resolución.



Continuación tabla 4

NOM-019-ZOO-1994	Campaña nacional contra la garrapata <i>Boophilus spp.</i>
NOM-020-ZOO-1995	Determinación de ivermectinas en hígado de bovinos equinos, porcinos, ovinos y aves por cromatografía de líquidos alta resolución.
NOM-021-ZOO-1995	Análisis de residuos de plaguicidas organoclorados y bifenilos policlorados en grasa de bovinos, equinos, porcinos, ovinos y aves por cromatografía de gases.
NOM-023-ZOO-1995	Identificación de especie animal en músculo de bovinos, ovinos, equinos, porcinos y aves, por la prueba de inmunodifusión en gel.
NOM-025-ZOO-1995	Características y especificaciones zoosanitarias para las instalaciones, equipo y operación de establecimientos que fabriquen productos alimenticios para uso en animales o consumo por éstos.
NOM-028-ZOO-1995	Determinación de residuos de plaguicidas organofosforados, en hígado y músculo de bovinos, equinos, porcinos, ovinos, caprinos, cérvidos y aves, por cromatografía de gases.
NOM-030-ZOO-1995	Especificaciones y procedimientos para la verificación de carne, canales, vísceras y despojos de importación en puntos de verificación zoosanitaria.
NOM-031-ZOO-1995	Campaña nacional contra la tuberculosis bovina (<i>mycobacterium bovis</i>).
NOM-032-ZOO-1996	Determinación de antibióticos en hígado, músculo y riñón de bovinos, ovinos, equinos, porcinos, aves, caprinos y cérvidos por la prueba de la torunda y por bioensayo.
NOM-034-ZOO-1996	Determinación de dietilestilbestrol, zeranol y taleranol en hígado y músculo de bovinos, equinos, porcinos, ovinos, aves, caprinos y cérvidos por cromatografía de gases- Espectrometría de masas.
NOM-037-ZOO-1995	Campaña nacional contra la fiebre porcina clásica.
NOM-041-ZOO-1995	Campaña nacional contra la brucelosis en los animales.



Continuación tabla 4

NOM-046-ZOO-1995	Sistema Nacional de Vigilancia Epizootiológica.
NOM-054-ZOO-1996	Establecimiento de cuarentenas para animales y sus productos.
NOM-213-SSA1-2002	Productos y servicios. Productos cárnicos procesados. Especificaciones sanitarias. Métodos de prueba.

De las veinticinco Normas Oficiales, trece están relacionadas con el análisis o determinación de compuestos tóxicos en productos de origen animal (la 004, 009, 010, 011, 014 a 017, 020, 021, 028, 032 y 034). Las nueve Normas Oficiales restantes, están relacionadas con las condiciones para la obtención de la carne, el control o erradicación de enfermedades del ganado y plagas de este.

La NORMA Oficial Mexicana NOM-004-ZOO-1994 “Control de residuos tóxicos en carne, grasa, hígado y riñón de bovinos, equino, porcinos y ovinos”, en la cual se define a los pesticidas organoclorados (incluyendo al pentaclorofenol), como compuestos químicos potentes y persistentes, que pueden causar efectos teratogénicos, cancerígenos y cuya bioacumulación en el organismo puede ser de 10 a 30 veces mayor que lo ingerido en el alimento. Debido a que su metabolismo y eliminación es lento y el tiempo de vida media de estos compuestos puede ser de varios meses en los mamíferos o de varios años en los suelos áridos. Solo, se indican los tejidos en los cuales se realizan las pruebas y los métodos para determinar los niveles de cada uno de los compuestos que están considerados como tóxicos y que se pueden encontrar en la carne.

Los tejidos que establece la NOM-004-ZOO-1994 para la determinación de plaguicidas organoclorados en carne se mencionan en la tabla 5, Además, se establecen los límites máximos de residuos de plaguicidas (mg/kg o ppm), tanto en bovinos, equinos, porcinos y ovinos, sin embargo, no se indica el nivel para el pentaclorofenol ya que de acuerdo con el CICLOPAFEST es un plaguicida de uso restringido y los clorofenoles los clasifica como compuesto de mediana toxicidad con características similares a plaguicidas que contienen en su estructura clorofenoles (CICLOPLAFEST, 2004).



Tabla 5. Estudio de tejidos para la determinación de los diferentes pesticidas así como el método que se debe de emplear para su determinación (NOM-004-ZOO-1994)

Compuesto	Tejidos	Métodos
Organoclorados	Grasa	Cromatografía en columna Cromatografía de gases

La NORMA Oficial Mexicana NOM-021-ZOO-1995 “Análisis de residuos de plaguicidas organoclorados y bifenilos policlorados en grasa de bovinos, equinos, ovinos y aves por cromatografía de gases”. Establece el método oficial para la determinación de estos compuestos, pero solo indica la forma en que se deben de tratar las muestras para la cuantificación de los plaguicidas en la grasa.

Para el caso de los compuestos fenólicos (dentro de los cuales están los clorofenoles), las normas que incluyen los niveles máximos permitidos son las relacionadas con el agua (Norma Oficial Mexicana NOM-127-SSA1-1994 “Salud Ambiental, agua para uso y consumo humano-límites permisibles de calidad y tratamientos a que debe someterse el agua para su potabilización”), indicando los niveles permitidos de fenoles y compuestos fenólicos (0.001 mg/L) en el agua que será potabilizada.

La NORMA Oficial Mexicana NOM-179-SSA1-1998, “Vigilancia y evaluación del control de calidad del agua para uso y consumo humano, distribuida por el sistema de abastecimiento público.” Establece los análisis fisicoquímicos que se debe de aplicar al agua (determinación de cloro, análisis de olor y sabor, nivel de turbiedad y niveles de metales pesados, fenoles o compuestos fenolicos, y de plaguicidas), además, menciona como límite (0.001 mg/L) para cada uno de estos compuestos el indicado en la NOM-127-SSA1-1994.

Para el caso de los clorofenoles en productos cárnicos no se puede llevar a cabo un Análisis Legal Corporativo ya que la falta de legislación acerca de la identificación y cuantificación para estos compuestos es tanto a nivel nacional como internacional



(como la FDA y la Unión Europea) ya que los clorofenoles no se consideran productos tóxicos que se puedan encontrar en estos productos por lo cual su identificación no está establecida como prueba rutinaria o especial para productos cárnicos.

La implementación de un método oficial para la determinación y cuantificación de los clorofenoles en productos cárnicos es una necesario para garantizar la inocuidad del alimento y con esto garantizar al consumidor que el productos que ingiere no representa un riesgo para su salud ni a largo ni a mediano plazo, que es una de las condiciones que se deben de buscar en todos los alimentos y que debido a la falta de conciencia de la responsabilidad que es producir, comercializar, trasportar, vender, almacenar y comprar productos alimenticios ya que debido a la frecuencia y cantidad con la que son consumidos estos productos se puede estar exponiendo al consumidor a una intoxicación crónica (pequeñas dosis durante largos periodos) por diferentes compuestos tóxicos o por uno solo (Casaval,2007).

Por lo cual le compete a la SAGARPA a través de la Dirección General de Salud Animal, a la, así como la SEMARNAT a través de la Dirección General de Manejo Integral de Contaminantes, a la SSA a través de la Dirección General de Salud Ambiental y a la Secretaría de Economía por medio de la Dirección General de Industrias, determinar si se debe de incluir a los clorofenoles en la NOM-004-ZOO-1994 y establecer la metodología que se debe de implementar para su identificación y cuantificación, considerando trabajos de investigación publicados recientemente acerca de la persistencia de estos compuestos así como los daños en la salud de quien consume alimentos contaminados con clorofenoles; y es responsabilidad de la Dirección General de Salud Animal de la SAGARPA supervisar su cumplimiento.



2. JUSTIFICACIÓN

Los clorofenoles pueden entrar a los sistemas biológicos a través de alimentos contaminados. Por lo cual al llevar a cabo la contaminación artificial del hígado de res con clorofenoles, se puede determinar el nivel de absorción de estos compuestos tóxicos, y así estudiar la capacidad absorción/recuperación de los clorofenoles en hígado de res, utilizando técnica de Soxhlet para la extracción y la de cromatografía de HPLC para la de identificación y cuantificación de los compuestos.

La técnica oficial indicada en el AOAC (PANREAC, 1999), para la cuantificación de compuestos tóxicos en alimentos emplea Soxhlet (éter de petróleo por 8 h) y cromatografía de gases al igual que la indicada en la legislación mexicana (NOM-004-ZOO-1994). Sin embargo en México, el uso de la cromatografía de líquidos en la industria alimentaria es una práctica cada vez más común, principalmente para la identificación de aditivos alimentarios (Kumar *et al.*, 2009).

Por lo anteriormente expuesto se plantea la hipótesis correspondiente.

3. HIPÓTESIS

Al aumentar el número de sustituyentes cloro en la molécula de fenol aumenta el porcentaje de absorción en el hígado de res; debido a que aumenta la afinidad por medios hidrófobos del sistema, de esta forma la molécula con mayor nivel de absorción y de biacumulación será el 2,4,6-triclorofenol, y el fenol será el compuesto que más tiempo se llevará en absorberse debido a su afinidad por medios acuosos. Por lo que al aumentar el número de sustituyentes cloro aumentará la velocidad de absorción.



4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo general.

Estudiar la capacidad de absorción / recuperación de clorofenoles en hígado de res.

4.2. Objetivos particulares

- Determinar la eficiencia del método de extracción Soxhlet y cuantificación de clorofenoles por cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC).
- Estudiar los efectos del grado de cloración del anillo aromático en la capacidad de absorción / recuperación de estos en hígado de res.
- Obtener los coeficientes absorción de clorofenoles en hígado de res
- Determinar los tiempos de máxima absorción de clorofenoles en el hígado de res.



5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Materiales

Material biológico: Hígado de res, proviene: de un mercado cerca de los alrededores de Ciudad Universitaria.

Disolventes y reactivos: Ácido sulfúrico, Éter de petróleo (J.T.Beker), Sulfato de sodio anhidro (Merck), Acetonitrilo HPLC (Riedel-deHaën), Metanol HPLC (Fermont), Fenol , 4-clorofenol, 2,4-diclorofenol, 2,4,6-triclorofenol (Sigma-Aldrich).

Equipo: Balanza analítica marca OHAUS Modelo EP124C, Máx 210 g d=0.1 mg. HPLC marca VARIAN, Bomba modelo PS 210 con detector UV- VIS modelo 310, Columna Varian Persut C18 150 x 4.6 mm. Estufa al vacío marca National Appliance Company Modelo L5831, mini soxhlet Marca Pirex, Rotavapor marca Buchi R-205.

5.2 Métodos

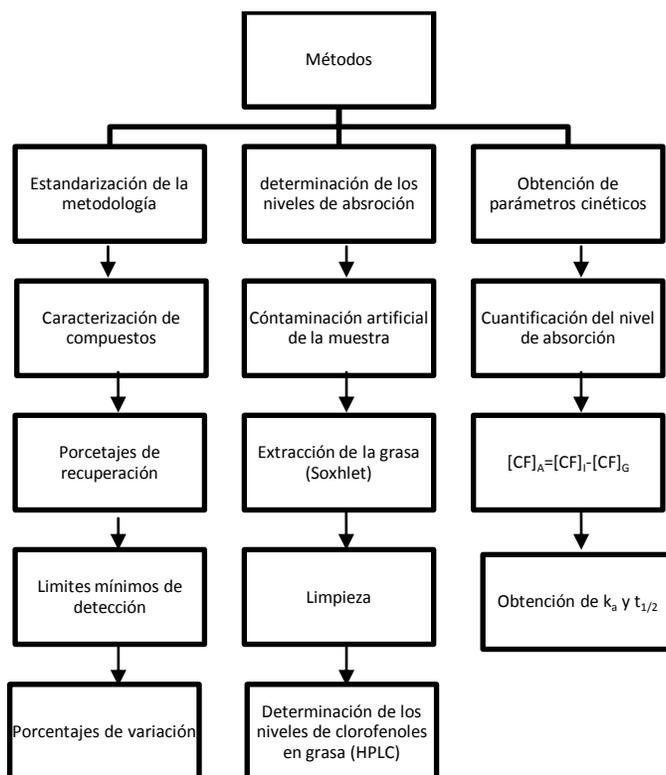


Figura 3. Diagrama de trabajo.



5.2.1. Estandarización del método de identificación y extracción

Se realizó comparándolos con los tiempos de retención (TR) y áreas de cada uno de los clorofenoles de estudio (4-clorofenol, 2,4-diclorofenol, 2,4,6-triclorofenol y fenol). Mediante inyecciones sucesivas en el cromatógrafo de líquidos (HPLC), de acuerdo a la secuencia de concentraciones que se indican en la tabla 6, disueltos en acetonitrilo:metanol (80:20), con las siguientes condiciones: $\lambda = 240$ nm, fase móvil = acetonitrilo: metanol (80:20), flujo = 1.0 mL/min, tiempo de corrida 10 min, columna PC18 marca Varian (150 x 4.6 mm). Las curvas patrón de c/u de los clorofenoles de estudio se obtienen por triplicado.

Tabla 6. Intervalos de concentración de los clorofenoles de estudio.

Compuesto	Intervalo (mg/mL)
Fenól	0.0 – 5.5 x10 ⁻³
4-clorofenol	0.0 – 5.5 x 10 ⁻³
2,4-diclorofenol	0.0 – 0.32
2,4,6-triclorofenol	0.0 – 0.03

Los porcentajes de recuperación se obtienen al tratar cada uno de los compuestos de interés (de concentración conocida) al procedimiento de extracción (vía Soxhlet con éter etílico durante 8 h) y limpieza (Waliszewski *et al.*, 1996) al cual se somete la muestra de estudio (hígado de res), lo anterior se realiza por triplicado.

En el caso del fenol, se utiliza el hígado de res seco, debido a su alta solubilidad en agua, por lo que se elimina el uso del agente secante (sulfato de sodio anhidro) en el paso previo a la extracción de la grasa.



5.2.2. Niveles de absorción de clorofenoles y fenol en hígado de res

- Caracterización de la muestra (hígado de res)

Se realiza la determinación de humedad en estufa a vacío (70 °C) y el contenido de grasa por extracción en Soxhlet con éter petróleo durante 8 h (PANREAC, 1999).

- Niveles de absorción de clorofenoles

Se llevó a cabo mediante contaminación artificial colocando en un frasco de laboratorio, 5.0 g de hígado de res húmedo cortado en pequeños trozos, y 6.0 mL (0.005 mg/mL en acetonitrilo:metanol 80:20), del compuesto de estudio. Los cuales se mezclan (1 minuto) y se dejan en contacto de acuerdo a los tiempos especificados en la tabla 7. Al concluir cada uno de los tiempos se lleva a cabo la extracción de la grasa. El mismo procedimiento se llevó a cabo para el fenol sólo que la muestra de hígado de res fue previamente secada (estufa 70 °C durante 24 h). Cada tratamiento se llevó a cabo por duplicado.

Tabla 7. Tiempos de exposición del fenol y de los clorofenoles de estudio

Tiempo	Tiempos de contaminación (h)
0	0*
1	0.5
2	1
3	4
4	8
5	16
6	24

*El tiempo cero la muestra solo estuvo expuesta al compuesto durante 1 minuto



Una vez que se conoce el perfil del comportamiento de c/u de los clorofenoles de estudio se realizarán pruebas en los tiempos donde el comportamiento sea lineal.

5.2.3. Extracción de grasa

- Colocar en un mortero la muestra contaminada (5.0 g) y agregar sulfato de sodio anhidro (la cantidad necesaria para obtener un polvo) y homogeneizar.
- Posteriormente, la totalidad de este polvo se somete a extracción por Soxhlet (8 horas a reflujo utilizando éter de petróleo).
- El extracto crudo se concentra en rotavapor (40 °C) hasta aproximadamente 30.0 mL. Una vez concentrado se deja reposar por 30 minutos a temperatura ambiente.
- Se toma una alícuota (10.0 mL) del extracto y se trasvasa a un tubo de ensayo (con tapón), al cual se le adiciona ácido sulfúrico concentrado (1.0 mL). Se tapa perfectamente y se agita vigorosamente durante 1 min, posteriormente se deja reposar para obtener la separación de fases.
- La fase orgánica se filtra a través de una capa de sulfato de sodio anhidro (3.0 g), y se recupera en un matraz de 50.0 mL. Lavar el sulfato de sodio anhidro con éter de petróleo (2 veces con 3.0 mL c/u), coleccionar fracciones (extracto y enjuague) y concentrar en rotavapor (40 °C). El extracto concentrado se trasvasa cuantitativamente a un matraz volumétrico de 1.0 mL y se afora con éter de petróleo.
- Para el análisis cuantitativo se toman 20 μ L, (jeringa Hamilton) y se inyectan por triplicado al HPLC siguiendo el procedimiento anteriormente mencionado.

Los resultados obtenidos se analizan mediante un análisis de varianza (ANOVA) con un nivel de significancia $\alpha= 0.05$. Estableciéndose como hipótesis nula (H_0) la igualdad de cada uno de los tratamientos y como hipótesis alternativa (H_1) la diferencia entre ellos, para tal efecto se aplicará el método estadístico de Diferencia Mínima Significativa (DMS).



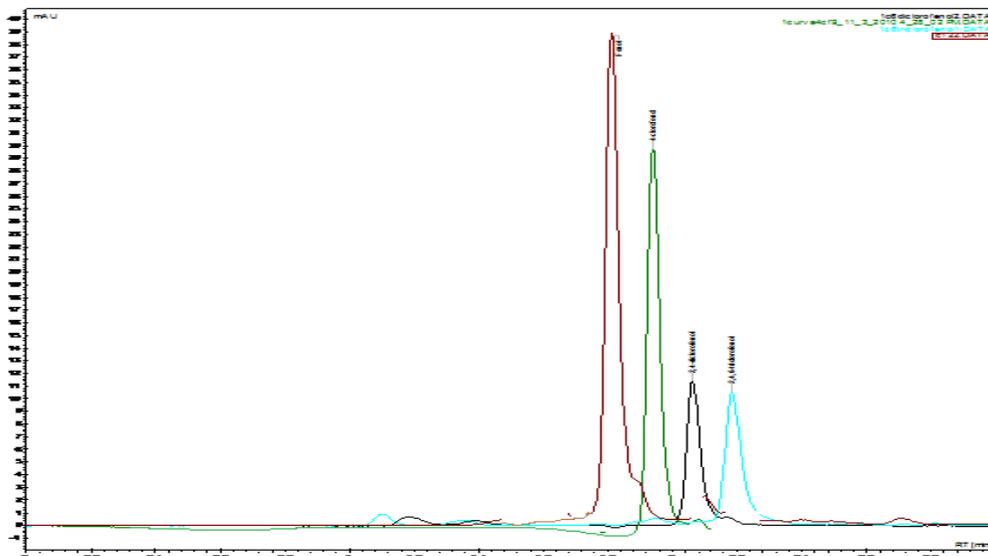
Los parámetros cinéticos como son: Constante de velocidad de absorción (k_a) y tiempos de vida media ($t_{1/2}$) se obtienen mediante el método de los residuos (al graficar la concentración de xenobiótico no absorbido en función del tiempo).



6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1. Curvas de calibración de estándares

Los tiempos de retención obtenidos así como las curvas de calibración así como su ecuación de cada uno de los estándares se muestran en la tabla 8 y en las figuras 4 y 6 a 9.



Compuesto	Tiempo de Retención (min)
Fenol	1.30 ± 0.02
4- clorofenol	1.96 ± 0.02
2,4-diclorofenol	2.07 ± 0.02
2,4,6-triclorofenol	2.20 ± 0.02

Figura 4. Tiempo de retención del fenol (café), 4-clorofenol (verde), 2,4-diclorofenol (negro) y 2,4,6-triclorofenol (azul). HPLC marca VARIAN modelo 310, detector UV, $\lambda = 240$ nm, Fase móvil Acetonitrilo: Metanol (80:20), Flujo 1.00 mL/min. Columna Varian Persut C18 150 x 4.6 mm



Los compuestos estudiados presentan diferentes tiempos de retención debido a su polaridad, lo cual les confiere diferente afinidad a la fase móvil y estacionaria del equipo, ya que entre menos polar sea el compuesto su tiempo de retención será mayor debido a que tiene una mayor afinidad por la fase estacionaria (columna PC. 18) que por la fase móvil (acetronitrilo-metanol 80:20) que presenta mayor polaridad que la columna. Ordenando los compuestos de mayor a menor polaridad se obtiene lo siguiente (figura 4)

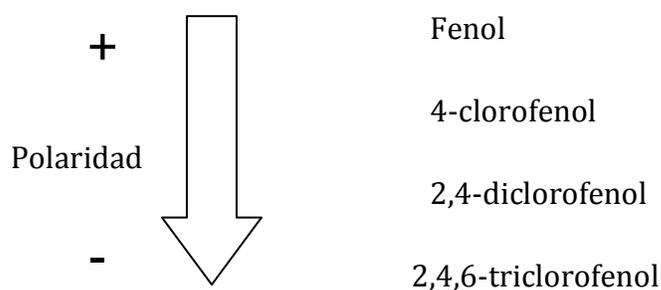


Figura 5. Polaridad de los compuestos de estudio

Tomando al fenol como el compuesto base, es el compuesto con mayor polaridad, y el triclorofenol es el compuesto menos polar, esto se debe al número de sustituyentes cloro presentes en la molécula del fenol, ya que al sustituir un hidrogeno de la molécula del fenol por un átomo de cloro disminuye la polaridad de la molécula, y al ir aumentando el número de átomos de cloro en la molécula la polaridad se ve disminuida, por lo que aumenta la afinidad por la columna (Swadesh,2010).

Debido a que se utilizo una columna en fase reversa (fase apolar), el tiempo de retención de las moléculas menos polares es mayor que el de las moléculas polares, debido a las interacciones hidrofóbicas que resultan por las fuerzas de repulsión entre la fase móvil (acetronitrilo:metanol 80:20), el compuestos (fenol, 4-clorofenol, 2,4-diclorofenol y 2,4,6-triclorofenol) y la columna (Swadesh,2010). Lo anterior con base en los coeficientes de reparto octanol/agua (a mayor valor menor polaridad del compuesto) de cada uno de los clorofenoles, fenol (1.46), clorofenol (2.39), diclorofenol (3.06) y triclorofeno (3.87) (A.T.S.D.R., 2011).



Tabla 8. Ecuaciones del comportamiento lineal de cada uno de los clorofenoles en estudio.

Compuesto	Ecuación de la recta	Coefficiente de correlación lineal (R ²)
Fenol	Área= 1 8130 X (mg F/mL) - 2.70	0.9935
4- clorofenol	Área = 1 1401 X(mg CF/mL) + 0.37	0.9983
2,4-diclorofenol	Área = 8 926.2 X(mg DCF/mL) + 21.08	0.9995
2,4,6-triclorofenol	Área = 6 724.4X(mg TCF/ mL) - 2.87	0.9998

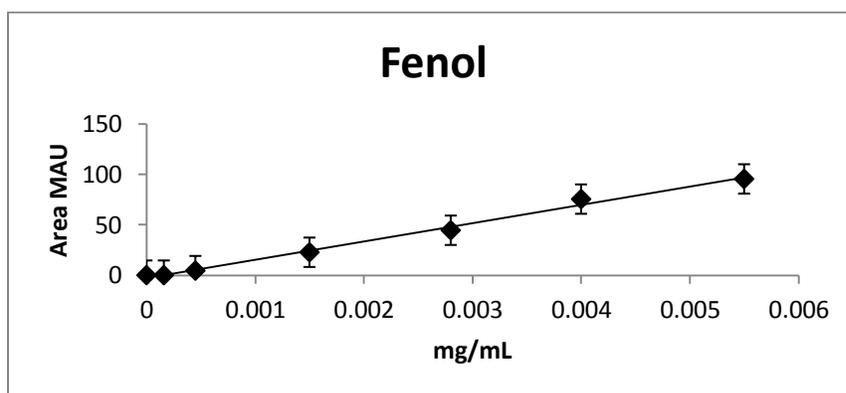


Figura 6. Curva patrón de fenol.

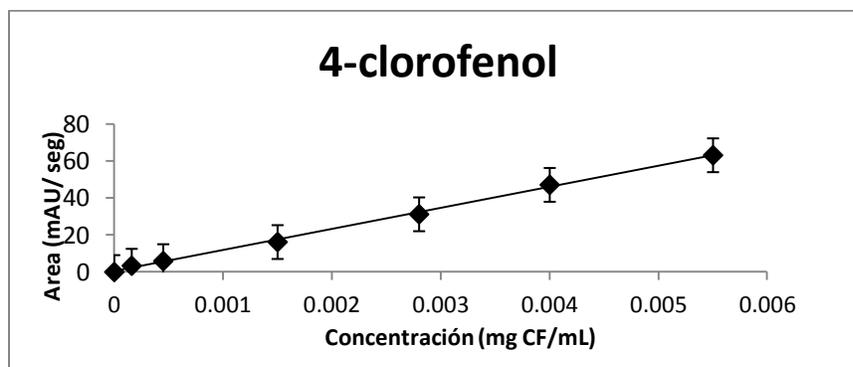


Figura 7. Curva patrón 4- clorofenol

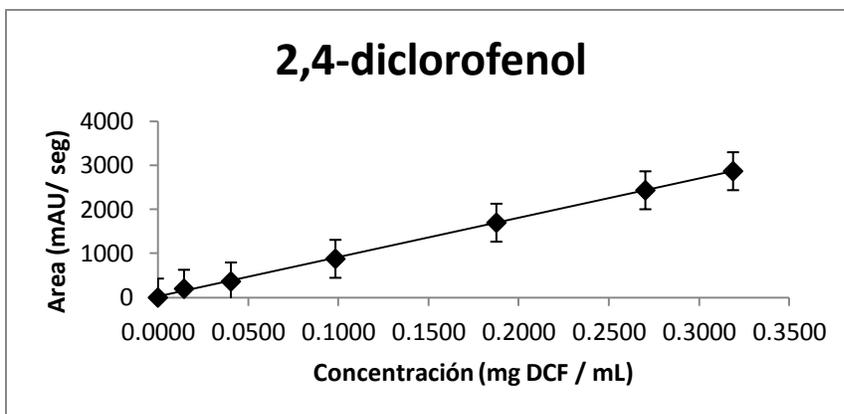


Figura 8. Curva patrón 2,4- diclorofenol

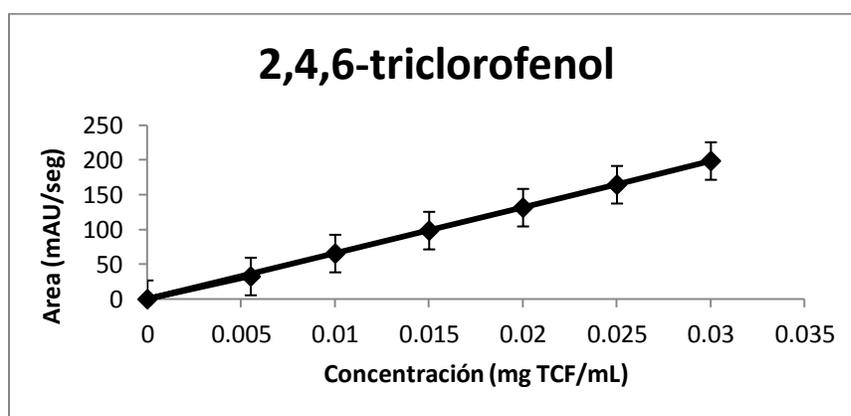


Figura 9. Curva patrón de 2,4,6-triclorofenol

Los compuestos muestran diferente área a la misma concentración debido a su estructura molecular, sin que este comportamiento se pueda predecir ya que el área del 4-clorofenol es mayor que la del 2,4-diclorofenol pero menor a la del 2,4,6-triclorofenol, por lo que se puede decir que el área correspondiente a la misma concentración de los diferentes compuestos no es proporcional al número de sustituyentes cloro en la molécula.



6.2. Validación del procedimiento

6.2.1. Porcentajes de recuperación de estándares

Al someter cada uno de los estándares al procedimiento de extracción por Soxhlet se obtiene lo siguiente (tabla 9).

Tabla 9. Porcentajes de recuperación de estándares de clorofenoles

Compuesto	Porcentaje de recuperación
Fenol	93.4 ± 0.10
4-clorofenol	58.4 ± 0.22
2,4-diclorofenol	67.3 ± 0.08
2,4,6-riclorofenol	72.0 ± 0.41

Es posible que los rendimientos sean menores al 80% por la adsorción de los compuestos de estudio en el sulfato de sodio anhidro (Sato *et al.*, 2005), en el caso del fenol el porcentaje de recuperación es mayor (93.4 %) probablemente porque no se utilizó sulfato de sodio anhidro ya que se realizó el estudio con la muestra seca.

Los porcentajes de recuperación de cada uno de los compuestos de estudio se ven influenciadas principalmente por la adsorción en el sulfato de sodio anhidro y, la manipulación de las muestras durante el procedimiento (Collins *et al.*, 2005). Considerando lo anterior se puede determinar la concentración real de los compuestos de estudio en la grasa de la muestra y evitar en lo posible sobreestimar o subestimar la concentración.



6.2.2. Reproducibilidad del método

Se determinaron para cada uno de los estándares los límites de cuantificación y se presentan en la tabla 10.

Tabla 10. Límites de cuantificación de cada uno de los clorofenoles y fenol. Cada determinación se realiza por triplicado.

Compuesto	Límites de cuantificación (mg/ mL)
Fenol	$4.5 \times 10^{-4} \pm 1 \times 10^{-6}$
4-clorofenol	$1.6 \times 10^{-4} \pm 1 \times 10^{-6}$
2,4-diclorofenol	$0.8 \times 10^{-4} \pm 1 \times 10^{-6}$
2,4,6-triclorofenol	$0.8 \times 10^{-4} \pm 1 \times 10^{-6}$

HPLC marca VARIAN modelo 310, detector UV, $\lambda = 240$ nm, Fase móvil Acetonitrilo: Metanol (80:20), Flujo 1.00 mL/min. Columna Varian Persut C18 150 x 4.6 mm

La reproducibilidad de cada uno de los estándares se realiza inyectado al menos cinco veces una concentración conocida. Los resultados obtenidos se analizan en el programa *Galaxie (Versión 1.9.302.952)* en la opción *Report Summary* para obtener el promedio de las áreas, desviación estándar y el coeficiente de variación (tabla 11).

Tabla 11. Reproducibilidad de estándares de clorofenoles y fenol.

Compuesto	Coefficiente de variación (%)
Fenol	8.23
4-clorofenol	6.44
2,4-diclorofenol	7.69
2,4,6-triclorofenol	8.73



Los coeficientes de variación de las áreas de cada uno de los compuestos presentan valores menores al 10%, lo que hace a la metodología empleada estadísticamente confiable (Wayne, 1977).

Con lo anteriormente expuesto la técnica utilizada para la extracción y cuantificación de clorofenoles en hígado de res, es confiable de acuerdo a los límites establecidos.

El método Soxhlet (extracción con éter de petróleo durante 4 h para muestra seca, y durante 8 h para muestra húmeda) para la extracción de la grasa y la correspondiente cuantificación de clorofenoles mediante cromatografía de líquidos o HPLC (por sus siglas en inglés (High Pressure Liquid Chromatography) son métodos alternativos para la cuantificación de estos compuestos en hígado de res. Dado que en la NOM-004-ZOO-1994, solo se menciona el análisis de grasa obtenida por sistema líquido-líquido para la identificación de plaguicidas organoclorados y bifenilos policlorados; así mismo, su cuantificación se realiza por cromatografía de gases.

El uso de la cromatografía de gases es la técnica más común para la cuantificación de compuestos tóxicos en alimentos de origen animal. Sin embargo, el método de extracción de la grasa es variable, un ejemplo de ello es el uso de la técnica de cuantificación realizado por Khalid y Alaa (2008) para la determinación de residuos de pesticidas organoclorados en carne de camello proveniente de Egipto. El proceso de extracción de grasa fue mediante molienda de la muestra con éter de petróleo y sulfato de sodio anhidro, en tres pasos cambiando el disolvente (150, 100 y 100 mL) cada 2 minutos.

Otro caso es el descrito por Darko y Acquah (2007) en la determinación de pesticidas organoclorados en carne, donde la cuantificación es mediante cromatografía de gases, pero la extracción de la grasa es con hexano (20 mL) y acetonitrilo (100 mL), después de homogeneizar la muestra.

En el caso de la determinación de endosulfan en carne de búfalo (Kumar *et al.*, 2009), la extracción de la grasa se lleva a cabo en pasos: 1) Homogeneizar con acetonitrilo



(30mL, 1000 rpm por 10 min), 2) Sonicado (amplitud de 15 micrones por 30 ciclos por 5 segundos), 3) Centrifugado (10 000 rpm, 4°C) y 4) Filtración.

En términos generales, para la extracción de la grasa se han empleado técnicas como ultrasonido después de liofilizar la muestra, en estos casos se modifica el volumen de n-hexano (25 mL, 15 mL, 10 mL) y el tiempo de extracción, posteriormente se mezclan (3 extracciones) y se centrifugan (2500 rpm por 10 min) para llevar a cabo la cuantificación mediante HPLC (Lorenzo *et al.*, 2010).

6.3. Porcentajes de absorción

La muestra en la cual se desarrolla el estudio corresponde a hígado de res que presenta una humedad de 70.97% y un contenido de grasa de 65.5% (B.S) y 19.0 % (B.H) al cual se le inyectaron los diferentes clorofenoles presentando los siguientes resultados (Ver tabla de datos en Apéndice I y cromatogramas en Apéndice II):

a) Fenol

Los valores correspondientes al área de pico y tiempo de retención (TR) se emplean para conocer la concentración de fenol que se absorbió en el hígado de res. De acuerdo a las siguientes ecuaciones (1 a 7).

$$\text{área} = 18\,130 \times \text{concentración (mg fenol/mL)} - 2.70$$

Ecuación 1

- Para obtener los mg fenol/mL:

$$\text{mg fenol/mL} = \frac{\text{área} + 2.70}{1\,8130}$$

Ecuación 2

- El valor de mg fenol/mL se convirtió en mg fenol/g de muestra B.S al someter al valor de mg fenol/mL a la siguiente ecuación (3)



$$\text{mg fenol/g carne BS} = \frac{\text{mg fenol}}{\text{mL}} \times \frac{\text{volumen 3}}{10 \text{ mL}} \times \frac{30 \text{ mL}}{\text{g de muestra}}$$

Ecuación 3

Donde:

- Volumen 3: corresponde al volumen que se obtiene al concentrar la grasa después de agregar el ácido sulfúrico concentrado y que se filtra a través de una capa de sulfato de sodio anhidro.
- El valor de mg fenol/mL corresponde a la cantidad de fenol presente en la grasa de la muestra, sin embargo, se debe considerar el porcentaje de recuperación del fenol (93.4 ±0.10 %), para lo cual se tiene lo siguiente (ecuación 4):

$$\text{concentración real de fenol} = \frac{\text{mg fenol/g muestra BH}}{93.4 \%} \times 100\%$$

Ecuación 4

- Para calcular el % de absorción del compuesto en la muestra de hígado se aplico la ecuación 5:

$$\text{absorción}(\%) = \frac{\text{concentración real recuperada de fenol} - \text{concentración inicial fenol}}{\text{concentración inicial de fenol}} \times 100\%$$

Ecuación 5

Donde:

La concentración inicial del fenol, es la concentración a la cual se encuentra la disolución de fenol con la cual se contamina la muestra (hígado de res seco) y se calcula de acuerdo a lo siguiente (ecuación 6):

$$\text{concentración inicial de fenol} = \frac{\text{mg de fenol}}{\text{g de muestra de hígado de res}}$$

Ecuación 6



- Los mg de fenol se calculan al aplicar la ecuación 7:

$$\text{mg de fenol} = \text{concentración de la disolución de fenol} \times 6 \text{ mL}$$

Ecuación 7

Se aplica el procedimiento antes descrito para cada uno de los 6 tiempos de exposición de la muestra con la disolución del fenol (0 a 16 horas), obteniéndose los niveles de absorción de cada uno dando como resultado la figura 10.

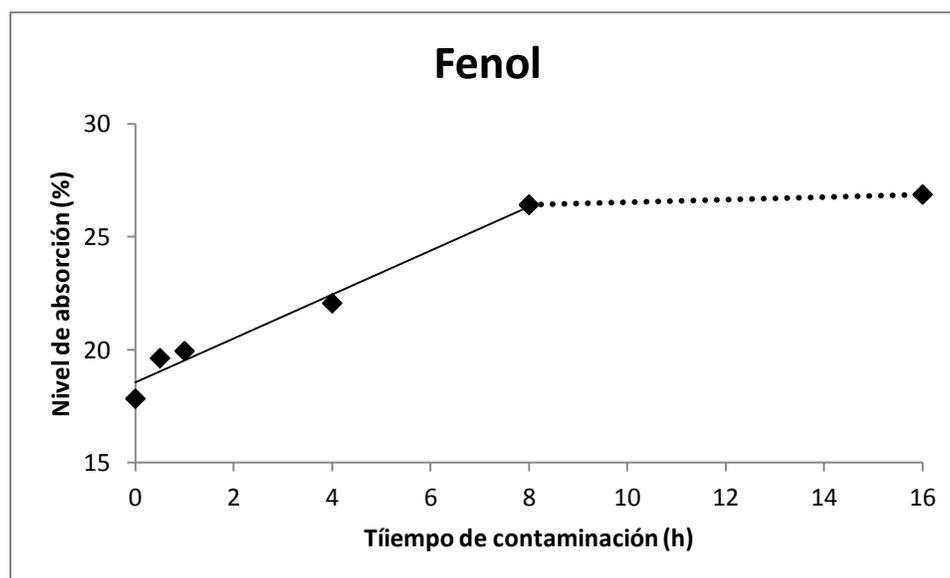


Figura 10. Nivel de absorción del fenol en hígado de res, en un periodo de 0 a 16 horas.

Se observa en la figura 10 que el máximo de absorción se obtiene con un tiempo de exposición de 8 horas y un porcentaje de absorción del 26.42 ± 1.01 . Además, la absorción del fenol en el hígado de res se lleva a cabo en dos etapas: la primera de “absorción” cuando el fenol pasa al tejido celular del hígado de res, la cual presenta un comportamiento lineal creciente hasta llegar al máximo nivel de absorción (línea continua), y la segunda de “saturación” en la cual el tejido celular de la muestra ha alcanzado el máximo nivel de saturación por lo cual el nivel de absorción aun al aumentar el tiempo de contaminación permanece constante (línea punteada).



Para poder correlacionar la absorción de los compuestos en la muestra se selecciona la parte de la grafica que presenta un comportamiento lineal lo cual corresponde a los valores de 0, 0.5, 1, 4 y 8 horas (figura 11) y se representa en la ecuación 8.

$$\text{Nivel de absorción(\%)} = 0.97 t(\text{h}) + 18.56$$

Ecuación 8

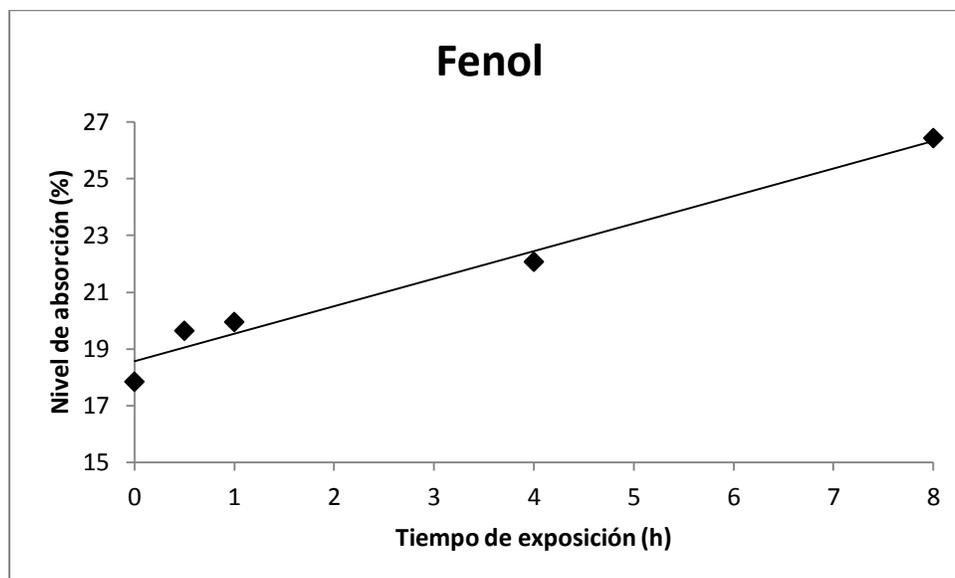


Figura 11. Absorción de fenol en hígado de res.

En las figuras 10 y 11 se observa que en la primera hora no se lleva a cabo un aumento significativo en la absorción del fenol, ya que los valores de absorción van de 17.84 % a 19.95 %. Sin embargo, el nivel de absorción aumenta significativamente después de éste tiempo y se mantiene ascendente hasta alcanzar las 8 horas de exposición en el cual se llega al nivel máximo de absorción.

Debido a que el fenol presenta mayor afinidad por la parte acuosa del sistema se realizó el estudio en la muestra seca para evitar que el fenol quede “atrapado” en el sulfato de sodio que se utiliza para secar la muestra, ya que este compuesto “adsorbe” al agua y al fenol (Sato *et al.*, 2005).

Dadas las características que presenta el fenol, la probabilidad de bioacumulación en sistemas biológicos acuosos es baja; y por consiguiente, el fenol sería desechado como



metabolito secundario por la orina y en pocos casos se podría albergar en los depósitos de grasa (A.T.S.D.R, 2011).

Por lo anterior, se calcula el nivel de riesgo del fenol hacia el humano en las condiciones realizadas en el experimento, para lo cual se considera lo siguiente:

La DL_{50} para el fenol (rata oral)= 414 mg/kg de peso corporal (Huerta, 2011), se determina en el estudio un nivel de absorción de 26.43 % que corresponde a 1.57×10^{-3} mg de fenol/gramo de hígado de res (B.S). Además, el peso de la muestra (hígado de res seco) utilizada fue de ≈ 5 g (70.97 % humedad), que representa 17.06 g de muestra (B.H). Con lo anteriormente expuesto se tiene 1.79×10^{-2} mg de fenol/gramo de hígado de res (B.H). Para poder calcular la DL_{50} en el humano se considera lo siguiente: La talla promedio de un mexicano sano es de 163 cm de altura, 68.6 kg de peso y un hígado con peso promedio de 2.0 kg en base húmeda (B.H) y con el mismo contenido promedio de humedad que la muestra analizada (Ecuación 9).

$$\frac{\text{mg de fenol}}{\text{kg de peso corporal}} = \frac{\text{mg de fenol absorbido (en 2.0 kg hígado)}}{\text{kg peso corporal}}$$

Ecuación 9

Sustituyendo los valores:

$$\frac{\text{mg de fenol}}{\text{kg de peso corporal}} = \frac{35.83 \text{ mg}}{68.6 \text{ kg}} = 0.52 \text{ mg/kg}$$

Por lo cual este compuesto con un máximo porcentaje de absorción de 26.43% de una disolución de 0.005 mg fenol/mL (acetonitrilo: metanol 80:20) en un periodo de exposición de 8 horas en muestras con bajo contenido de humedad no representa un peligro para la salud, siempre y cuando no se presente una intoxicación crónica (Serra *et al.*, 2006).



b) 4-clorofenol

Se aplica el tratamiento anteriormente expuesto pero considerando la ecuación 10:

$$\text{área} = 1\,1401 \times (\text{mg 4 - clorofenol/mL}) + 0.3731$$

Ecuación 10

Además, se considera un porcentaje de recuperación de 58.4% obteniéndose lo siguiente (ecuación 11):

$$\text{concentración real de clorofenol} = \frac{\text{mg clorofenol/g muestra B. H}}{58.4 \%} \times 100\%$$

Ecuación 11

En el caso del 4-clorofenol se utiliza muestra húmeda por la poca afinidad que presenta este compuesto por el agua.

En la primera etapa, se realiza un ensayo durante un período de 0 a 16 horas en el cual se observó que después de la primera hora se alcanza la saturación del tejido con el 4-clorofenol. Por lo tanto, es necesario llevar a cabo un segundo ensayo de 0 a 2 horas debido a que en este período se presenta claramente (figura 12) la etapa de absorción (línea continua) y saturación (línea punteada).

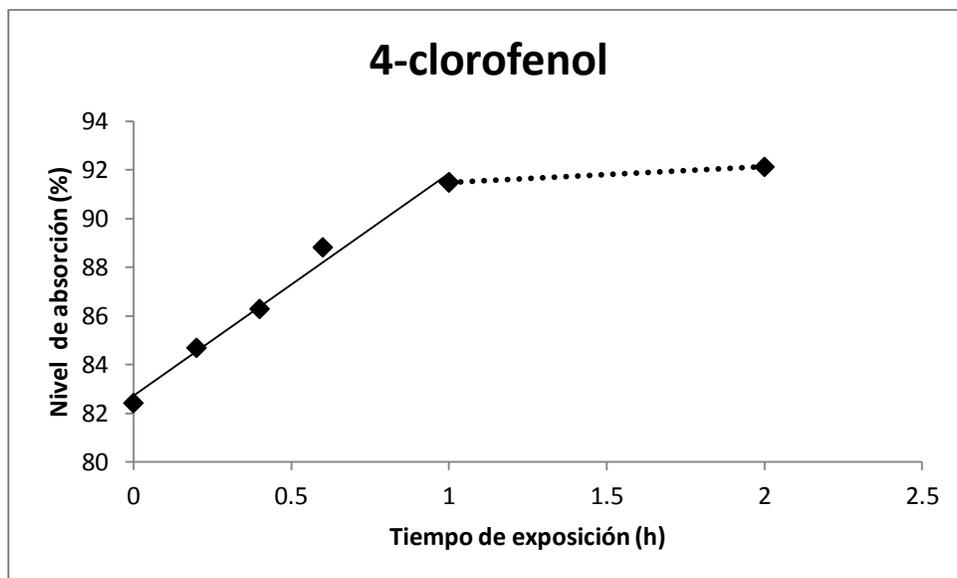


Figura 12. Nivel de absorción del 4-clorofenol en hígado de res en un periodo de 0 a 2 horas

En la figura 12, se puede observar que si la muestra se expone a un ambiente saturado con 4-clorofenol, más del 90% de este se absorbe en la grasa de la muestra en la primera hora. Y después de este tiempo la concentración del 4-clorofenol en la muestra se mantiene constante.

Al estar expuesta la muestra al 4-clorofenol, éste migra de la solución de acetonitrilo: metanol (80:20), hacía la parte no polar (la grasa de la muestra), y posteriormente migra al tejido del hígado. Lo anterior se puede corroborar ya que en investigaciones previas (Serra, 2002), se ha observado que los clorofenoles se unen a las proteínas mitocondriales de las células y considerando que el 4-clorofenol es el compuesto más polar de los tres clorofenoles (Real *et al.*, 2008), se podría explicar su afinidad por la muestra lo cual se observa en la figura 12, donde la mayor parte del 4-clorofenol migra del tejido y se queda en la grasa (Serra, 2002).

Para establecer la correlación en la absorción del 4-clorofenol y la muestra se consideran los valores obtenidos durante el período 0 a 1 hora (figura 13), representada por la ecuación 12.



$$\text{Nivel de absorción (\%)} = 9.13 t(\text{h}) + 82.73$$

Ecuación 12

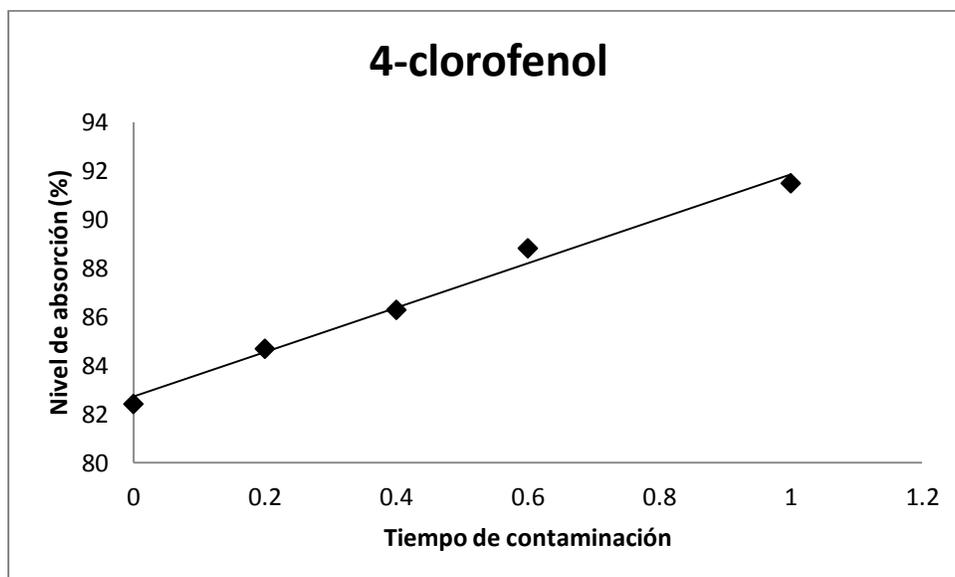


Figura 13. Nivel de absorción del 4-clorofenol en hígado de res en un periodo de 0 a 1 h.

La figura 13 presenta la correlación en la absorción del 4-clorofenol y la muestra observándose que la mayor absorción en la muestra se lleva a cabo en la primera hora, lo que implica el alto riesgo a la salud de este compuesto, debido a su elevado nivel de absorción (Mendoza, 2008).

Como en el caso anterior, es necesario determinar si se sobre pasa la DL_{50} en las condiciones en las que se trabajo. Para lo cual se considera lo siguiente: 1) La DL_{50} para el 4-clorofenol (rata oral) es de 670 mg/ kg de peso corporal (Huerta, 2011), 2) El nivel máximo de absorción es de 91.50% lo cual corresponde a $2.05e^{-3}$ mg de clorofenol absorbido/gramo de hígado de res (B.H) y, 3) La talla promedio de un mexicano sano es de 163 cm de altura, 68.6 kg de peso, y un hígado con peso promedio de 2.0 kg en base húmeda (B.H) y con el mismo contenido promedio de humedad que la muestra analizada (ecuación 13).



$$\frac{\text{mg de 4 - clorofenol}}{\text{kg. p. c}} = \frac{\text{mg de 4 - clorofenol absorbio (en 2.0 kg de higado)}}{\text{kg peso corporal}}$$

Ecuación 13

Sustituyendo los valores:

$$\frac{\text{mg de 4 - clorofenol}}{\text{kg de peso corporal}} = \frac{4.09 \text{ mg}}{68.6 \text{ kg}} = 0.06 \text{ mg/kg.p. c}$$

El 4-clorofenol con un máximo porcentaje de absorción de 91.50% de una disolución de 0.005 mg L clorofenol/mL (acetonitrilo: metanol 80: 20) durante un tiempo de exposición de 1 hora en muestra húmeda presenta un valor menor a la DL₅₀, por lo cual, al igual que el fenol no representa un peligro para la salud, siempre y cuando no se presente una intoxicación crónica (Serra y Aranceto, 2006).

c) 2,4- diclorofenol

Para determinar el comportamiento de absorción del compuesto (2,4-diclorofenol) en la muestra (hígado de res húmedo) se lleva a cabo el mismo tratamiento que en los casos anteriores, obteniéndose la ecuación 14:

$$\text{área} = 8\,926.24 \times (\text{mg 2,4 - diclorofenol/mL}) + 21.08$$

Ecuación 14

Además, considerando un 67.3% de recuperación del diclorofenol queda lo siguiente (ecuación 15):

$$\text{concentración real de 2,4 - diclorofenol} = \frac{\text{mg 2,4 - diclorofenol/g muestra BH}}{67.3 \%} \times 100\%$$

Ecuación 15

En la primera etapa, se realiza un ensayo durante un período de 0 a 16 horas en el cual se observó que después de 1.5 horas se alcanza la saturación del tejido con el 2,4-diclorofenol, y al reducir el tiempo de contaminación de 0 a 2 horas se obtiene la figura 14 que muestra el comportamiento de absorción del 2,4-diclorofenol en la



muestra (hígado de res). Observándose la etapa de absorción (línea continua) y de saturación (línea punteada) del tejido con el 2,4-diclorofenol.

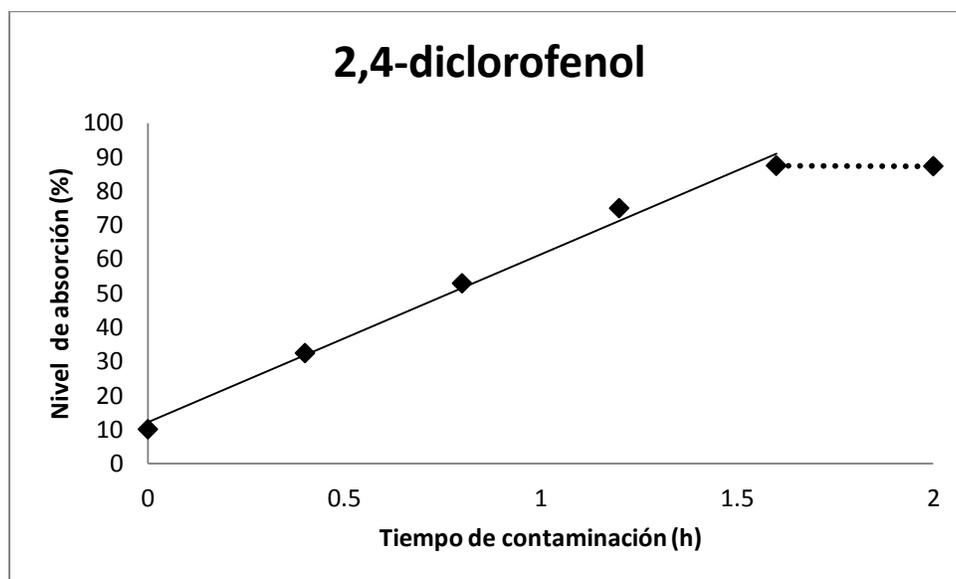


Figura 14. Nivel de absorción del 2,4-diclorofenol en hígado de res en un periodo de exposición de 0 a 2 horas.

Comparando la velocidad de absorción del 2,4-diclorofenol con el 4-clorofenol se observa en los primeros 30 minutos que éste último se absorbe en mayor grado que el 2,4-diclorofenol, ya que el primero presenta un 10.07% y el segundo un 82.42% de absorción respectivamente, es probable que este comportamiento se deba al peso molecular de la molécula en cuestión y a los coeficiente de reparto octanol/agua. Así se tiene que el 2,4-diclorofenol (PM = 163.0 g/mol) es de mayor tamaño que el 4-clorofenol (PM = 128.9 g/mol), y los coeficientes de reparto octanol /agua son de 2.39 para el 4-clorofenol y de 3.06 para el diclorofenol (González, 2010).

La parte de absorción presenta un comportamiento lineal que corresponde a la ecuación 16 y la figura 15.

$$\text{Nivel de absorción} = 49.33 t(h) + 12.10$$

Ecuación 16

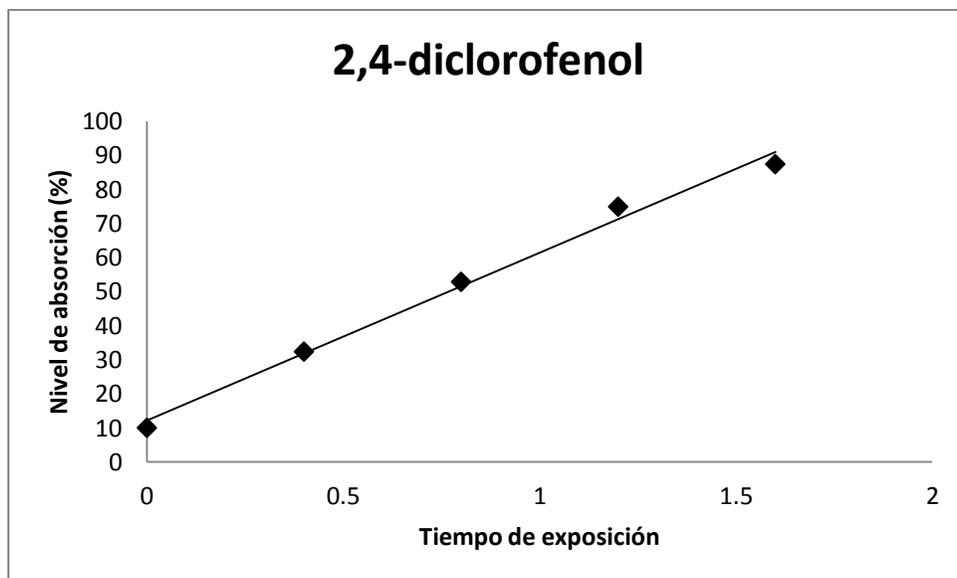


Figura 15. Nivel de absorción del 2,4-diclorofenol en hígado de res en un periodo de 0 a 1.6 horas.

En la figura 15 se observan incrementos constantes del 20% durante las primeras 1.2 horas y, en la última etapa (1.2 a 1.6 horas) solo se observa un incremento del 12%; lo cual se debe principalmente a la saturación del sistema (hígado de res) ocasionado por la migración del 2,4-diclorofenol.

Como en el caso anterior, es necesario determinar si se sobrepasa la DL_{50} de este compuesto. Para lo cual se considera lo siguiente,: 1) La DL_{50} para el 2,4-diclorofenol (rata oral)= 580 mg/ kg de peso corporal (Huerta, 2011), 2) El nivel máximo de absorción es de 87.46 % lo que corresponde a $3.00e^{-3}$ mg de diclorofenol/g de hígado de res (B.H) y, 3) La talla promedio de un mexicano sano es de 163 cm de altura, 68.6 kg de peso, y un hígado con peso promedio de 2 kg en base húmeda (B.H) y con el mismo contenido promedio de humedad que la muestra analizada (ecuación 17).

$$\frac{\text{mg de 2,4 – diclorofenol}}{\text{kg de peso corporal}} = \frac{\text{mg de 2,4 – diclorofenol absorbido (en 2.0 kg hígado)}}{\text{kg peso corporal}}$$

Ecuación 17



Sustituyendo los valores:

$$\frac{\text{mg de 2,4 – diclorofenol}}{\text{kg de peso corporal}} = \frac{11.89 \text{ mg}}{68.6 \text{ kg}} = 0.17 \text{ mg/kg. p. c}$$

Por lo cual este compuesto con un nivel máximo de absorción de 87.46% de una disolución de 0.005 mg L diclorofenol/mL (acetonitrilo: metanol 80: 20) en un periodo de exposición de 1.6 horas en hígado de res, el valor que se absorbe está por debajo del valor del DL₅₀, por lo cual al igual que con el fenol y el 4-clorofenol no representa un riesgo para la salud, siempre y cuando no se presente una intoxicación crónica. Sin embargo, existe el riesgo potencial debido al proceso de biocumulación (Serra y Araceto, 2006).

En resumen, se observa que el 2,4-diclorofenol presenta un máximo de absorción (87.46%) en 1.6 horas, el cual es menor al que presenta el 4-clorofenol (91.50%), pero mayor al que presenta el fenol (26.42%). Así mismo, se observa el mismo orden en el tiempo para obtener el nivel de máxima absorción. Lo cual se debe a las características del compuesto como son: tamaño de molécula y su afinidad a compuestos no polares (Repetto y Reppetto, 2009). En estudios previos se ha observado que el 4-clorofenol forma un mayor número de uniones con las proteínas mitocondriales de las células (Real *et al.*, 2008) que después se rompen y son eliminados del organismo ya metabolizados a través de la orina, comparado con el 2,4-diclorofenol (Serra, 2002).

d) 2,4,6-triclorofenol

Para determinar el comportamiento de absorción del compuesto (2,4,6-triclorofenol) en la muestra (hígado de res húmedo) se lleva a cabo el mismo tratamiento que en los casos anteriores, obteniéndose la ecuación 18.

$$\text{área} = 6\,724.4 \times (\text{mg 2,4,6 – triclorofenol/mL}) - 2.87$$

Ecuación 18

Considerando el porcentaje de recuperación (72.0%), se tiene la ecuación 19:



$$\text{concentración real de 2,4,6 - triclofenol} = \frac{\text{mg 2,4,6 - triclofenol/g muestra BH}}{72.0 \%} \times 100\%$$

Ecuación 19

Al igual que en los otros dos clorofenoles en una primera etapa, se realiza un ensayo durante un período de 0 a 16 horas en el cual se observó que después de 1.5 horas se alcanza la saturación del tejido con el 2,4,6-triclofenol. Por lo cual en la segunda etapa se obtiene el nivel de absorción para cada uno de los diferentes tiempos de contaminación, en un periodo de 0 a 2 horas se obtiene la figura 16. Con los datos obtenidos se observa que el 2,4,6-triclofenol, también presenta las etapas de absorción (línea continua) y de saturación (línea punteada).

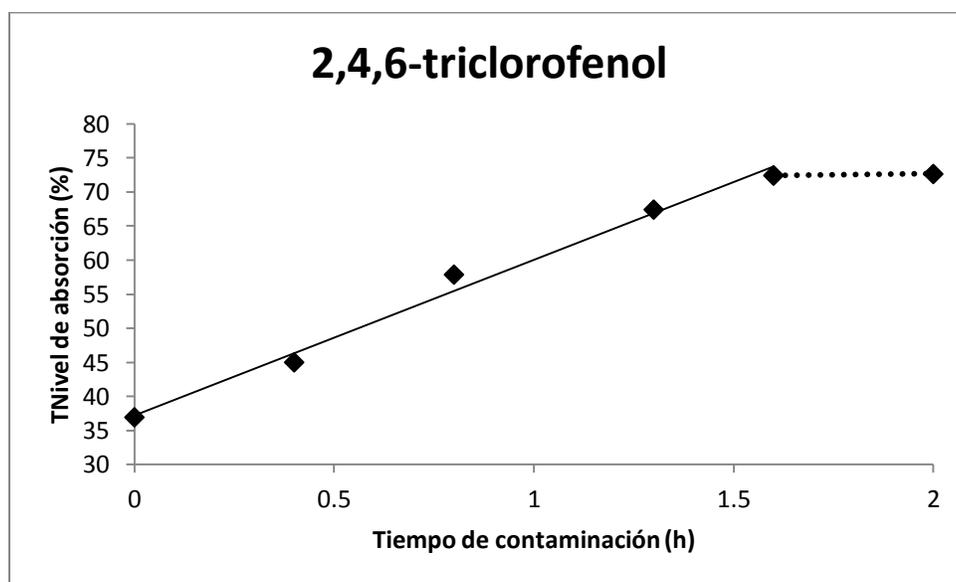


Figura 16. Nivel de absorción del 2,4,6-triclofenol en hígado de res en un periodo de 0 a 2 horas.

En la figura 16 se observa que en un tiempo menor a 30 minutos, el porcentaje de absorción es de 36.95%, lo cual es menor al observado en el 4-clorofenol (82.43 %) y mayor al 2,4-diclofenol (10.07%), lo cual, se puede atribuir a la mayor afinidad del 2,4,6-triclofenol por medios no polares; ya que migra más fácilmente hacia la grasa de la muestra comparado con el 2,4-diclofenol. Así como, a sus características



fisicoquímicas como son: peso molecular (2,4,6-triclorofenol = 197.5 g/mol, fenol = 94.1 g/mol) y coeficientes de reparto octanol/agua (fenol = 1.46, 4-clorofenol = 2.39, 2,4-diclorofenol = 3.06 y 2,4,6-triclorofenol = 3.87) (Wade,1993).

En la figura 16 se observa el máximo de absorción a las 1.6 horas de exposición. Por ello se selecciona este intervalo para establecer la correlación correspondiente obteniéndose la ecuación 20 y la figura 17:

$$\text{Nivel de absorción (\%)} = 35.18 t(\text{h}) + 37.11$$

Ecuación 20

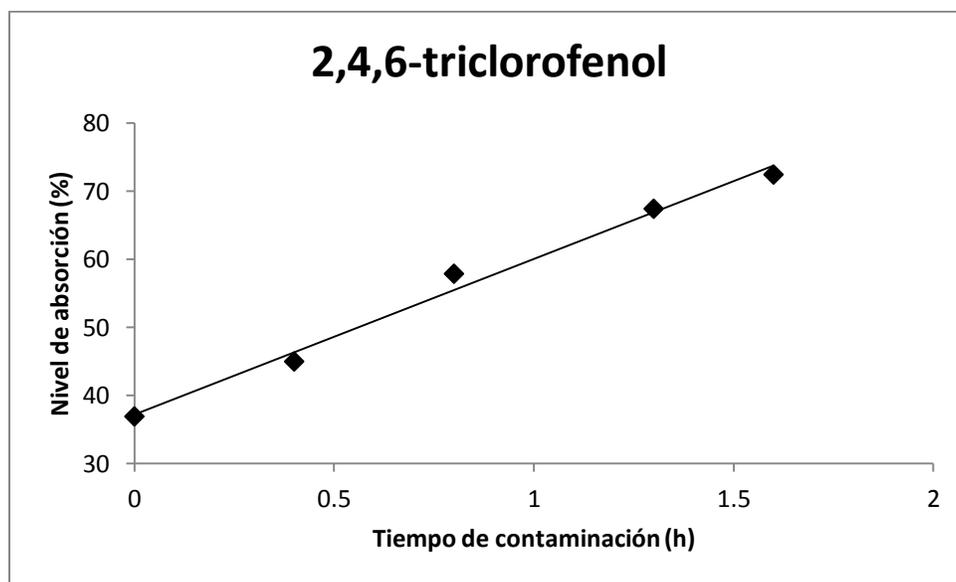


Figura 17. Nivel de absorción del 2,4,6-triclorofenol en hígado de res en un periodo de 0 a 1.6 horas

Como en el caso anterior, es necesario establecer si se sobrepasa el valor de la DL_{50} . Para lo cual se considera lo siguiente: 1) La DL_{50} para el 2,4,6-triclorofenol (rata oral)= 670 mg/ kg de peso corporal (Huerta, 2011), 2) El nivel máximo de absorción es de 72.45% lo cual corresponde a 7.14×10^{-3} mg de triclorofenol/g de hígado de res B.H y, 3) La talla promedio de un mexicano sano es de 163 cm de altura, 68.6 kg de peso, y un hígado con peso promedio de 2.0 kg en base húmeda (B.H) y con el mismo contenido promedio de humedad que la muestra analizada (Ecuación 21).



$$\frac{\text{mg de 2,4,6 – triclorofenol}}{\text{kg de peso corporal}} = \frac{\text{mg de 2,4,6 – triclorofenol absorbido (en 2.0 kg de hígado)}}{\text{kg peso corporal}}$$

Ecuación 21

Sustituyendo los valores:

$$\frac{\text{mg de 2,4,6 – triclorofenol}}{\text{kg de peso corporal}} = \frac{14.28 \text{ mg}}{68.6 \text{ kg}} = 0.21 \text{ mg/kg. p. c}$$

Por lo cual este compuesto con un máximo porcentaje de absorción de 72.45% de una disolución de 0.005 mg 2,4,6 – triclorofenol/mL (acetonitrilo: metanol 80:20) en un periodo de exposición de 2.4 horas con muestra húmeda el valor que se absorbe está por debajo del valor del DL₅₀, por lo cual no representa un peligro para la salud, siempre y cuando no se presente una intoxicación crónica ni proceso de biocumulación (Serra y Aranceto, 2006).

El comportamiento que presenta el 2,4,6-triclorofenol es similar al del 2,4-diclorofenol, sin embargo, los niveles de absorción en el tiempo cero no son semejantes, y en ambos casos el nivel de máxima absorción se alcanza a las 1.6 h, de exposición. Por lo tanto al aumentar el número de sustituyentes cloro (2 a 3) se afecta la velocidad de incorporación del clorofenol en la muestra, esto es, el fenol presenta un 17.84% de absorción, el 4-clorofenol un 82.43%, el 2,4-diclorofenol un 10.07 % y el triclorofenol un 36.95%, todos ellos en el tiempo cero. Además, al tener un solo átomo de cloro (clorofenol) en la molécula se aumenta la afinidad por el medio no polar en forma significativa lo cual se ve reflejado en el porcentaje de absorción (8 veces más), en comparación con la molécula sin sustituyentes (fenol) (Gemini, 2007). Sin embargo, al aumentar el número de sustituyentes cloro, el nivel de máxima absorción es mayor a la que presenta el fenol pero menor a la del 4-clorofenol debido probablemente al tamaño de la molécula.



6.4. Análisis estadístico de los niveles máximos de absorción del fenol, 4-clorofenol, 2,4-diclorofenol y 2,4,6-triclorofenol

Para determinar si el número de sustituyentes cloro en la molécula del fenol, afecta en el nivel máximo de absorción de estos compuestos en el hígado de res, se analizaron los resultados mediante un análisis estadístico ANOVA con un nivel de significancia ($\alpha = 0.05$) y planteando como hipótesis nula (H_0) que no hay diferencia significativa y como hipótesis alternativa (H_1) que si hay diferencia significativa, obteniéndose los siguientes resultados (tabla 12):

Tabla 12. Análisis de varianza de los niveles máximos de absorción de clorofenoles en hígado de res.

	<i>Suma de cuadrados (SC)</i>	<i>Grados de libertad (g.l)</i>	<i>Cuadrados medio (CM)</i>
Modelo	5343.35	3	1781.12
Error	2.23	4	0.56
Total	5341.13	7	

Considerando que los grados de libertad del denominador son 4 y del numerador son 3, se tiene que el valor de F de tablas con un nivel de significancia de 0.05 es menor (6.59), que el F calculado (3198.92) por lo cual se rechaza la hipótesis nula H_0 y se acepta la hipótesis alternativa H_1 , la cual considera que si existe diferencia significativa entre los valores del nivel máximo de absorción de los compuestos estudiados (Wayne, 1977).

Para conocer entre que compuestos existe diferencia significativa se aplicó el método estadístico de Diferencia Mínima Significativa (DMS):

Calculándose como primer paso la diferencia estándar (S_d) con la ecuación 22:



$$S_d = \sqrt{\frac{2CME}{r}}$$

Ecuación 22

Donde:

CME: Cuadrado medio del error (obtenido de la ANOVA)

r: Número de repeticiones

Sustituyendo los valores se tiene lo siguiente:

$$S_d = \sqrt{\frac{2(0.56)}{2}} = 0.75$$

Para determinar el DMS se utiliza la ecuación 23 (Wayne, 1977):

$$DMS = S_{\bar{d}} \times t$$

Ecuación 23

Donde t (4 grados de libertad y nivel de significancia del 5%) es de 2.1318, que al sustituirlo en la ecuación 23 se obtiene:

$$DMS = 0.75 \times 2.1318$$

$$DMS = 1.60$$

La diferencia entre los promedios del nivel máximo de absorción entre los compuestos no debe de superar el valor de 1.60, para declarar que no existe diferencia significativa (al nivel 5%), con lo cual se obtiene la tabla 13, en la cual se obtienen la diferencia entre los promedios y se declara si hay o no diferencia significativa entre los niveles máximos de absorción del fenol y de los clorofenoles (Wayne, 1977).



Tabla 13. Diferencia de promedios ($\alpha = 5\%$, Wayne,1977)

	<i>Diferencia de promedios</i>	<i>Existe diferencia significativa</i>
Fenol-Clorofenol	16.92	Si
Fenol-Diclorofenol	60.98	Si
Fenol-Triclorofenol	46.03	Si
Clorofenol-Diclorofenol	4.04	Si
Clorofenol-Triclorofenol	19.05	Si
Diclorofenol-Triclorofenol	15.01	Si

Con lo anterior se puede confirmar que existe diferencia significativa ($\alpha = 5\%$), entre todos los niveles máximos de absorción de los cuatro compuestos estudiados, con lo cual queda comprobado el efecto del número de sustituyentes cloro en la absorción de estos en el hígado de res (Wayne, 1977).

6.5. Obtención de los valores de la Constante de absorción (ka) y tiempo de vida media ($t_{1/2}$)

La absorción de los compuestos estudiados (fenol, 4-clorofenol, 2,4-diclorofenol, 2,4,6-triclorofeno) presentan un orden de absorción igual a uno, ya que al graficar el porcentaje de xenobiótico no absorbido en función del tiempo se presentan dos zonas, una de absorción (cuando la gráfica presenta un comportamiento decreciente) y una de saturación (cuando la pendiente de la gráfica es igual a cero), lo cual corresponde a un comportamiento de orden uno de absorción, ya que si fuera de orden cero no se presentaría la zona de saturación (Flórez, 2005) como se muestra en la figura 17.

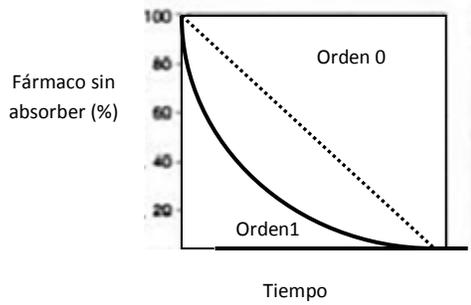


Figura 18. Cinética de absorción de orden 1 (línea continua) y de orden cero (línea discontinua) (Florez, 2005).

Ya que al graficar los valores de xenobiótico no absorbido se tienen las graficas de las figuras 19 a 22.

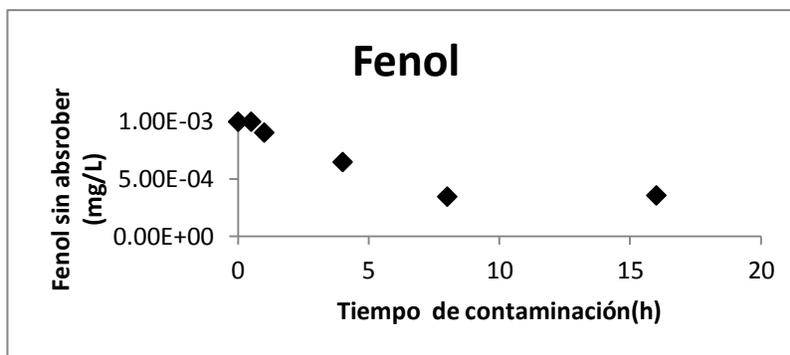


Figura 19. Concentración de fenol sin absorberse en el hígado de res en función del tiempo

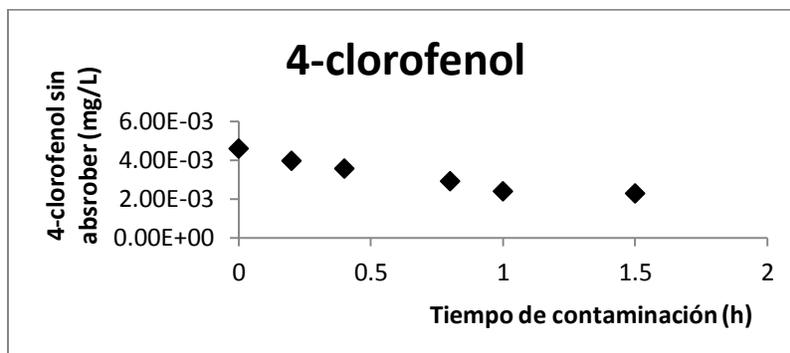


Figura 20. Concentración de 4-clorofenol sin absorberse en el hígado de res en función del tiempo

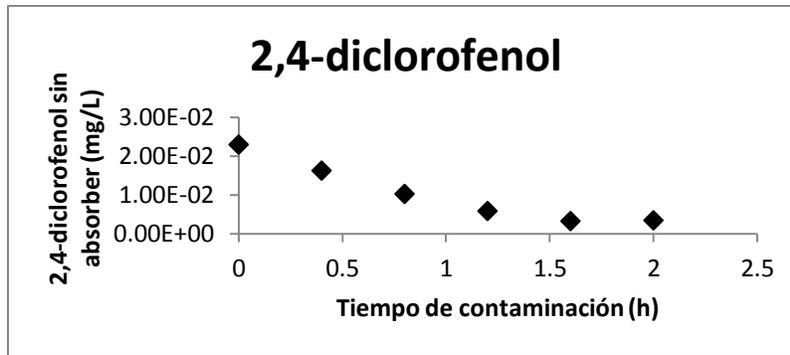


Figura 21. Concentración de 2,4-diclorofenol sin absorberse en el hígado de res en función del tiempo

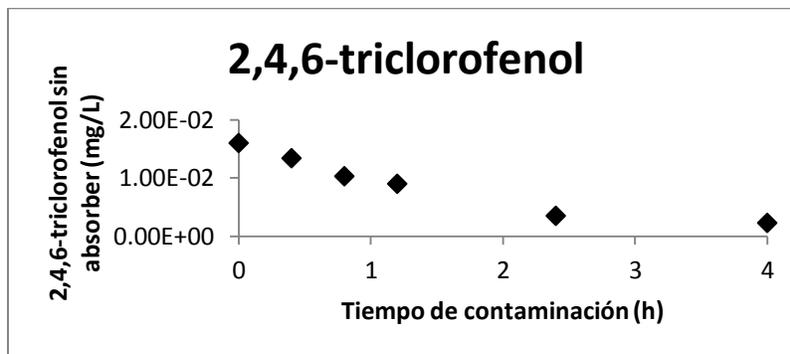


Figura 22. Concentración de 2,4,6-triclorofenol sin absorberse en el hígado de res en función del tiempo

Para determinar los valores de la constante de absorción (ka) y el tiempo de vida media se utilizó el método de los residuos: en el cual se grafica la cantidad de xenobiótico que no se absorbió en el hígado de res, en función del tiempo. Los valores que se grafican se obtienen de restar a la concentración de xenobiótico a la cual fue expuesta la muestra (C_i) la cantidad de xenobiótico que se absorbió en el organismo (C_a).

$$C_i - C_a = C_r$$

Ecuación 24



Donde: C_i = concentración inicial de xenobiótico, C_a = concentración absorbida de xenobiótico por el organismo y C_r = concentración de xenobiótico que no se absorbió (ecuación 24).

Para obtener la constante de absorción (k_a) se calcula el logaritmo de la cantidad de xenobiótico que no se absorbió (residuos) y se grafica en función del tiempo (figura 23). La pendiente (m) que se obtiene de la ecuación de la gráfica al ser multiplicada por -1 nos arroja el valor de la constante de absorción (k_a) (Floréz, 2005).

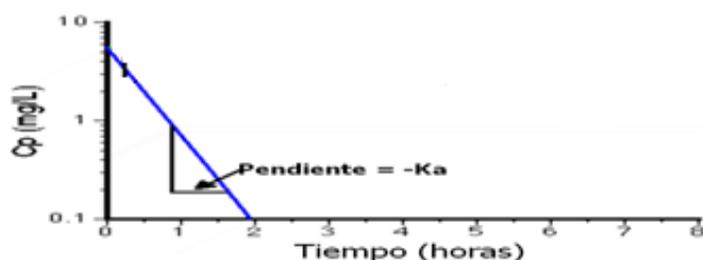


Figura 23. Representación gráfica de la constante de absorción (k_a), a partir del método de residuos, aplicando el logaritmo de la cantidad del xenobiótico sin absorber y graficando en función del tiempo.

El valor del tiempo de vida media se obtiene al aplicar la ecuación 25 (Floréz, 2005):

$$t_{1/2} = \frac{2.303}{k_a} \times \log 2$$

Ecuación 25

Esta ecuación se utiliza para los compuestos del estudio, ya que todos presentaron un orden de absorción igual a uno. El orden de absorción al que corresponde cada compuesto, el valor de k_a así como el valor de $t_{1/2}$, para cada compuesto se presentan en la tabla 14.



Tabla 14. Valores de constante de absorción (k_a) y tiempos de vida media ($t_{1/2}$) del fenol y de los clorofenoles.

Compuesto	Orden	k_a (h^{-1})	$t_{1/2}$ (h)
Fenol	1	0.06	11.87
4-clorofenol	1	0.27	2.59
2,4-diclorofenol	1	0.54	1.30
2,4,6-triclorofenol	1	0.28	2.51

Al ser los cuatro compuestos de orden uno, significa que la absorción del compuesto presenta dos comportamientos uno de absorción en la cual la cantidad del xenobiótico que se absorbe va aumentando hasta llegar a un nivel máximo, en un tiempo determinado (tiempo de máxima absorción) después del cual el nivel de absorción se mantiene constante.

Agrupando a los compuestos de estudio de acuerdo al valor de k_a descendente se tiene lo siguiente: 2,4-diclorofenol > 2,4,6-triclorofenol > 4-clorofenol > fenol. Si se analizan los valores de k_a se observa que el 2,4-diclorofenol se absorbe más rápido a pesar de que el porcentaje de absorción en el tiempo inicial (menos de un minuto) sea de $\approx 10\%$, comparado con el 4-clorofenol y el 2,4,6-triclorofenol ($\approx 37\%$); lo que indica que la velocidad de absorción no depende del porcentaje inicial que se absorbe ni del máximo de absorción.

Por lo anterior, se concluye que el compuesto que presenta mayor riesgo para un individuo que consume carne contaminada con alguno de los compuestos estudiados es el 2,4-diclorofenol debido a su velocidad de absorción, su nivel máximo de absorción (87.33 %) y su afinidad por la grasa de la muestra lo que conlleva a la biocumulación en el organismo.



7. CONCLUSIONES

- Las técnicas como Soxhlet y HPLC son eficiente para cuantificar los contaminantes (clorofenoles) presente en el hígado de res.
- El grado de cloración del anillo aromático incrementa la capacidad de absorción / recuperación de los clorofenoles en el hígado de res.
- Existe un cambio significativo en el máximo de absorción entre el fenol y los clorofenoles, y entre los compuestos clorados, por el aumento del número de sustituyentes cloro en la molécula es factor importante para la absorción de los compuestos.
- Al llevar a cabo la contaminación de la muestra existen dos fenómenos la absorción en el materia celular de la muestra y la bioacumulación de los compuestos en la grasa de la muestra, tales parámetros son dependientes de la afinidad del compuesto por los medios hidrófobicos, y del por el tamaño de la molécula.



8. RECOMENDACIONES

- Comparar los resultados obtenidos de los mono, di y tri clorofenoles con los clorofenoles con cuatro y cinco sustituyentes, para ver si existe comportamiento diferente o se mantiene.
- Realizar la metodología anterior utilizando diferentes concentraciones de clorofenoles para observar si se mantiene el comportamiento descrito.
- Estudiar el efecto de la posición de los sustituyentes cloro en la molécula del fenol en la absorción de estos en sistemas biológicos, y determinar si la posición en la que se encuentren los sustituyentes afecta la absorción de estos.
- Determinar el comportamiento de los clorofenoles en animales vivos para poder compararlo con el comportamiento en muestras de animales muertos (hígado de res), y determinar si la actividad metabólica modifica los valores de absorción, así como la desintoxicación de los organismos.



9. BIBLIOGRAFÍA

1. A.T.S.D.R Agency for Toxi Substances & Disease Registry E.U.A. 2011 www.atsdr.cdc.gov Ultima modificación el 9 de septiembre del 2011.
2. Bourges, R.H.G.N. "Los alimentos y la dieta" Nutriología Medica. 2000 México D.F, p.469
3. Calva, L.G.; Torres M. "Plaguicidas organoclorados" Departamento de Hidrobiología B.C.B.S UAM-I. 1998. Contactos 30, p. 35-46
4. Casabal, Z.A. "Sistemas de calidad en el ramo alimenticio. Obtención del distintivo H". Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Química. Dr. Ruiz Loyola Benjamin. Tesis para obtener el título de Ingeniero Químico. 2007 p.11-13
5. CAC/RCP 1-1969. Codex Alimentarius "Principios generales de higiene de los alimentos"
6. CAC/GL 33-1999. Codex Alimentarius "Métodos de muestreo recomendados para la determinación de residuos de plaguicidas a efecto del cumplimiento de los LMR"
7. CICOPLAFEST.México. Comisión Intersecretarial para el control del proceso y uso de plaguicidas, fertilizantes y sustnacias toxicas. "Catalogo de plaguicidas",2004
8. Collins, J.J.; Budinsky, A.J.; Burns, J.C.; Lamparski, L.L.; Carson, A.L.M.; Wilken M. "Serum dioxin levels in former chorophenol workers" Journal of Exposure Analysis and Environmental Epidemiology 2005 1053-4245/05 p.1-9
9. Darko, G.; Acquaaah, O.S. "Leves of roganochloride pesticides residues in meat" Int J. Envirom Sci. tech,2007 4(4) autumn p. 521-524
10. FAO. "Perfiles Nutricionales por países. México" Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación 2003 p.20.24
11. FAO "Codex Alimentarius, Requisitos Generales (Higiene de los alimentos)" Segunda edición. Suplemento al Volumen 1B, Programa Conjunto FAO/OMS sobre Normas alimentarias. Comisión del Codex Alimentarius. Publicado por la Secretaria del Programa Conjunto FAO/OMS sobre Normas alimentarias, FAO, Roma Italia. 1998 p. 5,7,22-25, 30-32
12. Flórez, J. "Farmacología Humana" 4^{ta}Edición MASSON S.A. Barcelona España 2005 p.61-62.



13. Forsythe, S.J.; Hayes.P.R. "Food hygiene Microbiology and HACCP" 3^{ra} Edition. Aspen Publishers. Praintes in the United States of America. 2010 pp.23-34
14. García, B. P. A. "Fundamentos de Nutrición" Universidad Estatal a Distancia San José Costa Rica 1994, p. 91
15. Gemini, V.; Gallego, A.; Fortunato, M.S.; Rossi, S.; Gómez, C.E.; Planes, E.; Karol, S.E. "Biodregadación y Detoxificaión de Compuestos Orgánicos Persistentes" Instituto Nacional de tecnología Industrial. Medio Ambiente Investigación aplicada. 6^{ta}Jornadas de Desarrollo e Innovación Tecnológica 2007
16. Gil, A. "Tratado de Nutrición" Tomo II. Composición y Calidad nutricional de los Alimentos 2^{da} edición Editorial Medica Panamericana Madrid 2010. p.243
17. Gironella, D.A.; De'Angeli, G. "Larousse de la Cocina Mexicana" 2006, México Larouss p. 165
18. González, H.A. "Principios de bioqímica clínica y patología molecular" Elsevier España S.L Barcelona España 2010 p.222
19. Huerta, A.C.A. "Degradación de compuestos aromáticos por medio de dióxido de cloro y sus análisis comparativos" Universidad Nacional Autónoma de México. Fac. de Química. Asesor. Dr. Pandiyan Thangarasu. Tesis para obtener el grado de Maestro en Ingeniería. 2011. p.140-145
20. Hui, Y.H.; Guerrero, I.; Legarreta, M.; Rosmini, R. "Ciencia y Tecnología de Carnes". Editorial Limusa, S.A de C.V Grupo Noriega Editores. Impreso en México, "2006. p.111.
21. INEGI. Instituto Nacional de Estadísticas y Geografía. "El sector alimentario en México 2010". Serie de estadísticas sectoriales. Instituto Nacional de Estadísticas y Geografía México. Alimentos, Abasto de- Estadísticas- México 2. Agricultura-Estadísticas- México Impreso en México Cuadro 7.2 .4 Diciembre 2009.p. 188-197
22. Khalid, I.S.; Alaa, E.M.A.M. "Organocchlorine pesticide residues in camel, cattle and sheep carcasses slaughtered in Sharkia province, Egupt" El Sevier ScienceDirect Food Chemistry (2008) 108 p.154-164
23. König, H.E.; Liebich, H.G.; Brangulla, H. "Anatomía de los animales domesticos. Órganos, sistema circulatorio y sistema nervioso" Tomo 2^{da} Edición corregida y aumentada. Editorial Médica Panamericana Madrid España 2005 p. 71-77



24. Kumar, P.; Sinh, S.P.; Madhukar, D.; Kotresh, A.M. "Deterioration endofulfan in buffalo meat using high performance liquid chromatography" Buffalo Bulletin. December 2009. Col. 28 N. 4 p. 188-197.
25. Lorenzo, J.M.; Purriños, L.; Fontan, G.; Franco, D. "Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in two Spanish traditional smoked sausage varieties: "Androlla" and "Botillo"" Meat Science 2010 10.1016/j.meatsci.2010.05.032.
26. Márquez, L.D. "Residuos Químicos en alimentos de origen Animal: problemas y desafíos para la inocuidad alimentaria en Colombia" Revista Corporica-Ciencia y Tecnología Agropecuaria 2008 Volumen 1. Número 9 p.124-1.
27. Martínez, C.M.A. "Aproximación Experimental y Teórica al Estudio de la Reactividad de los Clorofenoles" Universidad Nacional Autónoma de México Fac. de Química. Dr. Pandiyan Thangarasu. 2002. Tesis para obtener el título de maestro en ciencias químicas. p.45-59.
28. Mello, J.P.F.D. "Food Safety. Contaminants and toxins" CABI Publishing. Trowbridge. England. 2003 p. 271-295.
29. Mendoza, P.N. "Farmacología médica". Editorial Médica Panamericana. México D.F. 2008 p. 796-797.
30. Merí, A. "Fundamentos de fisiología de la actividad física y el deporte" Editorial Médico Panamericana. Madrid, España. 2005 p.86.
31. Modificación a la "Norma Oficial Mexicana" NOM-008-ZOO-1994. SAGARPA. México. Secretaría de Agricultura, Ganadería y Desarrollo Rural. "Especificaciones zoonosanitarias para la construcción y equipamiento de establecimientos para el sacrificio de animales y los dedicados a la industrialización de productos cárnicos, en aquellos puntos que resultaron procedentes".
32. Norma Mexicana NMX-FF-081-2003. SAGARPA, MÉXICO. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. "Productos Pecuarios-Carne de Porcino en canal-Calidad de la carne- Clasificación"
33. NORMA Oficial Mexicana NOM-158-SCFI-2003. SECRETARÍA DE ECONOMÍA, México. "Jamón-Denominación y clasificación comercial, especificaciones fisicoquímicas, microbiológicas, organolépticas, información comercial y métodos de prueba." Agosto 2003.



34. NORMA Oficial Mexicana NOM-127-SSA1-1994. SECRETARIA DE SALUD. Dirección General de Salud Ambiental. México. “Salud Ambiental, agua para uso y consumo humano-límites permisibles de calidad y tratamientos a que debe someterse el agua para su potabilización.” Febrero 1995.
35. NORMA Oficial Mexicana NOM-213-SSA1-2002. SECRETARIA DE SALUD. México “Productos y servicios. Productos cárnicos procesados. Especificaciones sanitarias. Métodos de prueba.” 11 de septiembre del 2005.
36. NORMA Oficial Mexicana” NOM-004-ZOO-1994. SAGARPA. México. Secretaría de Agricultura y Recursos Hidráulicos. “Control de residuos tóxicos en carne, grasa, hígado y riñón de bovinos, equinos, porcinos y ovinos”. 11 de septiembre de 1996.
37. NORMA Oficial Mexicana” NOM-007-ZOO-1994. SAGARPA. México. Secretaria de Agricultura, Ganadería y Desarrollo Rural. “Campaña Nacional contra la Enfermedad de Aujesky” 20 de septiembre 1994.
38. NORMA Oficial Mexicana NOM-009-ZOO-1994 SAGARPA. México. Secretaría de Agricultura y Recursos Hidráulicos. “Proceso sanitario de carne” 25 de octubre 1994.
39. NORMA Oficial Mexicana NOM-010-ZOO-1994. SAGARPA. México. Secretaría de Agricultura y Recursos Hidráulicos. “Determinación de cobre, plomo y cadmio en hígado, músculo y riñón de bovinos, equinos, porcinos, ovinos y aves, por espectrometría de absorción atómica” 10 de enero 1995.
40. NORMA Oficial Mexicana NOM-011-ZOO-1994. SAGARPA. México. Secretaría de Agricultura y Recursos Hidráulicos. “Determinación de sulfonamidas en hígado y músculo de bovinos, ovinos, equinos, porcinos y aves por cromatografía capa fina densitometría” 01 de marzo de 1995.
41. NORMA Oficial Mexicana NOM-014-ZOO-1994. SAGARPA. México. Secretaría de Agricultura y Recursos Hidráulicos. “Determinación de cloranfenicol en músculo de bovinos equinos, porcinos, ovinos y aves, por cromatografía de gases” 18 de marzo de 1995.
42. NORMA Oficial Mexicana NOM-015-ZOO-1994. SAGARPA. México. Secretaría de Agricultura y Recursos Hidráulicos. “Análisis de arsénico, en hígado, músculo y riñón de bovinos, equinos, porcinos, ovinos y aves por espectrometría de absorción atómica” 09 de marzo de 1995.



-
43. NORMA Oficial Mexicana NOM-016-ZOO-1994. SAGARPA. México. Secretaría de Agricultura y Recursos Hidráulicos. "Análisis de mercurio en hígado, músculo y riñón de bovinos, equinos, porcinos, ovinos y aves, por espectrometría de absorción atómica" 10 de marzo de 1995.
44. NORMA Oficial Mexicana NOM-017-ZOO-1994. SAGARPA. México. Secretaría de Agricultura y Recursos Hidráulicos. "Análisis de bencimidazoles en hígado y músculo de bovinos, equinos, porcinos, ovinos y aves por cromatografía de líquidos alta resolución" 28 de marzo de 1995.
45. NORMA Oficial Mexicana. NOM-019-ZOO-1994. SAGARPA. México. Secretaría de Agricultura y Recursos Hidráulicos. "Campaña nacional contra la garrapata *Boophilus spp*" 16 de abril de 1996.
46. NORMA Oficial Mexicana NOM-020-ZOO-1995. SAGARPA. México. Secretaría de Agricultura y Recursos Hidráulicos. "Determinación de ivermectinas en hígado de bovinos equinos, porcinos, ovinos y aves por cromatografía de líquidos alta resolución" 23 de mayo de 1995.
47. NORMA Oficial Mexicana NOM-021-ZOO1995. SAGARPA. México. Secretaría de Agricultura y Recursos Hidráulicos. "Análisis de residuos de plaguicidas organoclorados y bifenilos policlorados en grasa de bovinos, equinos, porcinos, ovinos y aves por cromatografía de gases" 24 d3 mayo de 1995.
48. NORMA Oficial Mexicana NOM-023-ZOO-1995. SAGARPA. México. Secretaría de Agricultura y Recursos Hidráulicos. "Identificación de especie animal en músculo de bovinos, ovinos, equinos, porcinos y aves, por la prueba de inmunodifusión en gel" 15 de septiembre de 1995.
49. NORMA Oficial Mexicana NOM-025-ZOO-1995. SAGARPA. México. Secretaría de Agricultura y Recursos Hidráulicos. "Características y especificaciones zoonosanitarias para las instalaciones, equipo y operación de establecimientos que fabriquen productos alimenticios para uso en animales o consumo por éstos" 17 de octubre de 1995.
50. NORMA Oficial Mexicana NOM-028-ZOO-1995. SAGARPA. México. Secretaría de Agricultura y Recursos Hidráulicos. "Determinación de residuos de plaguicidas organofosforados, en hígado y músculo de bovinos, equinos, porcinos, ovinos, caprinos, cérvidos y aves, por cromatografía de gases" 25 de enero de 1996.



-
51. NORMA Oficial Mexicana NOM-030-ZOO-1995. SAGARPA. México. Secretaría de Agricultura y Recursos Hidráulicos. "Especificaciones y procedimientos para la verificación de carne, canales, vísceras y despojos de importación en puntos de verificación zoosanitaria" 2 de mayo 1996 .
52. NORMA Oficial Mexicana NOM-031-ZOO.1995 SAGARPA. México. Secretaría de Agricultura y Recursos Hidráulicos. "Campaña nacional contra la tuberculosis bovina (*mycobacterium bovis*)" 9 de marzo de 1996.
53. NORMA Oficial Mexicana NOM-032-ZOO-1996. SAGARPA. México. Secretaría de Agricultura y Recursos Hidráulicos. "Determinación de antibióticos en hígado, músculo y riñón de bovinos, ovinos, equinos, porcinos, aves, caprinos y cérvidos por la prueba de la torunda y por bioensayo" 27 de febrero de 1996.
54. NORMA Oficial Mexicana NOM-034-ZOO-1996 SAGARPA. México. Secretaría de Agricultura y Recursos Hidráulicos. "Determinación de dietilestilbestrol, zeranol y taleranol en hígado y músculo de bovinos, equinos, porcinos, ovinos, aves, caprinos y cérvidos por cromatografía de gases-Espectrometría de masas" 28 de febrero de 1996.
55. NORMA Oficial Mexicana NOM-037-ZOO-1995. SAGARPA. México. Secretaría de Agricultura y Recursos Hidráulicos. "Campaña nacional contra la fiebre porcina clásica" 30 de octubre de 1996.
56. NORMA Oficial Mexicana NOM-041-ZOO-1995. SAGARPA. México. Secretaría de Agricultura y Recursos Hidráulicos. "Campaña nacional contra la brucelosis en los animales" 21 de agosto de 1996.
57. NORMA Oficial Mexicana NOM-046-ZOO-1995. SAGARPA. México. Secretaría de Agricultura y Recursos Hidráulicos. "Sistema Nacional de Vigilancia Epizootiológica" 20 de febrero de 1997.
58. NORMA Oficial Mexicana NOM-054-ZOO-1996. SAGARPA. México. Secretaría de Agricultura y Recursos Hidráulicos. "Establecimiento de cuarentenas para animales y sus productos" 9 de junio de 1998.
59. NORMA Oficial Mexicana NOM-179-SSA1-1998. Secretaria de Salud. "Vigilancia y evaluación del control de calidad de agua para uso y consumo humano, distribuida por el sistema de abastecimiento publico"



-
60. ONU. "Status of Ratifications, Stockholm Convention on Persistent Organic Pollutants." Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente (UNEP) Stockholm, 22 mayo 2001.
61. PANREAC QUÍMICA. S.A. "Analíticos en alimentaria. Métodos Oficiales de Análisis. Carne y productos cárnicos". Centro Telemático Editorial. El Salvador. 1999 p.8-9
62. Prado, G.; Díaz, G.; Vega, L.S.; González, M.; Pérez, N.; Urban, G.; Gutierrez, R.; Ramírez, A.; Pinto M.; "Residuos de plaguicidas organoclorados en leche pasteurizada comercializada en la Ciudad de México" Scielo Vet. 1998 V.30 N-1.
63. Real, O.J.; Cortés, G.R.; Bravo, C.; Viveros, F.L. "Tratamiento de aguas residuales contaminadas con 2-clorofenol mediante oxidación catalítica por vía húmeda" Tecnología, Ciencia, Educación, Julio-Diciembre 2008 Vol. 23, Núm.2. p.62-68.
64. Repetto, J.M.; Repetto, K.G. "Toxicología fundamental" 4^{ta} Edición. Ediciones Díaz Santo 2009 p. 23.
65. Rodríguez, R.V. M.; Simón, M.E. "Base de la Alimentación Humana". Editorial. Netbiblio S.L. España 2008. p. 88-87.
66. Satoh, H.; Sasaki, Y.; Nakamura, Y.; Okobe, S.; Suzuki, T. "Use of Microelectrodes to Investigate the effects of 2-chlorophenol Microbial Activities in Biofilms" Biothecnology and Bioengineering 2005-07 V-91 N-2 p.33-138.
67. SAGARPA, MÉXICO. Secretaria de Agricultura, Ganadería, Desarrollo, Rural, Pesca y Alimentación. "Escenario Base 09-18. Proyecciones para el Sector Agropecuario de México". Subsecretaria de fomento a los Agronegocios. 2009.
68. Servicio Ocupacional. Departamento de Salud y Servicios para Personas Mayores de New Jersey. "Hoja Informativa Sobre Sustancias Peligrosas. 4-clorofenol". Diciembre 1999a .
69. Servicio Ocupacional. Departamento de Salud y Servicios para Personas Mayores de New Jersey. "Hoja Informativa Sobre Sustancias Peligrosas. 2,4-diclorofenol". Diciembre 1999b .
70. Serra, F. B. "Desarrollo de electrodos compósitos enzimáticos para la detección y determinación de compuestos fenólicos" Director. Pingarrón Carrazón José Manuel, Reviejo García Ángel. Universidad Complutense de Madrid. Departamento de Química Analítica. 2002. p.5657.



-
71. Serra, M.L.; Aranceto, B.J. "Nutrición y Salud Pública, bases científicas y aplicaciones" 2^{da} Edición, Elsevier- Masson S.A Barcelona España. 2006. p.235.
72. Swadesh, J. "HPLC: Practical and Industrial Applications" Analytical Chemistry Series. 2^{da} Edición. 2010. CRC Press. E.U.A p.123-125.
73. Wade, L.G. "Química Organica" 4^{ta} Edición. 1993 México. Prentice Hall Hispanoamericana, S.A. de C.V p.567-569.
74. Waliszewski, S.M.; Pardío, S.V. T.; Waliszewski, K. N.; Chantari, P.J.N.; Infanzón, R.R. M.; Rivera, J. "Niveles de Plaguicidas organoclorados en carne y grasas de bovino procedentes de Veracruz, México". Int. Contam. Ambient 1996 12 (2), p.53-59.
75. Wayne, W.D. "Bioestadística: bases para el Análisis de las Ciencias de la Salud" Editorial Limusa, S.A. México 1977 p: 91-117, 197-105, 193-223

10.APÉNDICE 1.

Tabla 1. Valores obtenidos para la determinación del nivel de absorción del fenol en hígado de res seco, cuando presenta un comportamiento lineal.

Tiempo	Área (mAU)	Concentración (mg/mL)	Fenol absorbido (mg/g de carne BS)	Concentración inicial (mg/g carne BS)	Concentración real recuperada (mg/g de carne BS)	Nivel de Absorción (%)	Promedio N.A. (%)
0	37.6	2.22e ⁻⁰³	9.98e ⁻⁰⁴	3.84e ⁻⁰³	1.07e ⁻⁰³	17.82	17.84
0	37.3	2.21e ⁻⁰³	2.82e ⁻⁰⁴	3.84e ⁻⁰³	3.02e ⁻⁰⁴	17.86	
1	98.56	5.58e ⁻⁰³	7.32e ⁻⁰⁴	3.82e ⁻⁰³	7.84e ⁻⁰⁴	20.54	19.64
1	96.32	5.46e ⁻⁰³	7.16e ⁻⁰⁴	3.82e ⁻⁰³	7.66e ⁻⁰⁴	18.74	
2	7.45	5.59e ⁻⁰⁴	6.97e ⁻⁰⁴	3.84e ⁻⁰³	7.46e ⁻⁰⁴	19.43	19.95
2	7.99	5.88e ⁻⁰⁴	7.34e ⁻⁰⁴	3.84e ⁻⁰³	7.86e ⁻⁰⁴	20.46	
3	115.23	6.50e ⁻⁰³	8.19e ⁻⁰⁴	3.84e ⁻⁰³	8.77e ⁻⁰⁴	22.83	22.07
3	115.1	6.50e ⁻⁰³	8.18e ⁻⁰⁴	3.84e ⁻⁰³	8.76e ⁻⁰⁴	21.30	
4	246.8	1.38e ⁻⁰²	9.78e ⁻⁰⁴	3.82e ⁻⁰³	1.05e ⁻⁰³	27.43	26.43
4	245.1	1.37e ⁻⁰²	9.71e ⁻⁰⁴	3.82e ⁻³	1.04e ⁻⁰³	25.42	



Tabla 2. Valores obtenidos para la determinación del nivel de absorción del 4-clorofenol en hígado de res húmedo, cuando presenta un comportamiento lineal la absorción.

Tiempo	Área (mAU)	Concentración (mg/mL)	4-clorofenol absorción (mg/g de carne BH)	Concentración real recuperada (mg /g carne BH)	Concentración inicial (mg/g carne BH)	Nivel de Absorción (%)	Promedio N.A. (%)
0	129.6	1.13e-02	2.68e-03	4.59e-03	2.61e-03	82.41	82.43
0	129.3	1.13e-02	2.68e-03	4.58e-03	2.61e-03	82.45	
1	100.4	8.77e-03	2.33e-03	3.99e-03	2.59e-03	84.60	84.70
1	99.2	8.67e-03	2.30e-03	3.94e-03	2.59e-03	84.79	
2	55.4	4.83e-03	2.08e-03	3.57e-03	2.60e-03	86.28	86.29
2	55.3	4.82e-03	2.08e-03	3.56e-03	2.60e-03	86.31	
3	82.2	7.18e-03	1.70e-03	2.91e-03	2.60e-03	88.80	88.82
3	81.7	7.13e-03	1.69e-03	2.90e-03	2.60e-03	88.86	
4	127	1.11e-02	1.28e-03	2.19e-03	2.58e-03	91.51	91.50
4	127.3	1.11e-02	1.28e-03	2.20e-03	2.58e-03	91.49	
5	98.5	8.61e-03	1.19e-03	2.04e-03	2.60e-03	92.15	92.13
5	98.9	8.64e-03	1.20e-03	2.05e-03	2.60e-03	92.12	



Tabla 3. Valores obtenidos para la determinación del nivel de absorción del 2,4-diclorofenol en hígado de res húmedo, en la zona en que presenta un comportamiento lineal.

Tiempo	Área (mAU)	Concentración (mg/mL)	2,4- diclorofenol absorbido (mg/g de carne BH)	Concentración real recuperada (mg/g carne BH)	Concentración inicial (mg/g carne BH)	Nivel de Absorción (%)	Promedio N.A. (%)
0	317.5	3.32e-02	1.43e-02	2.13e-02	2.37e-03	10.2801	10.07
0	318.9	3.34e-02	1.44e-02	2.14e-02	2.37e-03	9.8564	
1	378.4	4.00e-02	1.10e-02	1.63e-02	2.40e-03	32.2635	32.42
1	376.7	3.98e-02	1.09e-02	1.62e-02	2.40e-03	32.5858	
2	158.3	1.54e-02	7.60e-03	1.13e-02	2.40e-03	52.9152	52.92
2	158.3	1.54e-02	7.60e-03	1.13e-02	2.40e-03	52.9152	
3	325	3.40e-02	4.04e-03	6.00e-03	2.38e-03	74.7335	74.97
3	319.4	3.34e-02	3.97e-03	5.89e-03	2.38e-03	75.1990	
4	115.2	1.05e-02	2.02e-03	3.00e-03	2.41e-03	87.5227	87.46
4	116.2	1.07e-02	2.04e-03	3.03e-03	2.41e-03	87.3901	



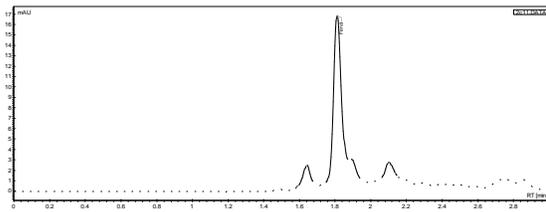
Tabla 4. Valores obtenidos para la determinación del nivel de absorción del 2,4,6-triclorofenol en hígado de res húmedo, cuando se presenta el comportamiento lineal.

Tiempo	Área (mAU)	Concentración (mg/mL)	2,4,6- triclorofenol absorbido (mg/g de carne BH)	Concentración real recuperada (mg/g carne BH)	Concentración inicial (mg/g carne BH)	Nivel de Absorción (%)	Promedio N.A. (%)
0	183.3	2.77e-02	1.13e-02	1.57e-02	2.64e-03	40.57	36.95
0	206	3.11e-02	1.27e-02	1.76e-02	2.64e-03	33.33	
1	172.5	2.61e-02	1.04e-02	1.45e-02	2.63e-03	44.84	45.02
1	171.6	2.59e-02	1.04e-02	1.44e-02	2.63e-03	45.19	
2	187.3	2.83e-02	7.38e-03	1.10e-02	2.59e-03	57.67	57.89
2	185.2	2.80e-02	7.30e-03	1.08e-02	2.59e-03	58.11	
3	105.5	1.61e-02	5.68e-03	8.43e-03	2.64e-03	68.02	67.43
3	109.6	1.67e-02	5.89e-03	8.75e-03	2.64e-03	66.84	
4	175.4	2.65e-02	4.75e-03	7.06e-03	2.59e-03	72.77	72.45
4	179.4	2.71e-02	4.86e-03	7.22e-03	2.59e-03	72.14	

11. APÉNDICE II.

Se presentan ejemplos de los cromatogramas que se obtiene al inyectar en el HPLC, la grasa del hígado de res después de ser contaminada con cualquiera de los clorofenoles o con el fenol. Los cromatogramas se presentan sin llevar a cabo la integración adecuada de las áreas.

- **Fenol**

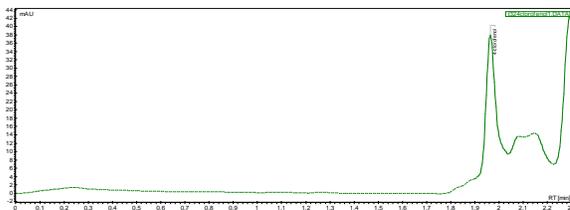


Componente

Fenol.

Figura 1. Cromatograma de la grasa en donde se identifico al fenol por el tiempo de retención que presenta, los picos sin identificar son de compuestos presentes en la grasa que se extrajo.

- **4-clorofenol**



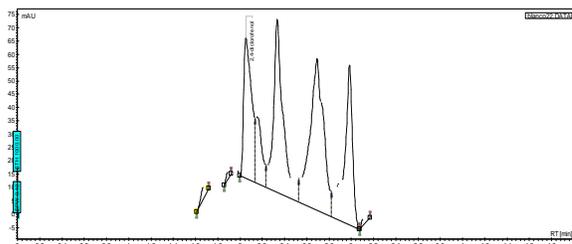
Componente

4-clorofenol

Figura 2. Cromatograma de la grasa en donde se identifico al 4-clorofenol por el tiempo de retención que presenta, los picos sin identificar son de compuestos presentes en la grasa que se extrajo



- **2,4-diclorofenol.**

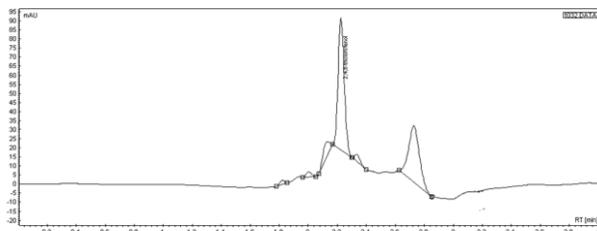


Componente

2,4-diclorofenol

Figura 3. Cromatograma de la grasa en donde se identifico al 4,6-diclorofenol por el tiempo de retención que presenta, los picos sin identificar son de compuestos presentes en la grasa que se extrajo

- **2,4,6-triclorofenol**



Componente

2,4,6-triclorofenol

Figura 4. Cromatograma de la grasa en donde se identifico al 2,4,6-triclorofenol por el tiempo de retención que presenta, los picos sin identificar son de compuestos presentes en la grasa que se extrajo