

UNIVERSIDAD NACIONAL DE INGENIERÍA
FACULTAD DE CIENCIAS




TRABAJO DE SUFICIENCIA PROFESIONAL

“Desarrollo y validación de un método analítico para la determinación de dioxinas y furanos en harina de pescado por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas triple cuadrupolo (GC-MS/MS)”

PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL DE LICENCIADO EN QUÍMICA


ELABORADO POR:

HANNS RUSBELL GOMEZ JANAMPA

 0009-0001-5973-6202

ASESOR:

Mg. QUIROZ AGUINAGA, ULISES

 0000-0002-9971-0656

LIMA-PERÚ

2025

Citar/ How to cite	Gomez Janampa [1]
Referencia/ Reference	[1] H. Gomez Janampa “Desarrollo y validación de un método analítico para la determinación de dioxinas y furanos en harina de pescado por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas triple cuadrupolo (GC-MS/MS)” [Trabajo de suficiencia profesional, Universidad Nacional de Ingeniería]. Lima, Perú: Universidad Nacional de Ingeniería, 2025.
Estilo/ Style: IEE (2020)	

Citar/ How to cite	(Gomez, 2025)
Referencia/ Reference	Gomez, H. (2025). Desarrollo y validación de un método analítico para la determinación de dioxinas y furanos en harina de pescado por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas triple cuadrupolo (GC-MS/MS) [Trabajo de suficiencia profesional, Universidad Nacional de Ingeniería]. Repositorio Institucional UNI.
Estilo/ Style: APA (7ma ed.)	

Dedicatoria

*A mi familia que son el motivo de mi perseverancia
Y a mis padres gracias por el esfuerzo de siempre.*

Resumen

Debido a la alta toxicidad de las dioxinas y furanos, el análisis de estos compuestos en alimentos como la harina de pescado es indispensable para la exportación o la venta en el mercado nacional. Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), el límite permisible de dioxinas y furanos en alimentos es de $1,25 \text{ ng kg}^{-1}$. De la diversidad de dioxinas y furanos se estudiaron 17 con riesgos toxicológicos altos según el Reglamento (UE) N° 277/2012 los cuales se describen en el anexo N°2.

Los laboratorios de servicios locales no cuentan con un método propio para realizar este tipo de análisis, por lo que deben tercerizar el trabajo con laboratorios extranjeros. Esto genera demoras en el tiempo de respuesta, así como el costo que demanda este proceso.

Para abordar esta problemática, se implementó y validó un método de análisis que utiliza un cromatógrafo de gases acoplado a un espectrómetro de masas triple cuadrupolo (GC-MS/MS).

Los parámetros de validación desarrollados fueron: precisión, veracidad, límite de cuantificación, límite de detección, linealidad, sensibilidad, selectividad, robustez, rango lineal. Las diferentes curvas de linealidad tienen un coeficiente de determinación (R^2) mayor a 95%.

Palabras clave: dioxina, furano, validación, GC-MS-MS, harina de pescado.

Abstract

Due to the high toxicity of dioxins and furans, the analysis of these compounds in foodstuffs such as fishmeal is indispensable for export or sale on the domestic market. According to the World Health Organization (WHO), the permissible limit for dioxins and furans in food is 1.25 ng kg^{-1} . Of the diversity of dioxins and furans, 17 were studied with high toxicological risks according to Regulation (EU) No. 277/2012 which are described in Annex N°2.

Local service laboratories do not have their own method for this type of analysis, to perform this type of analysis, so they must outsource the work to foreign laboratories. This generates delays in response time as well as the cost of this process.

To address this problem, a method of analysis using a gas chromatograph coupled to a triple quadrupole mass spectrometer (GC-MS/MS) was implemented and validated.

The validation parameters developed were: precision, trueness, limit of quantification, limit of detection, linearity, sensitivity, selectivity, robustness, linear range. The linearity curves have a coefficient of determination (R^2) greater than 95%.

Keywords: dioxin, furan, validation, GC-MS-MS, fish meal.

Tabla de Contenido

Resumen.....	iv
Abstract.....	v
Capítulo I. Marco Teórico.....	1
1.1 Harina de Pescado.....	1
1.2 Congéneres.....	1
1.3 Dioxinas y Furanos.....	2
1.3.1 Definición y estructura química.....	2
1.3.2 Propiedades fisicoquímicas.....	3
1.3.3 Fuentes de generación y contaminación por dioxina.....	4
1.3.4 Impacto en la salud.....	4
1.3.5 Factor de equivalencia tóxico.....	5
1.4 Cromatografía de gases.....	5
1.4.1 Sistema de inyección.....	7
1.4.2 Fase móvil.....	8
1.4.3 Fase estacionaria.....	9
1.4.4 Detector de masas.....	9
1.4.5 Software de cuantificación.....	10
1.5 Modos de adquisición.....	10
1.5.1 Modo Scan.....	10
1.5.2 Modo SIM.....	11
1.5.3 Modo MRM.....	11
1.6 Validación de métodos de ensayos.....	12
1.6.1 Precisión.....	12
1.6.2 Veracidad.....	13
1.6.3 Especificidad.....	13
1.6.4 Selectividad.....	13
1.6.5 Linealidad.....	13
1.6.6 Límite de detección.....	13
1.6.7 Límite de cuantificación.....	14
1.6.8 Robustez.....	14
Capítulo II. Planteamiento de la realidad, problemática, objetivos.....	15
2.1 Problemática de los residuos en latino américa.....	15

2.2 Respuesta de la OMS.....	18
2.3 Objetivos	19
2.3.1 Generales	19
2.3.2 Específicos	19
Capítulo III. Metodología, descripción de la función desarrollada	20
3.1 Equipamiento, reactivos y materiales	20
3.1.1 Matriz.....	20
3.1.2 Equipos.....	20
3.1.3 Materiales	20
3.1.4 Reactivos	21
3.1.4.1 Preparación de Soluciones estándar	21
3.1.4.2 Reactivos para análisis	21
3.2 Condiciones de Instrumentación.....	22
3.2.1 Condiciones del cromatógrafo de gases	22
3.2.2 Condiciones del detector.....	22
3.3 Procedimiento.....	22
3.3.1 Preparación del estándar interno y patrón de trabajo	22
3.3.2 Preparación de estándares para los límites de detección y cuantificación	23
3.3.3 Preparación de la curva de calibración para las dioxinas y furanos.....	23
3.3.4 Preparación de la muestra	24
3.3.4.1 Pesaje.....	24
3.3.4.2 Adición del estándar interno de PCDD/F.....	24
3.3.4.3 Primera etapa: Extracción por Soxhlet	25
3.3.4.3.1 Primera extracción	25
3.3.4.3.2 Segunda extracción	25
3.3.4.3.3 Concentración	26
3.3.4.4 Segunda etapa: Clean-Up uso de la columna sílica mixta.....	26
3.3.4.5 Limpieza con columna de carbón.....	27
3.3.4.6 Lectura de muestras	28
3.4 Cálculo y expresión de resultados de validación.....	28
3.4.1 Cálculo de concentración en equivalentes toxicológico.....	28
3.4.2 Calculo de los valores de equivalentes toxicológicos (TEQ).....	29
3.4.3 Cálculo del porcentaje de recuperación de los estándares internos	29
3.5 Parámetros de validación para el ensayo de PCDD/F en muestras de harían de pescado	31

3.5.1 Precisión	31
3.5.2 Veracidad.....	32
3.5.3 Selectividad	34
3.5.4 Linealidad / Sensibilidad	36
3.5.5 Límite de detección y cuantificación.....	39
3.5.6 Robustez.....	39
3.5.7 Rango de trabajo	41
Capítulo VI. Discusiones, conclusiones y recomendaciones	45
4.1 Discusión de resultados.....	45
4.2 Conclusiones.....	49
4.3 Recomendaciones.....	49
Referencias Bibliográficas.....	51
Lista de Anexos	55

Lista de Tabla

Tabla 1. Preparación de la solución stock para los estándares PCDD/F	23
Tabla 2. Preparación para la curva de calibración de dioxinas y furanos	24
Tabla 3. Resultados del estudio de precisión para el 2378-TCDD.....	32
Tabla 4. Porcentajes de recuperación del estudio de veracidad por adición para 2378-TCDD	32
Tabla 5. Análisis de varianza de los datos de veracidad	33
Tabla 6. Relación de transiciones calificación/cuantificación a partir de la curva de calibración para 2378-TCDD	35
Tabla 7. Evaluación de la relación de transiciones calificación/cuantificación para 2378-TCDD	35
Tabla 8. Desarrollo de las pruebas estadísticas para la pendiente, intercepto y coeficiente de correlación	37
Tabla 9. Análisis de varianza de linealidad para el analito 2378-TCDD.....	38
Tabla 10. Porcentaje de recuperación para el analito 2378-TCDD.....	39
Tabla 11. Establecimiento de los límites de detección y cuantificación del 2378-TCDD	39
Tabla 12. Modelo de robustez – Youden – Steiner.....	40
Tabla 13. Resultados con los variables modificados al analito 2378-TCDD	40
Tabla 14. Evaluación de los parámetros que han variado para el analito 2378-TCDD	41
Tabla 15. Evaluación de la precisión de la concentración más alta evaluada del analito 2378-TCDD	41

Tabla 16. Evaluación de la veracidad de la concentración más alta evaluada del analito 2378-TCDD 43

Lista de Figuras

Figura 1. Estructura de las Dioxinas-----	2
Figura 2. Estructura de los Furanos -----	2
Figura 3. Sistema de un cromatógrafo gases-----	7
Figura 4. Sistema de inyección -----	8
Figura 5. Vías de liberación de los PCDD/PCDF al ambiente-----	16
Figura 6. Columna preparada de sílica mixta -----	26
Figura 7. Columna de carbón activado AX-21 -----	28
Figura 8. Cromatograma de las dioxinas y furanos -----	31
Figura 9. Curva linealidad para 2378-TCDD -----	36
Figura 10. Gráfica de h de Mandel-----	42
Figura 11. Gráfica de k de Mandel-----	43

Lista de Abreviaturas

LCS	Muestra de Control de Laboratorio
GC	Cromatografía de Gases
MS	Espectrometría de Masas
UHRMS	Espectrometría de Masas de Alta Resolución
PCDD	Policlorodibenzo-para-dioxinas
PCDF	Policlorodibenzofuranos
PCDD/F	Policlorodibenzo-para-dioxinas y Policlorodibenzofuranos
TEF	Factores Toxicológicos
TEQ	Equivalentes Toxicológicos
EPA	Environmental Protection Agency
EI	Ionización de electrones
MRM	Reacción múltiple
OMS	Organización Mundial de la Salud
RBF	Matraces de Fondo Redondo
DESV EST	Desviación Estándar
RSD_R	Desviación Estándar Relativa de reproducibilidad
GL	Grados de Libertad

INTRODUCCIÓN

Los compuestos tóxicos dioxinas y furanos están constituidos por anillos con átomos de oxígeno y cloro incorporados en sus estructuras. Esta característica resulta en la formación de numerosos isómeros, entre los cuales algunos poseen un alto potencial nocivo. El concepto de "dioxinas" hace referencia a un conjunto de compuestos orgánicos denominados dibenzodioxinas policloradas y dibenzofuranos policlorados (PCDD y PCDF). Estos compuestos están formados por dos anillos bencénicos unidos por uno o dos átomos de oxígeno. Estos también contienen entre uno y ocho átomos de cloro en la molécula (Karchner, Franks, & Keneddy, 2006). Debido a su alta toxicidad para la salud humana, su límite permisible en harina de pescado es de $1,25 \text{ ng kg}^{-1}$ (Reglamento (UE) n° 277/2012, 2012), por lo que el análisis de Dioxinas y Furanos es necesario para la exportación o venta en el mercado nacional. Para su análisis, se requiere un cromatógrafo GC/HRMS de alta resolución debido al límite extremadamente bajo. La principal limitación en Perú radica en que, debido a su elevado costo, ningún laboratorio cuenta con este equipo. Actualmente, se contratan otros laboratorios del extranjero para analizar las dioxinas y furanos en la harina de pescado, lo que retrasa el tiempo de respuesta y reduce los ingresos de la empresa. Por lo tanto, se recomendó utilizar un método que emplee un cromatógrafo de gases acoplado a un espectrómetro de masas triple cuadrupolo (GC/MSMS), equipo con el que se cuenta en el laboratorio.

Para cuantificar las dioxinas y furanos, se acondicionará el cromatógrafo de gases Agilent 7890B y el detector de masas de triple cuadrupolo Agilent 7010B con los parámetros adecuados para obtener un cromatograma gaseoso adecuado, ubicado en el laboratorio de medio ambiente de la unidad de negocio Environment and Industry.

La Organización Mundial de la Salud (TEQ-OMS) determinará las concentraciones de dioxinas en equivalentes tóxicos de una muestra de harina de pescado mediante la

determinación de los límites de detección, cuantificación, las curvas de linealidad y el análisis de la muestra (con sus respectivos controles). (Reglamento (UE) n° 277/2012, 2012)

Con el presente trabajo se demostrará que los conocimientos adquiridos en la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional de Ingeniería contribuyen como base para la investigación de nuevas técnicas, procedimientos y seguir ampliando nuestros conocimientos y sea posible realizar análisis desafiantes.

Cabe resaltar que la implementación de este análisis en un laboratorio generaría elevadas ganancias al laboratorio, debido a la alta demanda de este tipo de análisis en harina de pescado.

En el presente trabajo estuvimos involucrados principalmente dos personas en la puesta en marcha del método instrumental, mi persona estuvo a cargo con el desarrollo y validación para la determinación de dioxinas y furanos en harina de pescado, y mi compañero de trabajo Miguel Cahuaya en la puesta en marcha para el proceso de producción de la metodología.

CAPÍTULO I. Marco Teórico

1.1 Harina de Pescado

La harina de pescado, un producto orgánico compuesto principalmente por proteínas es ampliamente empleado en la alimentación animal, especialmente en la fabricación de piensos debido a su elevado valor energético. Se ha observado un incremento en la producción de leche en vacas y cerdos cuando son alimentados con este tipo de harina. La harina de pescado es producida desde los subproductos de pescado de calidad estándar o de pescados enteros de excelente calidad. Las propiedades nutritivas de la harina de pescado varían según la variedad de pescado utilizada. En Norteamérica, la harina de pescado es elaborada a partir de especies como el "Menhaden" que tienen una longitud de 30 cm. En Europa, se prefiere el uso de especies como el "Capelán" y el "Arenque" (20 cm). En Latinoamérica, para la producción de harina de pescado se emplean especies como la sardina, el atún, el "rabo amarillo" y el "machuelo", entre otras (Veterinaria.Digital, 2021). En el Perú, la anchoveta se produce de manera sostenible con el fin de elaborar harina de pescado. El país es reconocido a nivel mundial como uno de los principales productores de anchoveta y harina de pescado (Veterinaria.Digital, 2021).

1.2 Congéneres

Una de dos o más sustancias relacionadas entre sí por origen, estructura o función.

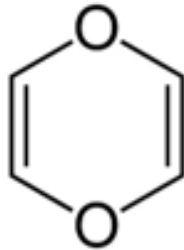
1.3 Dioxina y Furanos

1.3.1 Definición y estructura química

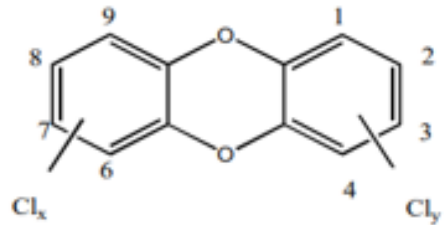
Son extremadamente tóxicas y se caracterizan por ser planas, lo que se logra mediante la unión de dos bencenos a través de dos átomos de oxígeno para las dioxinas (Figura 1) o un átomo de oxígeno para los furanos (Figura 2). El término "dioxinas" abarca los

policlorodibenzo-p-dioxinas (PCDD) y los policlorodibenzofuranos (PCDF). (Reglamento (UE) n° 277/2012, 2012).

Figura 1
Estructura de las Dioxinas



a) Estructura básica de la dioxina



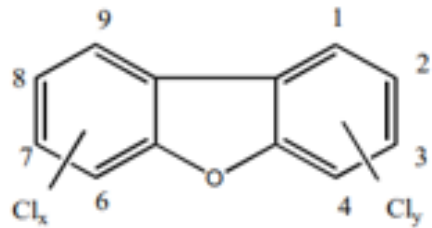
b) Policlorodibenzo-p-dioxinas

5

Figura 2
Estructura de los Furanos



a) Estructura básica del furano



b) Policlorodibenzo-p-furanos

Las diferentes moléculas de PCDD y PCDF presentan átomos de cloro en diferentes posiciones. Estos isómeros se conocen como congéneres, mientras que los homólogos son aquellos que tienen el mismo grado de cloración (Bremauntz, 2004). Hay 210 compuestos entre dioxinas y furanos, de los cuales se conoce a 17 que son los más tóxicos y se pueden reemplazar con cloro en las posiciones 2, 3, 7, 8. De estos (Mamani, 2021) 17 compuestos tóxicos, 10 son congéneres de furanos y 7 son congéneres de

dioxinas, por lo que estos 17 son esenciales para el análisis debido a su alta toxicidad. La 2, 3, 7, 8-tetraclorodibenzo-p-dioxina (TCDD) es el congénere más dañino.

1.3.2 Propiedades fisicoquímicas

Las dioxinas pertenecen a la familia de compuestos orgánicos conocidos como policlorodibenzo-dioxinas (PCDD). Esta familia se compone químicamente de una estructura de anillo triple en la que dos átomos de oxígeno se unen a los dos anillos bencénicos de los extremos y uno o más átomos de cloro se unen a los anillos bencénicos, generando todos los compuestos de la familia que se conocen como isómeros.

Los furanos son miembros de la familia de los policlorodibenzofuranos (PCDF), pero tienen un solo átomo en lugar de dos átomos de oxígeno que unen los anillos.

Esto significa que existen 75 isómeros posibles de PCDD y 135 isómeros posibles de PCDF, ya que tanto los PCDD como los PCDF tienen ocho espacios de unión posibles para cada átomo de cloro.

En la nomenclatura química, se identifica isómeros utilizando números que muestran las posiciones relativas de los átomos de cloro. El 2,3,7,8-tetracloro-p-dibenzodioxina (TCDD) es un compuesto de la familia de los PCDD que contiene cuatro átomos de cloro en las posiciones 2,3,7 y 8, como se observa en la figura 1. (Baird, 2001) (Douglas, 1994).

Los números muestran las diferentes posiciones que pueden ocupar los átomos de cloro.

1.3.3 Fuentes de generación y contaminación por dioxinas

Estas moléculas se producen principalmente como subproductos no deseados en varios procesos industriales que involucran. El uso de cloro o la producción de productos clorados, como el blanqueo de pulpa y pasta de papel con cloro y la producción de

compuestos organoclorados, como clorofenoles, fenilos policlorados (PCBs) y clorobencenos, entre otros (Mamani, 2021). En la actualidad, en muchos países, los procesos térmicos son la principal fuente de emisión de PCDD/PCDF, incluyendo incendios no planificados (en edificios, bosques, equipos con PCBs, etc.), la quema de desechos, los hornos de cementera, la producción de energía (calefacción con combustión de petróleo, carbón o madera, generación. (Mamani, 2021).

Las PCDD están presentes en el medio ambiente a nivel mundial y se encuentran en concentraciones altas en productos de consumo familiar tales como los lácteos, las carnes, los pescados y productos marinos, así como en algunos sedimentos, suelos y alimentos. En las plantas, el agua y el aire sus concentraciones son muy bajas. Las dioxinas pueden pasar de la alimentación animal a la cadena alimentaria humana a través del aire a planta/suelo, de planta/suelo a animal y de agua/sedimento a pescado. (Naccha Torres, 2010).

1.3.4 Impacto en la salud

La EPA ha centrado su atención en investigar los peligros y los efectos de la exposición prolongada a las PCDD/F. En un estudio realizado en animales, la EPA concluye que el TCDD en particular es la dioxina más letal que se conoce y tiene muchos efectos tóxicos: causa alteraciones en el metabolismo, cambios en la inmunidad, anormalidades reproductivas y de desarrollo y neoplasia en animales. Se ha descubierto que las PCDD/F pueden causar cloroacné en la piel de los humanos. Además, se ha relacionado con problemas en los sistemas endocrino, nervioso, inmunológico y reproductivo, así como con defectos de nacimiento y anormalidades en el desarrollo. La exposición crónica a diferentes tipos de cáncer se ha demostrado en experimentos con animales, y recientemente, las PCDD/F se han identificado como potencialmente carcinógenas en humanos. En este aspecto, hay mucha controversia sobre si existe realmente un nivel de exposición seguro. Según EPA (2000).

La exposición a las PCDD/F es principalmente por vía alimentaria. De esta manera, las PCDD/Fs. se acumulan en los tejidos animales y se incorporan a nuestra dieta diaria. De hecho, la vida media del TCDD en el tejido humano es de 7 a 10 años. (OMS, 2007).

1.3.5 Factor de equivalencia toxica

De la familia de congéneres de las dioxinas y furanos, 17 tienen un impacto toxicológico significativo, y el 2,3,7,8-TCDD (Bremauntz, 2004) es el más dañino debido a su elevado valor toxicológico. El grado de toxicidad de cada compuesto se utiliza para comparar los datos analíticos de los 17 congéneres y los resultados se expresan como "Equivalentes Tóxicológicas" (TEQ). Todas las dioxinas y furanos tienen efectos cualitativos similares, pero de intensidades diferentes (Mamani, 2021). El TEF indica el grado de toxicidad de cada congénere y se calcula mediante la relación entre la toxicidad de cada congénere implicado frente al 2,3,7,8-TCDD, el compuesto más tóxico, que tiene un valor de 1. La Organización Mundial de la Salud estableció los estándares únicos de OMS-TEF para humanos en 1997 (Anexo 3).

1.4 Cromatografía de gases

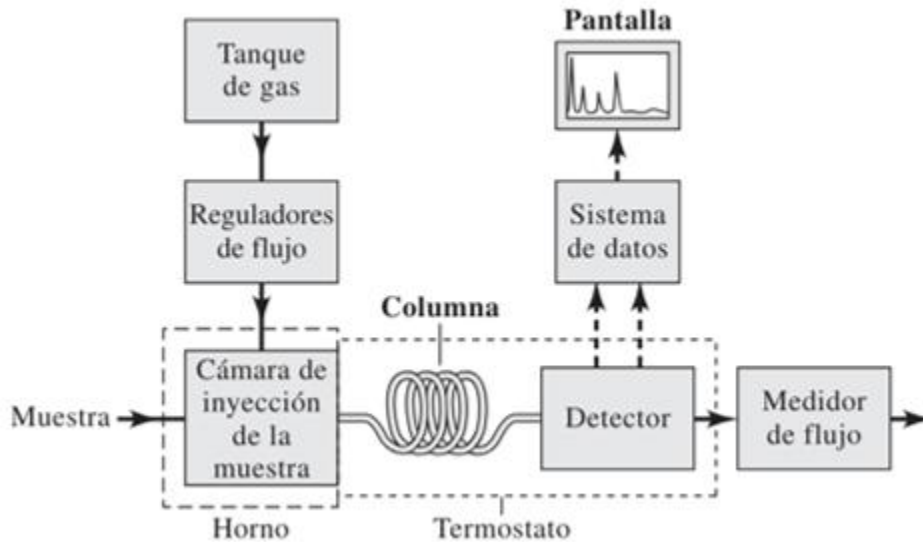
La cromatografía es un método de separación con aplicaciones en todas las ramas de la ciencia. La técnica fue inventada y denominada así por el botánico ruso Mikhail Tswett a principios del siglo XX. Él la utilizaba para separar varios pigmentos vegetales, como clorofilas y xantofilas, haciendo pasar soluciones de estos compuestos a través de una columna de vidrio rellena con carbonato de calcio finamente dividido. Las especies separadas aparecían como bandas coloreadas en la columna, lo que justificaba el nombre que eligió para el método (del griego chroma que significaba "color", y graphein que significaba "escribir"). (Quirós, 2006)

Es un método analítico empleado en el análisis de compuestos volátiles. Si la muestra se encuentra en estado gaseoso, se introduce una cantidad de esta en un flujo de gas inerte (por lo general helio) en movimiento que lo lleva a una columna que contiene la fase estacionaria. Si la muestra se encuentra en estado líquido, entonces se calienta una alícuota de esta y su vapor es transportado por el gas portador a través de la columna. En este caso, los componentes de la muestra se separan por una interacción selectiva entre las fases estacionarias y móviles. Por lo que, salen de la columna en diferentes tiempos y son detectados por separado. El tiempo de retención es el tiempo transcurrido entre la inyección de la muestra al equipo y la aparición de las bandas individuales de los componentes (los picos) y, en específicas condiciones, es característico de cada analito, mientras que la altura y área de los picos individuales es proporcional a su concentración. (Skoog, 2007).

La separación, la identificación y la determinación de componentes estrechamente relacionados en mezclas complejas son realizadas por la cromatografía. Muchas de estas separaciones son imposibles por otros métodos.

En todas las separaciones cromatográficas, la muestra se disuelve con una fase móvil que se pasa a través de una fase estacionaria inmisible fija en una columna o superficie sólida. Con el flujo de la fase móvil, los componentes que están fuertemente retenidos por la fase estacionaria se mueven muy lentamente. Por el contrario, los componentes que están débilmente conectados a la fase estacionaria se mueven con rapidez. Debido a los diferentes tiempos de retención, los constituyentes de la mezcla a analizar se dividen en regiones o áreas separadas que se pueden estudiar de manera cualitativa y cuantitativa.

Figura 3
Sistema de un cromatógrafo gases

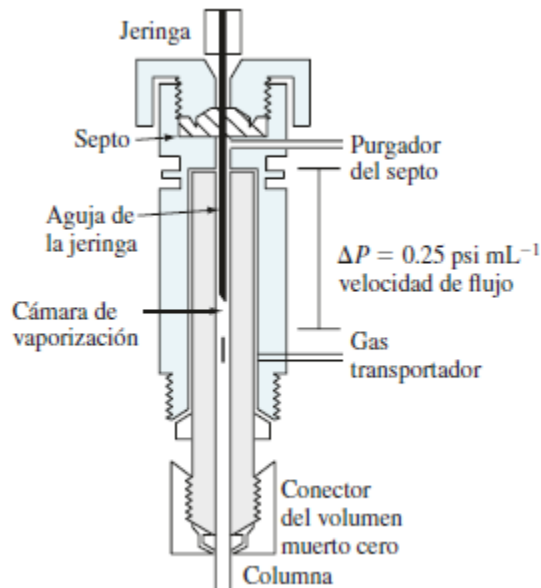


1.4.1 Sistema de inyección

Cada vez más investigadores están explorando las técnicas de inyección de grandes volúmenes representadas por (LVI) con el propósito de mejorar los análisis ya existentes en cromatografía de gas capilar. En el enfoque tradicional de la inyección, la mayoría de los inyectores y columnas solo tienen la capacidad de procesar uno o dos microlitros a la vez. Sin embargo, al intentar aumentar el volumen de inyección, se pueden presentar problemas como picos de analito ampliados y distorsionados, colas largas de picos de disolventes, así como detectores saturados o dañados. El interés en incrementar el volumen de inyección suele estar relacionado con la mejora del análisis de trazas. La constancia del ruido en la línea base conlleva a mayores alturas de picos, lo que resulta en relaciones señal/ruido más altas y límites de detección del sistema más bajos. Una ventaja adicional de la técnica LVI radica en su capacidad para disminuir la cantidad de muestra procesada inicialmente.

La muestra por analizar se introduce a través de este sistema. Es importante elegir un sistema que no solo sea física y químicamente inerte a la fase móvil y a la muestra, sino que también sea capaz de resistir presiones elevadas y la expansión de los gases (Technologies, GC inlet with temperature programming, large volume injection., large volume injection). Para este estudio se utilizará el equipo Agilent 7693A (AgilentTechnologies, 2010), un inyector automático de líquidos multimodo que facilita inyecciones precisas, rápidas, mayores volúmenes y confiables para los sistemas cromatógrafos de gases y cromatógrafos de gases acoplado a detector masas masas Agilent.

Figura 4
Sistema de inyección



1.4.2 Fase móvil (fuente de gas)

En la cromatografía de gases, los gases mas empleados son el helio y el hidrógeno. Estos gases, al ser inertes, no interfieren con el analito de interés. Sin embargo, el flujo del gas portador incide en los tiempos de retención, disminuyendo a medida que

aumenta dicho flujo. Dada su menor inflamabilidad en comparación con el hidrógeno, se prefiere el uso de helio.

1.4.3 Fase Estacionaria (Columna y horno)

La función principal del horno es mantener las temperaturas variables (con respecto al método empleado) en la columna para garantizar una repetibilidad excelente de los tiempos de retención. El cromatógrafo de gases que se utilizará posee un horno que garantiza que la temperatura en la columna permanezca estable.

La separación de los analitos depende mucho del tipo de columna. El tubo de la columna es de acero inoxidable y tiene una longitud de 5 a 60 m y un diámetro interno de 0,25 a 2 mm. La columna Agilent DB-5ms Ultra Inerte (Technologies, Agilent Technologies, s.f.), que está compuesta por fenilo al 5% y polidimetilsiloxano al 95%, es apropiada para la separación de dioxinas y furanos. Una de sus principales consideraciones es el bajo "sangrado"; tiene excelentes formas de picos y una buena relación señal-ruido, lo que lo hace muy específico para analitos difíciles como las dioxinas y furanos.

1.4.4 Detector de masas

Después de la separación de los analitos en la columna, estos analitos se identifican y cuantifican utilizando un detector apropiado. El espectrómetro de masas de triple cuadrupolo Agilent 7010B (MS-TQ Agilent 7010B) (Technologies, GC/MS Triple Quadrupolo 7010B, 7010B, 2020) será el detector seleccionado para la identificación de dioxinas y furanos ya que este detector presenta una alta sensibilidad y selectividad. Este detector puede llegar a niveles de picogramo (pg.) en modo de lectura de ionización electrónica (EI). Este sistema presenta una fuente de EI de alta eficiencia que genera

más iones que el modelo anterior de Agilent 7010A (Mamani, 2021), lo que lo convierte en el detector de masas triple cuadrupolo Agilent más sensible (Mamani, 2021).

Este sistema tiene tres modos de adquisición: MRM dinámico (dMRM), SCAN y SIM. El MRM dinámico es lo específico de este sistema porque es fácil de usar y eficiente al momento de realizar la desfragmentación.

1.4.5 Software de cuantificación

En este trabajo se utilizará el sistema MassHunter Agilent (Technologies, Analisis Cuantitativo MassHunter, Analisis Cuantitativo MassHunter, 2020), un software que organiza muestras y analitos en lotes para una revisión y análisis rápidos, para la identificación, cuantificación y posterior registro de datos.

1.5 Modos de Adquisición

1.5.1 Modo Scan

El modo Scan consiste en hacer barridos delimitando masas específicas para tener una información total del contenido del producto a ensayar. Es el modo para emplear en análisis cualitativo para la identificación de compuestos por búsqueda en biblioteca de espectros (Skoog, 2007). También puede utilizarse para análisis cuantitativos con la ayuda de bibliotecas que acompañan al software de trabajo.

- En modo SCAN el MSD es un detector universal con una sensibilidad media cuando se trabaja con el TIC, y muy selectivo y con buena sensibilidad cuando se trabaja con iones extraídos EIC (Extracted Ion Chromatogram).
- TIC (Total Ion Chromatogram): cromatograma correspondiente a la suma de abundancias a todas las masas adquiridas.

- EIC (Extracted Ion Chromatogram): cromatograma correspondiente a una determinada masa (extraída del barrido). La sensibilidad se incrementa con la reducción del rango de masas seleccionado.

1.5.2 Modo SIM

Consiste en una monitorización selectiva de iones característicos de los compuestos presentes en la muestra. En modo SIM el MSD es un detector muy sensible y selectivo. Es el modo a emplear para el análisis cuantitativo de trazas de compuestos conocidos. (Skoog, 2007).

- La comparación de las respuestas relativas de los distintos iones(calificadores), con respecto a las del patrón permite confirmar la identificación del compuesto analizado y cuantificado.
- La sensibilidad se incrementa con la reducción del número de masas seleccionado y la selectividad con el aumento de la masa monitorizada.
- La gran selectividad del MSD permite poder llegar a cuantificar compuestos que se coeluyan. La modalidad SIM con cuadrupolo proporciona, especialmente a nivel de trazas, una mejor reproducibilidad cuantitativa que el modo SCAN, no obstante, éste (scan) admite mayores concentraciones de analito (Skoog, 2007). En modo SIM el TIC es el cromatograma correspondiente a la suma de abundancias de todas las masas adquiridas. (Mamani, 2021).

1.5.3 Modo MRM

Este es uno de los métodos de adquisición de las corrientes iónicas más interesante, emblemático, ya que permite, convertirlo en un detector de masas de GC específico, sensible y selectivo. Infortunadamente, cuando la adquisición de la corriente iónica se

hace en el modo SIM, la probabilidad de que el ion seleccionado y una señal procedente del fondo (ruido químico) coincidan, no es nula; ello, baja no sólo la sensibilidad sino la confiabilidad de la detección (pueden presentarse falsos positivos o falsos negativos) (Mamani, 2021). Para evitar estos problemas, en vez de monitorear iones característicos, se registran las transiciones (o reacciones de transición) entre los pares de iones (precursor y producto). En el primer analizador MS1 (Q1) se filtran iones precursores seleccionados F1 (operación en modo SIM), mientras que en el segundo analizador MS2 (Q3) se dejan pasar solo iones-producto F2 de la transición o reacción de disociación. (Skoog, 2007).

1.6 VALIDACIÓN DEL METODO DE ENSAYO

Es un proceso mediante el cual se define requisitos analíticos, bajo ciertas consideraciones que aseguran que el método de ensayo ha desarrollado capacidades consistentes con la aplicación requerida. La validación de un método de ensayo establece, mediante estudios sistemáticos de laboratorio, que las características técnicas de dicho método cumplen las especificaciones relativas al uso previsto de los resultados analíticos. (NTP-ISO-5725-2, 2021).

1.6.1 Precisión

Es el grado de concordancia entre los resultados del ensayo obtenidos independientemente bajo condiciones estipuladas. (NTP-ISO-5725-1, 1999).

La medición de la precisión generalmente es expresada en términos de imprecisión o calculada como una desviación estándar de los resultados de ensayo. Una mayor desviación estándar refleja una menor precisión.

1.6.2 Veracidad

Es el grado de aproximación entre el valor promedio obtenido de una larga serie de resultados del ensayo y un valor de referencia aceptado (NTP-ISO-5725-1).

La medida de veracidad generalmente es expresada en términos de sesgo. La veracidad de un método está asociado a los errores sistemáticos de un método de ensayo.

1.6.3 Especificidad

La selectividad extrema o perfecta, en el sentido de que únicamente el analito es el responsable de la señal medida, se denomina especificidad. Así pues, la selectividad admite graduaciones (método poco selectivo, método muy selectivo), mientras que la especificidad no.

1.6.4 Selectividad

La selectividad analítica se relaciona con “el grado en el que un método puede ser utilizado para determinar analitos particulares en mezclas o matrices sin interferencias de otros componentes de comportamiento similar”.

1.6.5 Linealidad

Es la relación entre la concentración de analito y respuesta del método. Se define como la capacidad del método para obtener los resultados de la prueba proporcionales a la concentración del analito. Esta relación, denominada comúnmente curva patrón o curva de calibración, no tiene por qué ser lineal para que el método sea eficaz.

Cuando no sea posible la linealidad para un método, se deberá encontrar un algoritmo adecuado.

1.6.6 Límite de Detección

El límite de detección de un procedimiento analítico es la menor cantidad de un analito encontrado en la muestra que puede ser detectada pero no necesariamente cuantificada con un valor exacto. La concentración más baja del analito en una muestra que pueda

ser detectada, pero no necesariamente cuantificable bajo condiciones indicadas de la prueba. (Limit-Guidance, 1996).

1.6.7 Límite de Cuantificación:

Es la concentración mínima que puede determinarse con un nivel aceptable de veracidad y precisión. Se establece examinando una muestra o material de referencia apropiado. La concentración más baja de un analito que se puede determinar con aceptable precisión (repetibilidad) y veracidad bajo condiciones indicadas de la prueba. (Limit-Guidance, 1996).

1.6.8 Robustez

La robustez es la cualidad de un método analítico que mide su capacidad de resistir pequeños cambios en las condiciones operativas sin que su funcionamiento se vea alterado, se trata de identificar las variables que tienen un efecto más crítico sobre su exactitud, precisión, selectividad, etc. de modo que éstas serán las variables que habrá que controlar durante la aplicación rutinaria del mismo.

CAPÍTULO II. Planteamiento de la realidad, problemática y objetivos

2.1 Problemática de los residuos en Latino América

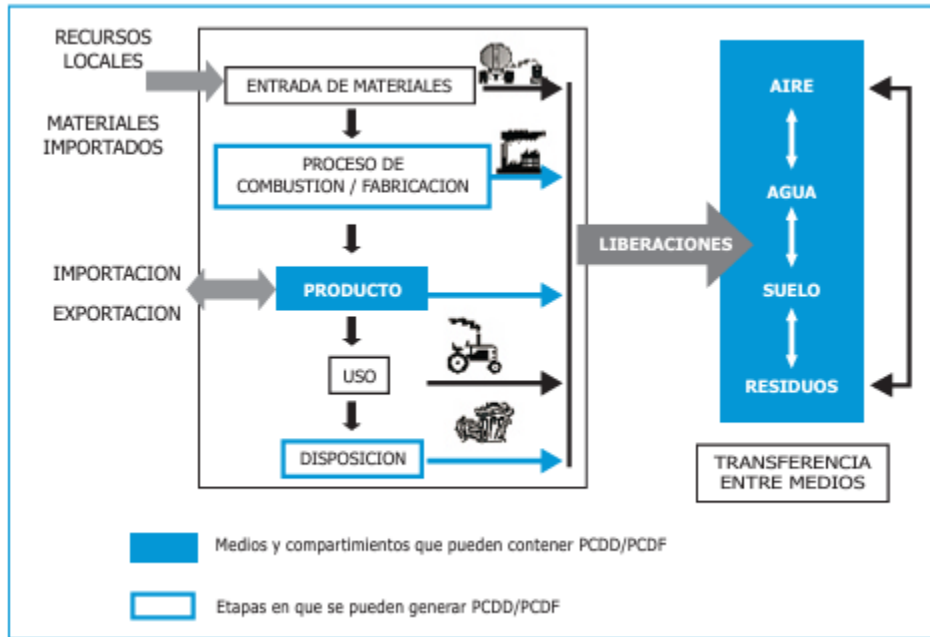
La generación de residuos ha aumentado considerablemente en las últimas décadas debido a los cambios que se han producido en la forma de vida de las sociedades más desarrolladas, que comportan la aparición constante de nuevas necesidades y como consecuencia un mayor consumo por parte de sus ciudadanos.

La contaminación por PCDD/PCDF puede ser mediante la ingestión de alimentos contaminados, inhalación de dichas sustancias en el aire, exposición ocupacional en industrias y en la manipulación de residuos peligrosos en donde se encuentran estas sustancias. Los efectos de esta contaminación ocasionan graves lesiones cutáneas como el cloracné, alteraciones de la función hepática y anomalías de los sistemas endocrino y nervioso entre otros.

Los PCDD/PCDF pueden ser liberados al medio ambiente a través de diversas vías de contaminación, tales como el aire, el agua (tanto dulce como marina, incluyendo estuarios, y posteriormente depositándose en sedimentos), el suelo y los residuos (que abarcan ciertos desechos líquidos, lodos y residuos sólidos, los cuales son gestionados como desechos o pueden ser sometidos a reciclaje). Productos (como formulaciones químicas o bienes de consumo como papel, textiles, etc.).

En la figura 5 se aprecia las posibles rutas de liberación de las dioxinas y furanos y las etapas de los procesos industriales o actividad donde podrían generarse. (PNUMA, 2006).

Figura 5
Vías de liberación de los PCDD/PCDF al ambiente



Durante el año 2003, las exportaciones y la inversión privada se destacaron como los principales impulsores del crecimiento económico. Las exportaciones mantuvieron un alto dinamismo, con un crecimiento del 5,8%, mientras que la inversión privada experimentó una recuperación con una expansión del 5,3%, aunque aún se encontraba por debajo de los niveles de la década de 1990.

La poco dinámica evolución de los ingresos laborales ha provocado una disminución en la tasa de crecimiento del consumo privado, la cual se sitúa en un 3,2%. En este contexto, el crédito al consumo ha sido el principal medio de financiamiento del consumo privado, beneficiado por las bajas tasas de interés. Durante el año 2003, la mayoría de los sectores económicos experimentaron una reducción en su tasa de crecimiento, aunque hubo rubros que mantuvieron un notable dinamismo, destacándose la minería metálica con incrementos en la producción de oro, plata, hierro y zinc. Para el año 2004, se proyectó que el inicio de la

explotación del campo de gas natural Camisea contribuirá a revertir la disminución en la producción de hidrocarburos que se inició en la década de los noventa.

En el año 2003, el sector de la construcción experimentó un notable incremento, atribuible en parte a los programas de vivienda dirigidos a familias con ingresos bajos y medios. No obstante, las restricciones en la inversión pública han obstaculizado su expansión adicional.

En el año 2003, la industria manufacturera experimentó un leve crecimiento del 2,6%, impulsado principalmente por el aumento del 3,7% en el sector no primario. Entre las ramas que contribuyeron al crecimiento se encuentran las Actividades de impresión, con una variación del 11,9%; la fabricación de vehículos automotores, con un 10,8%; la fabricación de otros productos de metal (planchas de hierro, discos y bobinas de acero), con un 9,7%; los minerales no metálicos, especialmente la cerámica, que crecieron un 7,3%; y la fabricación de productos textiles, que aumentó un 5,2%. Por otro lado, se observaron áreas con variaciones negativas, como la Fabricación de instrumentos médicos, con un -88%; la elaboración de productos de tabaco, con un -28%; la curtiduría, con un -19%; la fabricación de maquinaria, con un -17%; la producción de madera, con un -9%; y la producción de cables de energía, con un -6%.

El desarrollo de las actividades del sector primario ha sido mayormente desfavorable. Las áreas que han mostrado un comportamiento positivo en su variación incluyen la producción de alimentos, que ha aumentado en un 3,6% debido a la elaboración de productos cárnicos y embutidos, así como la producción de azúcar, que ha crecido un 9,2% debido al aumento en el área sembrada. En menor medida, se observa un incremento del 0,6% en la fabricación de productos metálicos no ferrosos, como resultado del aumento en la producción de zinc, arsénico y cadmio por parte de la Refinería de Zinc de Cajamarquilla. Por otro lado, la tendencia decreciente en el sector primario se atribuye a la variación negativa en la elaboración de harina, aceite y conservas de pescado, con una disminución del 13% debido

a la escasez de materia prima, y en la refinación de petróleo, que ha descendido un 2,2% por la menor producción de gasolina, queroseno y aceites lubricantes de empresas como PETROPERÚ, Conchán, Texaco y La Pampilla. (PNUMA, 2006)

2.2 Respuesta de la OMS

En 2015, la OMS publicó por vez primera estimaciones de la carga mundial de enfermedades transmitidas por los alimentos, en las que se observó que la exposición a las dioxinas aumentaba considerablemente la prevalencia de estas enfermedades y afectaba sobre todo a la fecundidad y la función tiroidea. (Organización Mundial de la Salud, 2024).

La Organización Mundial de la Salud ha organizado diversas reuniones de especialistas con el objetivo de establecer los niveles de ingesta tolerable de dioxinas. En el año 2001, el Comité Mixto de Expertos en Aditivos Alimentarios de la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO/OMS) realizó una evaluación detallada sobre los riesgos asociados a las PCDD, los PCDF y los PCB análogos a las dioxinas. En colaboración con la FAO, la OMS publicó a través de la Comisión del Codex Alimentarius un Código de prácticas destinado a prevenir y reducir la contaminación de alimentos y piensos con dioxinas y bifenilos policlorados análogos a las dioxinas. (Dioxinas, 2023).

Este documento ofrece orientación a las autoridades nacionales y regionales sobre las medidas preventivas. La Organización Mundial de la Salud (OMS) ha establecido y revisado de forma regular en reuniones consultivas de expertos los factores de equivalencia tóxica de las dioxinas y sustancias relacionadas en humanos, mamíferos, aves y peces. Los valores más recientes fueron determinados en el año 2020. (Luengo, 2020).

2.3 OBJETIVOS

2.3.1 Generales

- Analizar y validar un nuevo método para la determinación de dioxinas y furanos en matriz de alimento como es la harina de pescado en un equipo de Cromatografía de gases acoplado a un detector espectrómetro de masas triple cuadrupolo.

2.3.2 Específicos

- i. Acondicionar el equipo de cromatografía de gases acoplado a un detector espectrómetro de masas triple cuadrupolo, con parámetros específicos del inyector, horno y detector.
- ii. Realizar la extracción de los analitos en las condiciones óptimas, usando el equipo Soxhlet (tratamiento de la matriz) y realizar las lecturas de las muestras obtenidas.
- iii. Determinar los parámetros de validación para el desarrollo de la metodología (precisión, veracidad, selectividad, linealidad, límite de detección, límite de cuantificación, robustez y rango de trabajo).
- iv. Verificar los resultados obtenidos con los controles establecidos (blanco, muestra control y duplicado de muestra)
- v. Verificar los valores reportables como suma de dioxinas PCCD y PCCDF expresada en unidades EQT.

CAPÍTULO III. Metodología, descripción de la función desarrollada

3.1 Matriz, equipamiento, materiales y reactivos

3.1.1 Matriz

- Harina de pescado (muestras ingresadas por los clientes)

3.1.2 Equipos

- Cromatógrafo Gaseoso Agilent 7890 B equipado con Detector de Masa Agilent 7010
MSD Autosampler Agilent 7693
- Columna Agilent DB-5ms UI
- Balanza analítica, mínima división 0,0001g (Mettler Toledo, XS205DU)
- Agitador Vórtex (Fisher Scientific, 945094).
- Centrifuga digital. (Hettich, Rotanda 460R)
- Evaporadores de nitrógeno (Organomation, N-EVAP)
- Sonicador Branson
- Equipo Soxleth
- Rota Vapor (Buchi, R-215)
- Bomba de vacío (Sartorius Stedim)
- Plancha de calentamiento (Tecnal, TE-0854)

3.1.3 Materiales

- Matraz Kitasato
- Tubos del evaporador, punto final aproximadamente 0,5 mL
- Pipeta Pasteur, vidrio de boro silicato, aprox. longitud 150 mm
- Matraz volumétrico de Vidrio de boro silicato de 100 mL
- Frascos de vidrio de boro silicato de 250 mL
- Probeta de 25 mL
- Matraz volumétrico de vidrio de boro silicato de 25 mL
- Inserto de 150 µL.
- Dedales de extracción
- Perlas de ebullición
- Matraz de fondo plano de vidrio de borosilicato de 250 mL 500 mL, 1 000 mL

- Embudo, estándar, 150 mm, 80 mm de diámetro, vidrio de borosilicato
- Matraces aforados de 5 mL, 10 mL, 25 mL, 50mL, 100mL y 500mL
- Micropipeta de 0,05-05 mL y puntas desechables (sin punto)
- Micropipeta de 0,5-5 mL y puntas descartables
- Micropipeta de 10-100 μ L y puntas descartables
- Micropipeta de 100-1000 μ L y puntas descartables
- Tubos de propileno para uso en centrifuga descartables de 50 mL y 15 mL
- Vaso de 100 mL
- Frasco de vidrio de 1L
- Columnas de separación cromatografías de material de vidrio
- Insertos de 150 μ L
- Viales Agilent 2 mL
- Lana de vidrio

3.1.4 Reactivos

3.1.4.1 Soluciones estándar

- Soluciones de calibración de PCDD/F (AccuStandard, 98.7 %)
- ¹³C-Solucion estándar interno de PCDD/F
- Estándar de Recuperación de PCCD/F (1,2,3,4 ¹³C-TCDD)

3.1.4.2 Reactivos para análisis

- Diclorometano, grado cromatográfico ($\geq 99,8$ %). (corregir espacio y punto por coma)
- Tolueno, grado cromatográfico ($\geq 99,9$ %)
- Etanol, grado cromatográfico ($\geq 99,5$ %)
- N-hexano, grado cromatográfico (≥ 98 %)
- Sulfato de sodio anhidro.
- Alúmina – básica (35-75 μ m)
- Harina de pescado patrón, previamente evaluada y que no contenga Dioxinas y Furanos
- Sílica gel grado de alta pureza ,100-200 mesh
- Sílica gel.

- KOH grado reactivo
- Ácido sulfúrico, H₂SO₄, 96 %

3.2 Condiciones de Instrumentación

3.2.1 Condiciones de Cromatógrafo de gases

Columna	Agilent DB-5 MS UI 60m x 250um x 0,25µm
Volumen de inyección	5 µL, inyector multimodo
Gas portador	Helio
Modo de gas portador	Flujo constante
Flujo	0,96 mL min ⁻¹
Programa de Horno	120 °C (5 minutos) 25 °C min ⁻¹ a 250 °C (5 minutos) 2,6 °C min ⁻¹ a 300 °C (17,5 minutos)
Tiempo total de corrida	29,5 minutos

3.2.2 Condiciones del detector

Modo de operación	Ionización de electrones (EI), reacción múltiple (MRM)
Temperatura de la línea de transferencia	300 °C
Temperatura de fuente	300 °C
Temperatura de cuadrupolo	150 °C

3.3 PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

3.3.1 Preparación del estándar interno y estándar de recuperación.

- Preparar la solución Stock según la tabla N°1 a partir de los estándares de PCDD/F cuyas concentraciones finales de cada una se muestran en la tabla en mención, esta preparación se realiza con tolueno.
- La solución de estándar interna para la curva de calibración contiene una concentración de 100 µg L⁻¹ de ¹³C-PCDD/F en Tolueno.

- Solución de recuperación de ^{13}C -PCDD/F $100 \mu\text{g L}^{-1}$ en tolueno.

Tabla 1

Preparación de la solución stock para los estándares PCDD/F

Estándares	Concentración inicial ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Dilución (X)	Solución Stock C ($\mu\text{g L}^{-1}$)
2378 TCDD	50 000	1 000	50
12378 PeCDD	50 000	1 000	50
123478 HxCDD	50 000	500	100
123678 HxCDD	50 000	500	100
123789 HxCDD	50 000	500	100
1234678 HpCDD	50 000	250	200
OCDD	50 000	250	200
2378 TCDF	50 000	500	100
12378 PeCDF	5 000	50	100
23478 PeCDF	5 000	50	100
123478 HxCDF	5 000	50	100
123678 HxCDF	50 000	500	100
123789 HxCDF	50 000	500	100
234678 HxCDF	50 000	500	100
1234678 HpCDF	50 000	500	100
1234789 HpCDF	50 000	500	100
OCDF	50 000	500	100

3.3.2 Preparación de estándares para los límites de detección y cuantificación

- Añadir $100 \mu\text{L}$ de Solución de estándar interno de $100 \mu\text{g L}^{-1}$ en siete liner numerados del 1 al 7.
- Añadir $5 \mu\text{L}$ de la solución stock en los viales numerados anteriormente.
- Diluir el contenido de los tubos con $895 \mu\text{L}$ de diclorometano, hasta alcanzar un volumen final de 1mL .
- Llevar los tubos preparados a lectura en el cromatógrafo de gases GC/MSMS.

3.3.3 Preparación de la curva de calibración para las dioxinas y furanos

- Añadir $10, 20, 40, 60, 80, 100 \mu\text{L}$ del estándar de PCDD/F de la solución stock, en los tubos codificados del 1 al 6 respectivamente.
- Añadir $100 \mu\text{L}$ de la solución del estándar interno ^{13}C -PCDD/F en los viales ámbar de

2 mL rotulados 1, 2, 3, 4, 5 y 6.

- Añadir 10, 20, 40, 60, 80, 100 μL del estándar de PCDD/F de recuperación, en los tubos codificados del 1 al 6 respectivamente.
- Completar con tolueno hasta un volumen final de 1 mL, ver preparación en la tabla N°2.
- Llevar los viales preparados a lectura en el cromatógrafo de gases (GC-MS/MS).

Tabla 2

Preparación para la curva de calibración de dioxinas y furanos

Tubo	Alícuota de Solución Stock (μL)	Alícuota de Solución de PCDD/F estándar interno (μL)	Alícuota de Solución PCDD/F estándar de recuperación (μL)	Diclorometano (μL)
1	10	100	10	880
2	20	100	20	860
3	40	100	40	820
4	60	100	60	780
5	80	100	80	740
6	100	100	100	700

3.3.4 PREPARACION DE LA MUESTRA

3.3.4.1 Pesaje:

- **BLANCO DE PROCESO:** Pesar entre 39,5 y 40,5 g de harina de pescado libre de los analitos en un dedal de extracción.
- **MUESTRAS:** Pesar 39,5 y 40,5 g de cada harina de pescado en el dedal de extracción a analizar. Por lote de 20 muestras pesar una muestra por duplicado.
- **PATRÓN DE TRABAJO (LCS):** Pesar de 39,5 a 40,5 g harina de pescado libre de PCDD/F, en el dedal de extracción.

3.3.4.2 Adición del estándar interno de PCDD/F.

- Fortificar a las muestras libre de contaminantes con 100 μL de estándar interno en el dedal de extracción al blanco de muestra, muestra, duplicado de muestra y patrón de trabajo.

- Añadir 40 µL de Solución Stock de PCDD/F al dedal de extracción que contiene el patrón de trabajo (LCS), según la norma (I.S. EN-16215:2020 y EPA METHOD 8290).

3.3.4.3 Primera etapa: EXTRACCIÓN POR SOXHLET

3.3.4.3.1 Primera Extracción

- Lavar el equipo de extractor Soxhlet incluyendo los matraces de fondo redondo (RBF) con tolueno y posteriormente con solvente diclorometano. Encienda el sistema de enfriamiento dejando enfriar el sistema.
- Colocar la muestra en el dedal de extracción y coloque los dedales tapados con lana de vidrio (previamente lavados) en el extractor Soxhlet.
- Agregar 200 mL de tolueno en el matraz de fono redondo y adicione de 3 a 6 perlas de ebullición y colóquelo el extractor Soxhlet en la plancha de calentamiento.
- Conectar todos los extractores Soxhlet, incluido el condensador y verifique que todo este sellado.
- Configurar los equipos Soxleth a un periodo de 5 a 7 ciclos por hora. Deje el Soxleth extrayendo por 4 h.
- Apagar las planchas de calentamiento y permita que el aparato enfríe. Retire el RBF que contiene tolueno del aparato Soxhlet.
- Recolectar el solvente en un matraz de 1 L.

3.3.4.3.2 Segunda Extracción

- Agregar 200 mL de tolueno/etanol (9:1 v/v) a un nuevo RBF y colóquelo en la plancha de calentamiento.
- Conectar todos los equipos Soxhlet, incluido el condensador verificando de que no haya fugas.
- Configurar el Soxhlet a un periodo de 5 a 7 ciclos por hora. Deje el Soxhlet extrayendo por 16 hasta 20 horas.
- Apagar las planchas de calentamiento y permita que el aparato se enfríe.
- Retirar el RBF y combine ambos extractos (el extracto de tolueno y el extracto de tolueno/etanol).
- Filtrar el extracto de Soxhlet a través de un embudo equipado con un tapón de lana de vidrio y 5 g de sulfato de sodio anhidro, para evitar partículas de harina

de pescado.

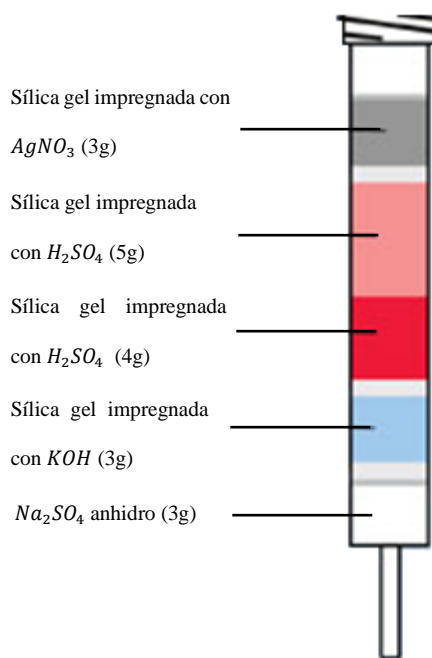
3.3.4.3.3 Concentración

- Concentrar el filtrado utilizando un evaporador hasta que el disolvente se haya evaporado (aproximadamente 0,5 mL).
- Tomar el extracto del evaporador y colóquelo en un matraz volumétrico de 25 mL. Lave el tubo del evaporador 5 veces con 4 mL de n-hexano cada vez (es decir, 20 mL en total).
- Se agregará n-hexano al matraz volumétrico que contiene el extracto de muestra, hasta completar los 25 mL. Luego homogenizar.

3.3.4.4 Segunda Etapa: Limpieza - Uso de la columna sílica mixta

En la columna de sílica gel coloque de abajo hacia arriba sulfato de sodio anhidro, sílica gel impregnada con hidróxido de potasio, sílica gel impregnada con ácido sulfúrico y sílica gel impregnada con nitrato de plata (ver figura 6). (UNE-EN-16215, 2020).

Figura 6.
Columna preparada de sílica mixta



*capas separadas por 0,9 g de sílica gel

- Transferir el extracto obtenido en el frasco de vidrio de 25 mL en un matraz de 1 L, agregue entre 70 y 90 ml de n-hexano.
- Adicionar 5 g de la mezcla de ácido sulfúrico / sílica, al matraz, usando un embudo pequeño y agitando durante la adición.
- Transferir cuantitativamente la suspensión a la columna de sílice mixta, lavando el matraz 3 veces con de 10 mL de n-hexano.
- Permitir que la muestra drene a través de la columna y recíbala en un frasco de 1 L a la salida de cada aparato.
- Una vez haya eludido los primeros 100 mL, agregue 100 mL de diclorometano / hexano (3:7 v/v) a la columna de extracción. Reciba el solvente en la misma botella de 1 L.
- Una vez que todo haya eludido, a través de la columna, lave la pared interna con 50 mL de n-hexano empleando un cilindro de medición de 100 mL.
- Recoger el n-hexano adicional en la misma botella.

3.3.4.5 Limpieza con columna de carbón

La columna de carbono activado AX-21 es aplicada como columna cromatográfica de adsorción, la cual es recomendada por la normalización española UNE-EN 16215:2020 para la separación de dioxinas y furanos planas, así como eliminar PCB no planas y otros interferentes. Esta columna se lava con metanol, se seca a 130 °C durante 72 h. La mezcla se prepara en porciones de masa de 2/23, carbono/Celite. (UNE-EN-16215, 2020)

Figura 7
Columna de carbón activado AX-21



Se realizó la limpieza siguiendo los siguientes pasos:

- El extracto colectado anteriormente se hace pasar por la columna de carbón, lavando con 10 mL de tolueno.
- Concentrar la muestra a sequedad en el rotavapor.
- Reconstituir el extracto a un volumen de 80 μ L y lavar sucesivas veces con 30 μ L de tolueno, colocar este volumen dentro del injerto de 150 μ L.
- Ingresar el injerto en el evaporador hasta llevarlo a sequedad a una temperatura de 40 °C, reconstruirlo a un volumen final de 20 μ L, este volumen final tendrá los analitos de PCDD/F el cual se lleva a lectura en el cromatógrafo de gases.

3.3.4.6 Lectura de muestras

- Se coloca en un liner los 20 μ L de la muestra obtenida para ser leída en el equipo cromatógrafo de gases acoplado a masas.
- Se repite el procedimiento 3.3.4 para todas las muestras blanco, duplicado de muestras, muestra control LCS.

3.4 Cálculo y expresión de resultados de validación

3.4.1 Cálculo de concentración en Equivalentes Toxicológico

Cálculo de factor de respuesta para los compuestos naturales:

$$C_{PCDD/F} \left(\frac{pg}{g} \right) = \frac{(Lectura) \times (Volumen Final) \times (Dilucion)}{Peso de muestra} \dots \dots \dots (1)$$

Lectura = Concentración de lectura de PCDD/F ($\mu\text{g mL}^{-1}$)

Dilución = Factor de dilución (sin unidades).

Volumen final = microlitros (μL)

Peso de la muestra: gramos (g)

3.4.2 Cálculo de los valores de Equivalentes Toxicológicos (TEQ)

Para realizar este cálculo se necesita los valores de los Factores Toxicológicos Equivalentes (TEF) que se muestran en el anexo N°3, estos valores se multiplican con los valores de concentración de los congéneres respectivos.

$$TEQ_{\left(\frac{pg}{g}\right)} = \sum_{i=1}^n (TEF)_i \times \left(C_{\frac{PCDD}{F}} \left(\frac{pg}{g}\right) \right)_i \quad (2)$$

Donde:

$TEQ_{\left(\frac{pg}{g}\right)}$ es el Equivalente Toxicológico

$(TEF)_i$ es el valor de TEF de compuesto i (tabla #)

3.4.3 Cálculo del porcentaje de recuperación de los estándares internos

Cálculo del factor de respuesta de los estándares de internos:

$$RRF_{(I)} = \frac{A_{is} \times Q_{rs}}{Q_{is} \times A_{rs}} \quad (3)$$

Donde

A_{is} es la respuesta (suma de 2 transiciones MRM) del correspondiente estándar interno;

A_{rs} es la respuesta (suma de 2 transiciones MRM) del estándar de recuperación;

Q_{is} es la concentración del estándar interno $\text{pg } \mu\text{L}^{-1}$;

Q_{rs} es la concentración del estándar de recuperación $\text{pg } \mu\text{L}^{-1}$;

El factor de respuesta relativa promedio es calculado para los compuestos marcados isotópicamente:

$$\overline{RRF}_{(l)} = \frac{1}{m} \times \sum_{i=1}^m RRF_{(i)} (l) \quad (3)$$

Donde:

M es el número de estándares (niveles de curva)

l es el compuesto marcado isotópicamente

i es el nivel de calibración

Cálculo del porcentaje de recuperación:

$$percentage\ recovery(\%) = \frac{A_{is} \times Q_{rs}}{Q_{is} \times A_{rs} \times \overline{RRF}_{(m)}} \quad (4)$$

Donde

A_{is} es la respuesta (suma de 2 transiciones MRM) del correspondiente estándar interno;

A_{rs} es la respuesta (suma de 2 transiciones MRM) del estándar de recuperación;

Q_{is} es la concentración del estándar interno $\text{pg } \mu\text{L}^{-1}$;

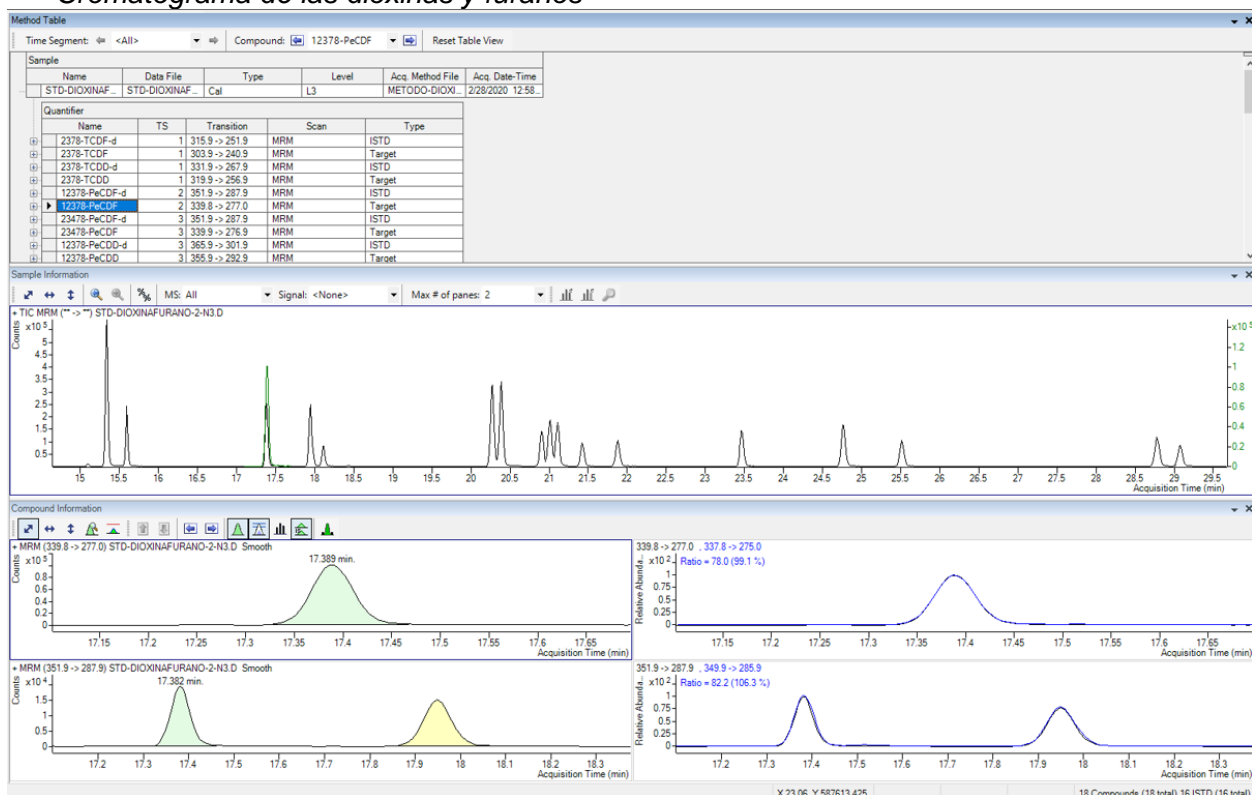
Q_{rs} es la concentración del estándar de recuperación $\text{pg } \mu\text{L}^{-1}$;

$\overline{RRF}_{(m)}$ es el factor de respuesta relativa promedio

3.5 Parámetros de Validación para el ensayo de PCDD/F en muestras de Harina de pescado

A continuación, se muestra el cromatograma de las dioxinas y furanos, así como sus tiempos de retención.

Figura 8
Cromatograma de las dioxinas y furanos



3.5.1 Precisión

Para este parámetro se realizaron 21 corridas con tres analistas diferentes a un nivel de 0.75 pg g^{-1} . Se evaluó la precisión en base a estimadores estadísticos como: Prueba Normalidad (Anderson Darling), Prueba de Homogeneidad (Barlett) y los atípicos gráficos h-Mandel, k-Mandel, y los estadísticos Cochran, G-Grubbs, todo esto mediante los criterios de aceptación del Reglamento UE 2017/664 Comisión Europea. (Union Europea 2017/644, 2017).

Tabla 3*Resultados del estudio de precisión para el 2378-TCDD*

Parámetros de precisión	
Promedio.	0,76
S _r	0,01
S _R	0,01
RSD _r	1,42
RSD _R	1,53
r	0,03
R	0,03
LIMITE RSD _r (%)	3,99
LIMITE RSD _R (%)	4,30
%Recuperación	101,37

La matriz cumple los diferentes niveles evaluados con un criterio de aceptación para RSD_R ≤25 %.

3.5.2 Veracidad

Para evaluar este parámetro se realizó a partir de la contaminación con el estándar a tres niveles diferentes (ver tabla 4), lo cual debe ser muy exacta y precisa, para la obtención de los resultados esperados. Las muestras fueron estudiadas anteriormente sin tener contenido alguno de los compuestos estudiados.

Se muestra a continuación los resultados obtenidos

Tabla 4*Porcentajes de recuperación del estudio de veracidad por adición para 2378-TCDD*

Concentración inicial de muestra	0 pg g ⁻¹	0 pg g ⁻¹	0 pg g ⁻¹
NIVELES	NIVEL I	NIVEL II	NIVEL III
Concentración Adicionada pg g ⁻¹	0,75	3,00	7,50
	0,75	2,95	7,46
	0,74	3,01	7,62
Resultados de la Adición pg g ⁻¹	0,76	2,93	7,69
	0,75	3,02	7,49
	0,75	2,95	7,42
	0,74	3,02	7,50
	0,75	2,98	7,61

Diferencia del valor final (concentración adicionada) con respecto a la concentración inicial pg g ⁻¹	0,75 0,74 0,76 0,75 0,75 0,74	2,95 3,01 2,93 3,02 2,95 3,02	7,46 7,62 7,69 7,49 7,42 7,50
	100,94 98,97 102,30	98,46 100,59 97,87	99,53 101,65 102,55
% Recuperación	100,05 100,93 99,99 100,04	100,75 98,56 100,70 99,41	99,88 98,95 100,08 101,59
Val Min (%)	99,00	98,00	99,00
Val Max (%)	102,00	101,00	103,00

El criterio de aceptación es de 60 – 120 % de recuperación de acuerdo con el Reglamento UE 2017/644 Comisión Europea. Siendo los resultados favorables en los tres niveles estudiados.

Se muestran el estudio estadístico mediante un análisis de varianza de un factor (anova), a los porcentajes de recuperación calculados. En donde se plantea la siguiente hipótesis:

Ho: Si $F_{crit} > F_{cal}$ no existe diferencia significativa en la recuperación.

Ha: Si $F_{crit} \leq F_{cal}$ existe diferencia significativa en la recuperación.

Tabla 5
Análisis de varianza de los datos de veracidad

RESUMEN

Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
Columna 1	7	703,22	100,46	1,10
Columna 2	7	696,32	99,47	1,47
Columna 3	7	704,22	100,60	1,76

ANÁLISIS DE VARIANZA

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre grupos	5,28	2	2,64	1,82	0,18	3,55
Dentro de los grupos	26,01	18	1,44			

En donde del análisis de varianza se obtiene un F-calculado de 1,828 y un F-tabla de 3,55 (resultados obtenidos en la tabla 5), por lo que se puede concluir que no existe diferencia significativa en la recuperación, por lo que se concluye que el método es veraz.

3.5.3 Selectividad

La evaluación de la Selectividad para cada analito estudiado tanto de dioxinas y furanos se realizó según los criterios del REGLAMENTO (UE) 2017/644 DE LA COMISIÓN de 5 de abril de 2017. (Union Europea 2017/644, 2017)

Se debe distinguir entre varios congéneres, en particular entre los tóxicos (por ejemplo, los diecisiete PCDD/PCDF sustituidos en las posiciones 2, 3, 7 y 8 y doce PCB similares a las dioxinas) y otros congéneres.

Para los métodos de GC-MSMS se debe controlar al menos 2 iones precursores específicos, cada uno con un ion de transición correspondiente específico producido para todos los analitos marcados y no marcados en el ámbito de aplicación de los análisis.

Tolerancia máxima permitida de las intensidades relativas del ion de $\pm 15\%$ para iones de transición seleccionados producidos en comparación con los valores calculados o medidos (promedio de los patrones de calibración), en condiciones idénticas de MS/MS, en particular energía de colisión y presión del gas de colisión, para cada transición de un analito.

Por ello se evaluó las transiciones de ion precursor a ion producto del analito correspondiente, por medio de la relación entre las transiciones de cuantificación y calificación de las muestras fortificadas respecto al de las obtenidas de la curva de calibración (ver tabla 6).

En la siguiente tabla se muestra la relación de las transiciones de calificación / cuantificación promedio a partir de la curva de calibración para los analitos

Tabla 6
Relación de transiciones calificación/cuantificación a partir de la curva de calibración para 2378-TCDD

Nombre	Transición		
2,3,7,8-TCDD	Cuantificación 319,9 → 256,9		Calificación 321,9 → 258,9
Curva de calibración	Área Transición de cuantificación (319.9 → 256.9)	Área Transición de calificación (321.9 -> 258.9)	Ratio Calificación/Cuantificación
L1	71438	55769	78,1
L2	144112	94411	65,5
L3	226336	210839	93,2
L4	405368	314580	77,6
L5	481976	357427	74,2
L6	596806	443734	74,4
Promedio			77.1
Desv. Est.			8.260

En la tabla 7 se muestra la evaluación de la relación de las transiciones de calificación / cuantificación de las muestras fortificadas a una concentración de 2 pg g⁻¹:

Tabla 7
Evaluación de la relación de transiciones calificación/cuantificación para 2378-TCDD

Muestra	Área transición de cuantificación (319,9 → 256,9)	Área transición de calificación (321,9 → 258,9)	Ratio Calificación / Cuantificación	Tolerancia respecto al ratio promedio <15%	Conformidad
Concentración Adicionada 2 (pg g ⁻¹)					
STD-DF-N2-1	437368	357717	81,8	-6%	Cumple
STD-DF-N2-2	328014	270240	82,4	-7%	Cumple
STD-DF-N2-3	400730	330813	82,6	-7%	Cumple
STD-DF-N2-4	480856	413087	85,9	-11%	Cumple
STD-DF-N2-5	409030	355213	86,8	-13%	Cumple
STD-DF-N2-6	427639	348227	81,4	-6%	Cumple
STD-DF-N2-7	464341	398532	85,8	-11%	Cumple

De ello se demuestra que la matriz no afecta a la identificación del analito ya que la relación entre la transición de calificación y cuantificación está dentro de la tolerancia requerida, concluyéndose que el método es selectivo.

3.5.4 Linealidad / Sensibilidad

La linealidad es la capacidad de un método de análisis para producir resultados que son directamente o por una transformación matemática definida, proporcionales a la concentración del compuesto en estudio, dentro de un intervalo de concentraciones establecidas. (Eurolab, 2016)

La evaluación de la linealidad del método se realizó mediante la preparación de curvas de calibración. Para este trabajo se han realizado tres curvas de calibración de 6 niveles cada uno.

Se considera el siguiente modelo estadístico:

$$Y = \alpha + \beta X + \varepsilon$$

Donde:

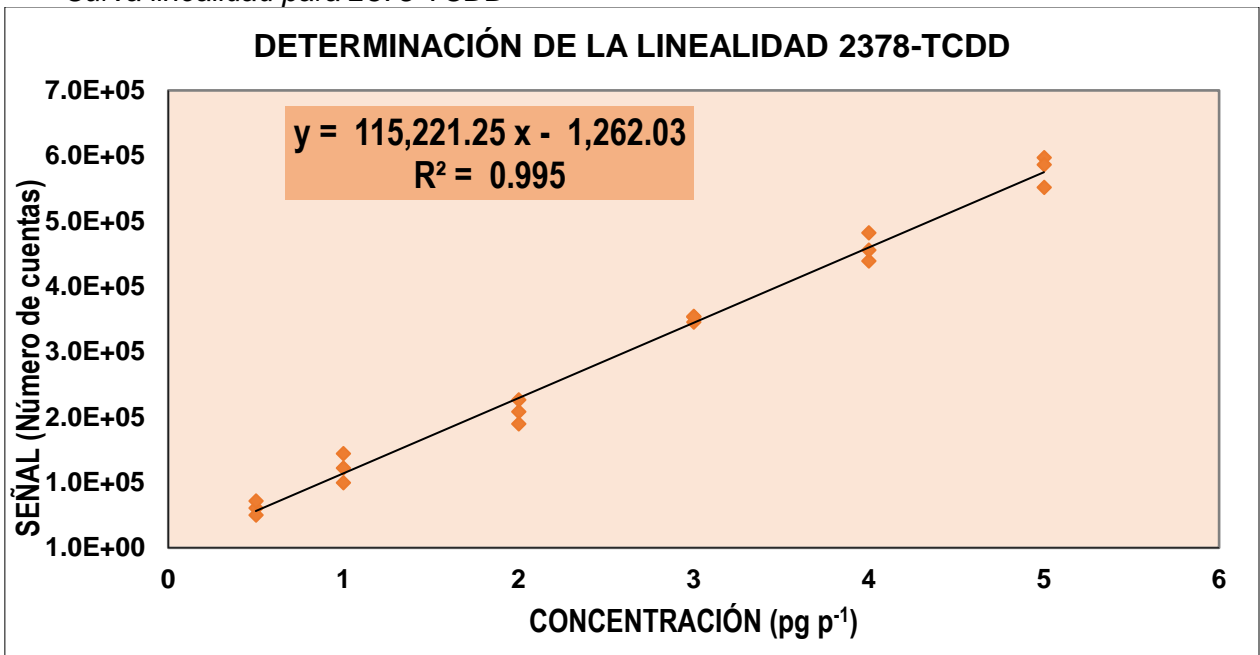
α : intercepto

β : pendiente

ε : efecto aleatorio del error

Antes de evaluar estadísticamente la linealidad se realizó una evaluación gráfica de la linealidad de las curvas de calibración aceptando las que tengan un coeficiente de correlación mayor o igual a 0,995 (ver figura 9).

Figura 9
Curva linealidad para 2378-TCDD



El estadístico aplicado es el de regresión lineal con los criterios de aceptación establecidos por el laboratorio de ensayo $r, r^2 \geq 0,995 / RSD \leq 20\%$

Las pruebas estadísticas para la pendiente, intercepto y coeficiente de relación, se obtuvieron los siguientes resultados con el estudio realizado anteriormente.

Tabla 8

Desarrollo de las pruebas estadísticas para la pendiente, intercepto y coeficiente de correlación

1. PRUEBA DE HIPOTESIS DE LA PENDIENTE: Ho: $b=0$ Ha: $b \neq 0$		2. PRUEBA DE HIPOTESIS DEL INTERCEPTO Ho: Intercepto incluye el cero Ha: Intercepto no incluye el cero		3. PRUEBA DE HIPOTESIS DEL COEFICIENTE DE CORRELACION Ho: $r = 0$ Ha: $r \neq 0$	
t calculado > t tablas		t calculado < t tablas		t calculado > t tablas	
(Para G.L.: N-2)		(Para G.L.: N-2)		(Para G.L.: N-2)	
S_b	4857,03	S_a	14738,78	S_r	0,043
t_{b cal}	22,48	t_{a cal}	0,47	t_{r cal}	22,48
Intervalo de Confianza	$b \pm t^*s_b$	Intervalo de Confianza	$a \pm t^*s_a$	a	0,001
t tablas	2,11	t tablas	2,11	t tablas	2,11
IC SUP	119508,54	IC SUP	38284,09		
IC INF	98915,68	IC INF	-24205,42		
CUMPLE		CUMPLE		CUMPLE	

Se realizó la prueba de hipótesis para demostrar el desvío de la linealidad y regresión.

Regresión $F \text{ calculado} > F \text{ tablas}$

Linealidad $F \text{ calculado} < F \text{ tablas}$

De la prueba de Fisher y haciendo uso del minitab se obtiene los siguientes resultados.

Ecuación de regresión

$$Y = 111385 + 5313 X$$

Coeficientes

Término	Coef	EE del coef.	Valor T	Valor p	FIV
Constante	-1262	8522	-0,15	0,88	
C1	115221	2808	41,03	0,00	1,00

Resumen del modelo

S	R-cuadrado	R-cuadrado(ajustado)
32807,5	99,66%	99,65%

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Regresión	1	5,44E+11	5,44E+11	505,59	0.000
Error	16	17221279387	1076329962		
Falta de ajuste	4	2240188547	560047137	0,45	0,323
Error puro	12	14981090840	124824237		
Total	17	5,61E+11			

Tabla 9

Análisis de varianza de linealidad para el analito 2378-TCDD

Significancia	GL	SC	MC	Fc	Ftablas	Significancia
Regresión	1	5,44E+11	5,44E+11	505,59	4,74	ES SIGNIFICATIVO
Error Residual	16	17221279387	1076329962			
Falta de ajuste	4	2240188547	560047137	0,45	3,25	SIGNIFICATIVO
Error puro	12	14981090840	124824237			
Total	17	5,61E+11				

Se rechaza la hipótesis planteada y se concluye para un nivel de significancia de 0,05 (95%)

Existe una gran regresión significativa entre X e Y

La falta de ajuste es no significativa por lo tanto presenta linealidad

3.5.5 Límite de Detección y cuantificación

Para el cálculo de estos parámetros se realizó adiciones a blancos, donde se evaluó la concentración de 0,24 pg uL⁻¹. Los análisis para este parámetro 2,3,7,8-Tetraclorodibenzo-p-dioxina se han realizado 7 veces por triplicado a los cuales se evaluó su desviación mediante el s-pooled. (Pharmacopeial, 2023)

Tabla 10
Porcentaje de recuperación para el analito 2378-TCDD

Analito	Orden de Trabajo							Prom	s	s ²	gl	%R (50 %-150 %)							
	Orden Interna																		
	L1 pg μL ⁻¹	L2 pg μL ⁻¹	L3 pg μL ⁻¹	L4 pg μL ⁻¹	L5 pg μL ⁻¹	L6 pg μL ⁻¹	L7 pg μL ⁻¹												
2378 TCDD	0,2462	0,2260	0,2296	0,2208	0,2283	0,2349	0,2287	0,2306	0,008	6,48E-05	6	99	90	92	88	91	94	91	

De los datos obtenidos se obtiene el parámetro s-pooled de 0,002 y a partir de ello se calcula y establece como límite de detección de 0,24 pg g⁻¹ y límite de cuantificación 0,75 pg g⁻¹

Tabla 11
Establecimiento de los límites de detección y cuantificación del 2378-TCDD

Analito	s-pooled	LDM pg μL ⁻¹	LCM pg μL ⁻¹	LDM actual pg μL ⁻¹	LCM actual pg μL ⁻¹	LDM actual pg g ⁻¹	LCM actual pg g ⁻¹
2378 TCDD	0,002	0,008	0,026	0,157	0,5	0,24	0,75

3.5.6 Robustez

El estudio del parámetro 2,3,7,8-Tetraclorodibenzo-p-dioxina se realizó mediante el método de Youden Steiner, en el cual se realizó una variación en las variables del método según el modelo de la siguiente tabla.

Tabla 12
Modelo de robustez – Youden – Steiner

Factor / Ensayo	1	2	3	4	5	6	7	8
A/a	A	A	A	A	a	a	a	a
B/b	B	B	b	b	B	B	b	b
C/c	C	c	C	c	C	c	C	c
D/d	D	D	d	d	d	d	D	D
E/e	E	e	E	e	e	E	e	E
F/f	F	f	f	F	F	F	f	F
G/g	G	g	g	G	g	G	G	g

Para el presente estudio se han realizado 4 variaciones de las variables del método como; analista, volumen de adición, tiempo de agitación y tiempo de extracción. Se realizaron las corridas según la variación de los factores que se muestran en la tabla 12, la concentración estudiada para este parámetro es de 1,5 pg g⁻¹, obteniendo los siguientes resultados.

Tabla 13
Resultados con los variables modificados al analito 2378-TCDD

Factor/Ensayo	Datos variables								Variables del método	Descripción
	1	2	3	4	5	6	7	8		
A/a	A1	A1	A1	A1	A2	A2	A2	A2	Analista	Analista que ejecuta el análisis
B/b	12 mL	12 mL	8 mL	8 mL	12 mL	12 mL	8 mL	8 mL	Volumen	variable de volumen ± 2mL
C/c	5min	3 min	5min	3 min	5min	3 min	5 min	3 min	Tiempo	de agitación
D/d	4.5 h	4.5 h	3.5 h	3.5 h	3.5 h	3.5 h	4.5 h	4.5 h	Tiempo	de extracción
Resultado pg g-1	1,5093	1,5053	1,5188	1,5139	1,5065	1,5142	1,5148	1,5122		
Recuperación %	101	100	101	101	100	101	101	101		

Del estudio de precisión se obtuvo el valor de la desviación estándar relativa a partir de la cual se pudo calcular los valores del t-calculado para cada factor.

Se plantea la hipótesis nula para la aceptación de la prueba estadística.

Ho: $t_{cal} < t_{tablas}$, no hay diferencia significativa al aplicar la variable correspondiente

Ha: $t_{cal} \geq t_{tablas}$, hay diferencia significativa al aplicar la variable correspondiente

Tabla 14*Evaluación de los parámetros que han variado para el analito 2378-TCDD*

Factor	Variable	Promedio	Diferencia (D)	t calculada	t tablas	Conclusión
Analista que ejecuta el análisis	A1	1,5118	0,0001	0,007	3,18	Se acepta Ho, no hay diferencia significativa al aplicar la variable correspondiente
	A2	1,5119				
variable de volumen ± 2mL	12 mL	1,5088	0,006	0,46	3,18	Se acepta Ho, no hay diferencia significativa al aplicar la variable correspondiente
	8 mL	1,5149				
Tiempo de agitación	5min	1,5124	0,000	0,07	3,18	Se acepta Ho, no hay diferencia significativa al aplicar la variable correspondiente
	3 min	1,5114				
Tiempo de extracción	4,5 h	1,5104	0,002	0,22	3,18	Se acepta Ho, no hay diferencia significativa al aplicar la variable correspondiente
	3,5 h	1,5133				

Para todos los casos se cumple que el t calculado < t tablas, por lo tanto se demuestra que el Método es ROBUSTO.

3.5.7 Rango de trabajo

Se determinó el Rango de Trabajo evaluando la precisión y la exactitud sobre una matriz adicionada de tal forma que se conozca la concentración inicial (para el estudio realizado la matriz inicial se encontraba libre de los analitos).

Tabla 15*Evaluación de la precisión de la concentración más alta evaluada del analito 2378-TCDD*

Conc. Inicial Muestra	0	pg g ⁻¹
Concentración Adicionada	7,5	pg g ⁻¹
Concentración Final	7,5	pg g ⁻¹

Replicas	Analistas		
	A1	A2	A3
1	7,6240	7,4646	7,4899
2	7,5390	7,6238	7,6401
3	7,4818	7,6915	7,6071
4	7,6041	7,4908	7,7223
5	7,6228	7,4212	7,6674
6	7,4913	7,5057	7,6666
7	7,7006	7,6190	7,4978
Cant. datos	7	7	7
Promedio	7,5805	7,5452	7,6136
S. D	0,07	0,09	0,08

VAR	0,00	0,01	0,007
h_{ij}	0,02	-1,01	0,98
k_{ij}	0,88	1,11	0,98
Dentro de los Laboratorios			
Inconsistencia h_{ij}	NO	NO	NO
Entre Laboratorios			
Inconsistencia k_{ij}	NO	NO	NO
Prom. Total	7,5795	N° Analistas	3
S.D de prom.	0,03	N° Replicas	7
Suma de VAR	0,02	N° datos	21

	S_r	0.08958564
Promedio	y-Y	(y-Y) ^{^2}
7,5805	0,0009	9,04E-07
7,5452	-0,0343	0,001
7,6130	0,0334	0,001
Sr2	0,0080	
Sd2	0,008	
N prom	7	
SL2	2,93E-06	
SR	0,08	

Figura 10
Gráfica de h de Mandel

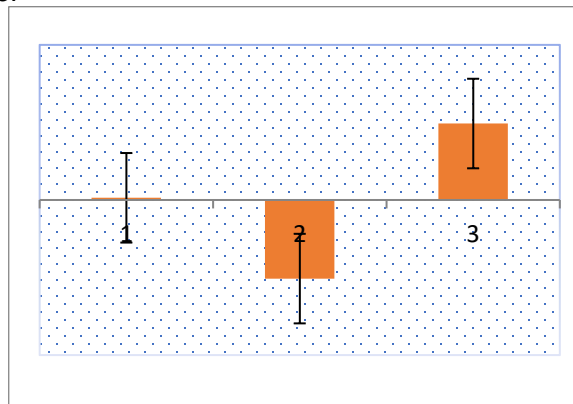
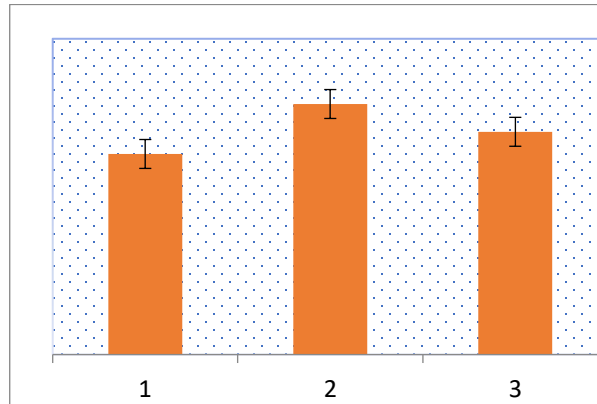


Figura 11
Gráfica de k de Mandel



De la evaluación estadística no se encuentra inconsistencia alguna, además los valores son normales y homogéneos con p-valor de 0,054 y 0,871 respectivamente siendo estos valores mayores que 0,05.

Para la evaluación de la veracidad de la concentración más alta evaluada se obtuvieron los siguientes resultados.

Tabla 16
Evaluación de la veracidad de la concentración más alta evaluada del analito 2378-

TCDD

Analistas	Datos	h	ABS(h)	Evaluación
A1	7,5805	0,02	0,02	C
A2	7,5452	-1,01	1,01	C
A3	7,6130	0,98	0,98	C
Promedio	7,5795			
DESV EST	0,03			

Se plantea las siguientes hipótesis:

Ho: si $t_{cal} < t_{tab}$, se demuestra la exactitud de resultados por lo tanto el método es veraz

Ha: si $t_{cal} \geq t_{tab}$, los datos no son exactos, por lo tanto, el método es no es veraz

\bar{y} = media del MR por el método a evaluar 7,5795

S = desviación estándar de proceso 0,03

n = número de analistas 3

μ_0 = valor del material de referencia 7,5

t calculado 4,065

t tablas 4,302

Debido al estadístico usado en el análisis (t-student) Se acepta la hipótesis nula, se demuestra la exactitud de resultados por lo tanto el método es veraz.

Como se ha demostrado Veracidad y Precisión para los resultados evaluados, se puede decir que el Rango de Trabajo puede llegar a este Nivel estudiado.

CAPÍTULO VI. Discusiones, conclusiones y recomendaciones

4.1 DISCUSION DE RESULTADOS

El presente estudio permitió desarrollar y validar exitosamente el análisis de los 17 analitos de las dioxinas y furanos en muestras de harinas de pescado, mediante la técnica de cromatografía de gases acoplada a la espectrometría de masas de Triple Cuadrupolo (GC-MS/MS) Agilent 7890 B con detector de masa Agilent 7010B, Este sistema combina la capacidad de separación de la cromatografía de gases con la sensibilidad y selectividad del detector de masas triple cuadrupolo. La columna utilizada es una Agilent DB-5ms Ultra Inerte, compuesta por fenilo al 5% y polidimetilsiloxano al 95% logrando reemplazar la técnica UHRGC-MSMS el cual hace referencia a las normas internacionales. Los resultados de los parámetros evaluados son los siguientes:

Precisión

En los análisis de precisión del nivel evidenciado de 0.75 pg g^{-1} , su repetibilidad y reproducibilidad se encuentra similitud en los resultados a través de los diversos ensayos realizados a las muestras, dando como valor una desviación estándar relativa de 1,536 siendo este menor que el establecido por el reglamento de la Unión Europea el cual indica un valor de $\leq 25 \%$ (Union Europea 2017/644, 2017), lo cual evidencia que la validación analítica es precisa en todo el campo del estudio realizado.

Veracidad

Los resultados obtenidos para este parámetro son los esperados, para los cuales se ha realizado contaminado tres niveles (en cada nivel se han contaminado 7 muestras) a la matriz de harina de pescado los cuales están libres de los analitos de interés. Las concentraciones añadidas para cada nivel fueron: $0,75 \text{ pg g}^{-1}$, 3 pg g^{-1} y $7,5 \text{ pg g}^{-1}$ respectivamente, en donde el porcentaje de recuperación de las dioxinas y furanos no presentan diferencias significativas entre ellas, por ello se puede afirmar que a diferentes concentraciones se obtienen porcentajes de recuperación similares.

Como ejemplo para el analito dioxina 2,3,7,8-Tetraclorodibenzo-p-dioxina se obtuvo un porcentaje de recuperación de 100,46%, siendo el rango aceptable de 60 % - 120 % según el reglamento UE 2017/644 (Union Europea 2017/644, 2017), este estudio presento un valor de la desviación estándar relativa de 1,21%, siendo esta menor al valor especificado de 25%. Para este parámetro, el estadístico aplicado para dar la confirmación mediante los cálculos

estadísticos es el análisis de varianza de un factor (prueba F) en donde se tiene como resultado F calculado = 1,82 y siendo menor que el valor de F tablas/critico = 3,55, confirmando que no existe diferencia significativa en la recuperación.

Selectividad

En lo que respecta a la selectividad, se pudo determinar que el método es selectivo debido a que cada compuesto tanto de las dioxinas como furanos se ha identificado mediante las dos transiciones de acorde al tipo de instrumentación los cuales son las transiciones de cuantificación y calificación, con respecto al ejemplo presentado para la dioxina 2,3,7,8-Tetraclorodibenzo-p-dioxina y para los métodos de cromatografía gaseosa con detector masas se debe controlar al menos dos iones precursores específicos, cada uno con un ion de transición correspondiente específico producido para todos los analitos marcados y no marcados en el ámbito de aplicación de los análisis.

La tolerancia máxima permitida de las intensidades relativas del ion es de $\pm 15\%$ establecido con el reglamento de la unión europea (Union Europea 2017/644, 2017), para iones de transición seleccionados producidos en comparación con los valores calculados o medidos (promedio de los patrones de calibración), en condiciones idénticas de masas/masas, en particular energía de colisión y presión del gas de colisión, para cada transición de un analito. Por ello se evaluó las transiciones de ion precursor a ion producto del analito correspondiente, por medio de la relación entre las transiciones de cuantificación y calificación de las muestras fortificadas respecto al de las obtenidas de la curva de calibración. Por lo tanto la matriz no afecta a la identificación del analito concluyendo que el método es selectivo.

Linealidad / Sensibilidad

Los analitos responden de manera lineal a las concentraciones evaluadas tal como se muestran en los gráficos del 1 al 7 las cuales se muestran las curvas de linealidad correspondientes a las dioxinas, mientras que en los gráficos del 8 al 17 se presentan las curvas de linealidad de los furanos. Luego de su evaluación estadística por ejemplo para dioxina 2,3,7,8-Tetraclorodibenzo-p-dioxina se obtiene como resultado un coeficiente de correlación de 0,998; y un coeficiente de determinación (r) de 0,996; siendo la especificación un mínimo de 0,99; lo que se concluye que hay una relación lineal entre ambas variables (dependiente "x" e independiente "y").

Adicional se han desarrollado tres pruebas adicionales: para la pendiente, intercepto y coeficiente de correlación.

1. Prueba de hipótesis de la pendiente, en donde la H_0 es que la pendiente "b" sea igual a cero. Para ello se trabaja con $n-2$ grados de libertad el estadístico usado es el t student, en donde el t calculado es igual a 22,48 es mayor que el t tablas 2,11 por lo que se rechaza la H_0 , es decir la pendiente no toma el valor de cero y hace que el método en estudio responde a los diferentes cambios de concentración.
2. Prueba de hipótesis del intercepto, para esta prueba se plantea como H_0 que el intercepto incluye el cero. Se trabaja con $n-2$ grados de libertad el estadístico usado es el t student, en donde el t calculado es igual a 0,47 es menor que el t tablas 2,11 por lo que se acepta la H_0 , es decir el intercepto incluye el cero y el método es proporcional en el intervalo ensayado.
3. Prueba de hipótesis del coeficiente de correlación, para esta prueba se plantea como H_0 que el coeficiente de correlación es igual a cero. Se trabaja con $n-2$ grados de libertad, el estadístico usado es el t student, en donde el t calculado es igual a 22,48 es mayor que el t tablas 2,11 por lo que se rechaza la H_0 , es decir existe un grado de asociación entre la concentración y la respuesta que es diferente de cero.

Por consiguiente, es factible llevar a cabo la cuantificación de las concentraciones de dioxinas y furanos en base a estos datos.

Límite de detección y cuantificación

La Tabla 3 se presenta los límites de detección y cuantificación de los compuestos de dioxinas y furanos, los cuales son $0,24 \text{ pg g}^{-1}$ y $0,75 \text{ pg g}^{-1}$. Estos límites fueron establecidos a través de experimentos que involucraron diversas diluciones en los estándares de dioxinas y furanos, seguidos de análisis en el equipo GC/MSMS y la interpretación de los cromatogramas. Por ejemplo, el 2,3,7,8-TCDD y el 1,2,3,7,8-PeCDD mostraron un límite inferior de detección de $0,25 \text{ pg g}^{-1}$, siendo estas dioxinas consideradas las más tóxicas. En contraste, el 1,2,3,4,6,7,8-HpCDD y el OCDD presentaron límites de detección más altos debido a su menor resolución en el cromatograma a concentraciones inferiores a 1 pg g^{-1} . Los demás compuestos analizados mostraron un límite de detección de $0,5 \text{ pg g}^{-1}$, siendo sus picos en el cromatograma detectables. Una vez determinada la concentración mínima para la detección de los picos de cada analito en el cromatograma, se llevó a cabo el método cromatográfico mediante siete corridas, confirmando la reproducibilidad de los valores, la estabilidad de la desviación estándar y un porcentaje de recuperación superior al 85%. Mediante la determinación del límite de detección, es posible establecer el límite de cuantificación correspondiente a cada analito, el cual equivale al doble del límite de detección.

En la figura 6 se pueden apreciar los picos correspondientes a las 7 dioxinas y los 10 furanos analizados. Destaca la presencia de un pico con mayor resolución que corresponde al compuesto 2,3,7,8-TCDD. Asimismo, se identifican tres picos cercanos en el tiempo de retención correspondiente al minuto 21 de la corrida que corresponden a las 3 Hexaclorodioxinas, los cuales son isómeros al presentar la misma cantidad de átomos de cloro en sus estructuras. Por otro lado, se distingue un pico con menor resolución en el tiempo de retención identificado en el minuto 39,2, el cual se atribuye al compuesto Octaclorodibenzo-p-dioxina.

Para lograr la separación y detección de todos los picos de los analitos, es necesario destinar al menos 29,5 minutos al tiempo de corrida, con el fin de garantizar la diferenciación de los picos.

Robustez

Con las variaciones realizadas al método de ensayos las cuales fueron: el cambio de analistas, modificación del volumen, tiempo de agitación y tiempo de extracción, los resultados obtenidos son de acuerdo con los niveles adicionados, concluyendo que no hay diferencia significativa al aplicar las modificaciones de las variables correspondientes, según el modelo matemático de Youden Steiner.

Rango de Trabajo

Se determino el rango de trabajo evaluando la precisión y exactitud de la adición en el nivel evaluado más alto $7,50 \text{ pg g}^{-1}$, de los datos analizados se realizó una evaluación de t-student para demostrar la veracidad de los resultados encontrando $t_{\text{cal}} = 4.05 < t_{\text{tablas}} = 4.30$ demostrando la exactitud de los resultados por lo que el método es veraz. Para la exactitud Como se ha demostrado Veracidad, Precisión y Linealidad para los resultados evaluados, se puede decir que el Rango de Trabajo puede llegar a este Nivel.

4.2 Conclusiones

- Se logró acondicionar el equipo de cromatografía de gases, realizando correctamente el Desarrollo y validación de un método analítico para la determinación de dioxinas y furanos en harina de pescado por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas triple cuadrupolo (GC-MS/MS).
- Los parámetros de validación como ejemplo para el analito 2,3,7,8-Tetraclorodibenzo-p-dioxina son: precisión con un límite de repetibilidad de 3,99%, veracidad con una recuperación entre 99,98% – 100,01%, el límite de detección es de 0,25 pg g⁻¹, el límite de cuantificación es de 0,75 pg g⁻¹, la curva de linealidad presenta un coeficiente de determinación (R^2) con un valor mayor a 95 %, para la selectividad se cumple con la tolerancia <15% del ratio de calificación/cuantificación, la robustez realizada por Youden – Steiner demuestra que el método es propenso a ciertos cambios, es robusto, el rango de trabajo del presente estudio fue de 0,75 – 7,5796 pg g⁻¹.
- Los resultados obtenidos a través de los controles declarados en el presente trabajo de validación son reproducibles y confiables.
- Los resultados reportados de las diferentes pruebas expresado como suma de dioxinas y furanos de las muestras ejecutadas, los cuales son expresadas en equivalentes tóxicos, es igual al valor de 0,0669 ng kg⁻¹, la cual es menor al límite máximo permisible (1,25 ng kg⁻¹) establecido por la reglamentación europea. (Union Europea 2017/644, 2017).

4.3 Recomendaciones

- Para la ejecución de los análisis de dioxinas y furanos es necesario el uso de equipos de protección personal adecuados ya que presentan una alta toxicidad,

debido a lo cual se recomienda tener un ambiente exclusivo para su determinación.

- Este estudio proporciona contribuciones fundamentales para la aplicación de metodologías en un laboratorio de análisis e investigación. La alta demanda de análisis de dioxinas por parte de entidades de fiscalización ha resultado en ganancias significativas.

Referencias Bibliográficas

- AgilentTechnologies. (2010). *Agilent 7693A, Inyector Automático de Líquidos*. Wilmington, EE.UU: Agilent Technologies I, editor. Obtenido de Agilent 7693A, Inyector Automático de Líquidos. Quinta ed.
- Baird, C. (2001). *Química ambiental. segunda ed.* Barcelona: Reverté S.A.
- Bremauntz, A. F. (2004). *Las Sustancias Tóxicas Persistentes*. Mexico: Ecología INd.
- Dioxinas. (29 de 11 de 2023). *Organización Mundial de la Salud*. Obtenido de Organización Mundial de la Salud: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/dioxins-and-their-effects-on-human-health>
- Douglas, J. B. (1994). *Conceptos y modelos de Química inorgánica. Segunda ed.* Barcelona: Reverté.
- EPA-8290A. (2007). *Polychlorinated dibenzo-p-dioxin (PCDDs) and Polychlorinated dibenzofurans (PCDF) by high-resolution gas chromatography/high resolution mass spectrometry (HRGC/HRMS)*.
- Eurolab. (2016). *La Adecuación al Uso de los Métodos Analíticos Una Guía de Laboratorio para Validación de Métodos y Temas Relacionados*. España.
- Karchner, S., Franks, D., & Keneddy, S. y. (April de 2006). "The molecular basis for differential dioxin sensitivity in birds: Role of the aryl hydrocarbon receptor". *Proc Natl Acad Sci*, 103(16).
- Limit-Guidance, A. D. (1996). *Laboratory Guide for Determining Method Detection Limits Wisconsin Department of Natural Resources Laboratory Certification Program*.
- Luengo, J. (23 de Diciembre de 2020). *Dioxinas: una amenaza desde el medio ambiente*. Obtenido de <https://revistas.uchile.cl/index.php/RT/article/view/15919/16405>
- Mamani, M. A. (2021). *Determinación de Dioxinas y Furanos en Harina de Pescado por Cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas triple cuadrupolo*. Lima.

- Naccha Torres, L. R. (2010). *Cuantificación de dioxinas por cromatografía de gases/espectrometría de masas de baja resolución (gc/lrms) en carnes y leches consumidos en Nuevo León*. México: Universidad Autónoma de Nuevo León, Química Analítica de la Facultad de Medicina.
- NTP-ISO-5725-1. (1999). *Exactitud (Veracidad y Precisión) de los métodos y resultados de medición – Parte 1 “Principios y definiciones generales*. Lima.
- NTP-ISO-5725-2. (2021). *Exactitud (Veracidad y Precisión) de los métodos y resultados de medición. Parte 2: “Métodos básicos para la determinación de la repetibilidad y reproducibilidad de un método de medición normalizado*. Lima.
- OMS. (2007). *Informe sobre la salud en el mundo-Protección de la salud pública mundial en el siglo XXI*. Obtenido de https://www.who.int/whr/2007/07_report_es.pdf?ua=1
- Organización Mundial de la Salud. (4 de 10 de 2024). Obtenido de Organización Mundial de la Salud: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/food-safety#:~:text=La%20carga%20que%20las%20enfermedades,15%20000%20millones%20al%20a%C3%B1o>.
- Pharmacopeial, U. S. (2023). *USP <1225> Validation of Compendial Procedures*. In: *United States Pharmacopeia and National Formulary (USP 46–NF 41)*. Rockville, MD: United States: Pharmacopeial Convention.
- PNUMA, P. d. (2006). *Plan Nacional de implementación del convenio de estocolmo sobre los contaminantes organicos persistentes en el Perú*. Lima: SINIA MINAM.
- Quirós, M. (2006). *Principios Y Aplicaciones de la Cromatografía de Gases*. Decimo ed. Costa Rica: Editorial Universidad de Costa Rica.
- Reglamento (UE) n° 277/2012. (2012). *Modificación de los anexos I y II de la Directiva 2002/32/CE del Parlamento Europeo y del Consejo en lo relativo a los contenidos máximos y los límites de intervención respecto a las dioxinas y furanos*. UE.
- Skoog, D. A. (2007). *Principios de análisis instrumental*. R. Cervantes Espejel, Ed.

Technologies, A. (22 de Diciembre de 7010B, 2020). *GC/MS Triple Quadrupolo 7010B*. Obtenido de https://www.googleadservices.com/pagead/aclk?sa=L&ai=DChcSEwiwtt2JpJuKAxVDcUcBHQm4PXIYABAEgGjxdQ&co=1&ase=2&gclid=Cj0KCQiAx9q6BhCDARIsACwUxu4mH_EIBOzhzA6A0TJGi1ti_sty2t0YQPXuR6rY-2nqSpysPB3Y_v4aAsgXEALw_wcB&ohost=www.google.com&cid=CAESV-D28CirDPFME3IZy8H

Technologies, A. (s.f.). *Agilent Technologies*. Obtenido de Agilent Technologies: <https://www.agilent.com/en/product/gc-columns/ultra-inert-gc-columns/db-5ms-ultra-inert-columns#productdetails>

Technologies, A. (22 de Diciembre de Analisis Cuantitativo MassHunter, 2020). *Analisis Cuantitativo MassHunter*. Obtenido de Analisis Cuantitativo MassHunter: https://www.googleadservices.com/pagead/aclk?sa=L&ai=DChcSEwjLm5zlpJuKAxWNZkcBHbeAF6EYABABGgJxdQ&co=1&ase=2&gclid=Cj0KCQiAx9q6BhCDARIsACwUxu7Af_VvVLvLHOMPnkDQd_ANMjt76j7QD4t8BHWB1q-fU0vgtNgx4eEaAiAkEALw_wcB&ohost=www.google.com&cid=CAESV-D2yJFPI_Trkkq1u_

Technologies, A. (large volume injection). *GC inlet with temperature programming, large volume injection*. Obtenido de GC inlet with temperature programming, large volume injection.: <https://www.agilent.com/en/product/gas-chromatography/gc-inlets/multimode-inlet>

UNE-EN-16215. (2020). *Animal feeding stuffs: Methods of sampling and analysis - Determination of dioxins and dioxin-like PCBs by GC/HRMS and of indicator PCBs by GC/HRMS*. España: UNE.

Union Europea 2017/644, R. (. (2017). *Métodos de muestreo y análisis para el control de los niveles de dioxinas, PCB similares a las dioxinas y PCB no similares a las dioxinas en determinados productos alimenticios*.

Veterinaria.Digital. (6 de Julio de 2021). *Veterinariadigital.com*. Obtenido de <https://www.veterinariadigital.com/articulos/procesos-en-la-fabricacion-de-la-harina-de-pescado/>

Lista de Anexo

Anexo 1. Parámetros de validación	1
Anexo 2. Abreviatura de dioxinas y furanos	2
Anexo 3. Valor de TEF para las dioxinas y furanos	3
Anexo 4. Valores del limite para las dioxinas y furanos en harina de pescado	4
Anexo 5. Límite de Detección y cuantificación para las PCDD y PCDF	5
Anexo 6. Linealidad de las PCDD y PCDF	7
Anexo 7. Tiempos de retención de las PCDD y PCDF	15
Anexo 8. Transiciones para el análisis de selectividad	16

ANEXOS

Anexo 1

Parámetros de validación

Parámetro	Estadístico aplicado	Criterio de aceptación	Fuente de criterio de aceptación
Precisión	Se evaluó la precisión en base a estimadores estadísticos como: h-Mandel, k-Mandel, Cochran, G-Grubbs, Normalidad (Anderson Darling), Homogeneidad (Barlett). Las matrices cumplen en los diferentes niveles evaluados	RPD<=25%	EPA 8290 - Reglamento UE 2017/644 Comisión Europea
Veracidad	Por contaminación con el estándar debe ser muy exacta y precisa, El analito debe añadirse al principio del proceso de ensayo. Se debe contaminar a un mínimo de tres niveles	RECOVERY: 60-120%	Reglamento UE 2017/644 Comisión Europea
Selectividad/ Especificidad:	Evaluación de la relación de las transiciones de calificación / cuantificación de las muestras fortificadas	Tolerancia máxima permitida de las intensidades relativas del ion de ± 15 % para iones de transición seleccionados producidos en comparación con los valores calculados o medidos	REGLAMENTO (UE) 2017/644 DE LA COMISIÓN de 5 de abril de 2017
Linealidad/función respuesta (R²) /Sensibilidad	Regresión lineal	r, r2 >= 0,99 / RSD <= 20%	Procedimiento interno del laboratorio. Programa de aseguramiento de la validez de los resultados de ensayos
Límite de detección	Este análisis es realizado 7 veces por los analistas que participan en la implementación (como mínimo dos) a los cuales se evaluó su desviación mediante el s-pooled.	0,2355 pg/g	Procedimiento interno del laboratorio. Programa de aseguramiento de la validez de los resultados de ensayos
Límite de cuantificación	Este análisis es realizado 7 veces por los analistas que participan en la implementación (como mínimo dos) a los cuales se evaluó su desviación mediante el s-pooled.	0,75 pg/g	Procedimiento interno del laboratorio. Programa de aseguramiento de la validez de los resultados de ensayos
Robustez	evaluando la precisión y la exactitud de un patrón alto o realizado sobre una matriz adicionada de tal forma que se conozca la concentración inicial	t calculado < t tablas,	Procedimiento interno del laboratorio. Programa de aseguramiento de la validez de los resultados de ensayos
Rango de trabajo (intervalo de trabajo)	evaluando la precisión y la exactitud de un patrón alto o realizado sobre una matriz adicionada de tal forma que se conozca la concentración inicial	0,75 – 7,5796 pg/g	Procedimiento interno del laboratorio. Programa de aseguramiento de la validez de los resultados de ensayos

Anexo 2*Abreviatura de las dioxinas y furanos*

Dioxinas	
Abreviatura	Nombre
2,3,7,8-TCDD	2,3,7,8-Tetraclorodibenzo-p-dioxina
1,2,3,7,8-PeCDD	1,2,3,7,8-Pentaclorodibenzo-p-dioxina
1,2,3,4,7,8-HxCDD	1,2,3,4,7,8-Hexaclorodibenzo-p-dioxina
1,2,3,6,7,8-HxCDD	1,2,3,6,7,8-Hexaclorodibenzo-p-dioxina
1,2,3,7,8,9-HxCDD	1,2,3,7,8,9-Hexaclorodibenzo-p-dioxina
1,2,3,4,6,7,8- HpCDD	1,2,3,4,6,7,8-Heptaclorodibenzo-p- dioxina
OCDD	Octaclorodibenzo-p-dioxina
Furanos	
Abreviatura	Nombre
2,3,7,8-TCDF	2,3,7,8-Tetraclorodibenzofurano
1,2,3,7,8-PeCDF	1,2,3,7,8-Pentaclorodibenzofurano
2,3,4,7,8-PeCDF	2,3,4,7,8-Pentaclorodibenzofurano
1,2,3,4,7,8-HxCDF	1,2,3,4,7,8-Hexaclorodibenzofurano
1,2,3,6,7,8-HxCDF	1,2,3,6,7,8-Hexaclorodibenzofurano
2,3,4,6,7,8-HxCDF	1,2,3,7,8,9-Hexaclorodibenzofurano
1,2,3,7,8,9-HxCDF	2,3,4,6,7,8-Hexaclorodibenzofurano
1,2,3,4,6,7,8- HpCDF	1,2,3,4,6,8,9-Heptaclorodibenzofurano
1,2,3,4,7,8,9- HpCDF	1,2,3,4,7,8,9-Heptaclorodibenzofurano
OCDF	Octaclorodibenzofurano

Anexo 3*Valor de TEF para las dioxinas y furanos*

Congener	TEF value
Dibenzo-p-dioxins (PCDDs)	
2,3,7,8-TCDD	1
1,2,3,7,8-PeCDD	1
1,2,3,4,7,8-HxCDD	0,1
1,2,3,6,7,8-HxCDD	0,1
1,2,3,7,8,9-HxCDD	0,1
1,2,3,4,6,7,8-HpCDD	0,01
OCDD	0,0003
Dibenzofurans (PCDFs)	
2,3,7,8-TCDF	0,1
1,2,3,7,8-PeCDF	0,03
2,3,4,7,8-PeCDF	0,3
1,2,3,4,7,8-HxCDF	0,1
1,2,3,6,7,8-HxCDF	0,1
2,3,4,6,7,8-HxCDF	0,1
1,2,3,7,8,9-HxCDF	0,1
1,2,3,4,6,7,8-HpCDF	0,01
1,2,3,4,7,8,9-HpCDF	0,01
OCDF	0,0003

Anexo 4

Límite máximo permisible para las dioxinas y furanos en harina de pescado

1) En el anexo I de la Directiva 2002/32/CE, la «Sección V: dioxinas y PCB» se sustituye por el texto siguiente:

«SECCIÓN V: DIOXINAS Y PCB

Sustancias indeseables	Productos destinados a la alimentación animal	Contenido máximo en ng EQT PCDD/F OMS/kg (ppm) (1) en piensos calculado sobre la base de un contenido de humedad del 12 %
1. Dioxinas [suma de policlorodibenzo-para-dioxinas (PCDD) y policlorodibenzofuranos (PCDF) expresada en equivalentes tóxicos de la Organización Mundial de la Salud (EQT-OMS), utilizando los factores de equivalencia tóxica de la misma organización (EET-OMS, 2005) (2)]	Materias primas para piensos de origen vegetal, excepto:	0,75
	— aceites vegetales y sus subproductos.	0,75
	Materias primas para piensos de origen mineral.	0,75
	Materias primas para piensos de origen animal:	
	— grasa animal, incluida la grasa de leche y la grasa de huevo,	1,50
	— otros productos de animales terrestres, incluidos la leche y los productos lácteos y los huevos y los ovoproductos,	0,75
	— aceite de pescado,	5,0
	— pescados, otros animales acuáticos y sus productos derivados, excepto el aceite de pescado y las proteínas de pescado, hidrolizadas, que contengan más de un 20 % de grasa (3),	1,25
	— proteínas de pescado, hidrolizadas, que contengan más de un 20 % de grasa,	1,75
	Los aditivos para piensos: arcillas caolínicas, vermiculita, natrolita-fonolita, aluminatos de calcio sintéticos y clinoptilolita de origen sedimentario pertenecientes a los grupos funcionales de aglutinantes y antiaglomerantes.	0,75
	Aditivos para piensos pertenecientes al grupo funcional de los compuestos de oligoelementos.	1,0
	Premezclas.	1,0
	Pienso compuesto, excepto:	0,75
	— piensos compuestos para animales de compañía y peces,	1,75
— piensos compuestos para animales de peletería.	—	

Anexo 5

Límite de Detección y cuantificación para las dioxinas y furanos en harina de pescado

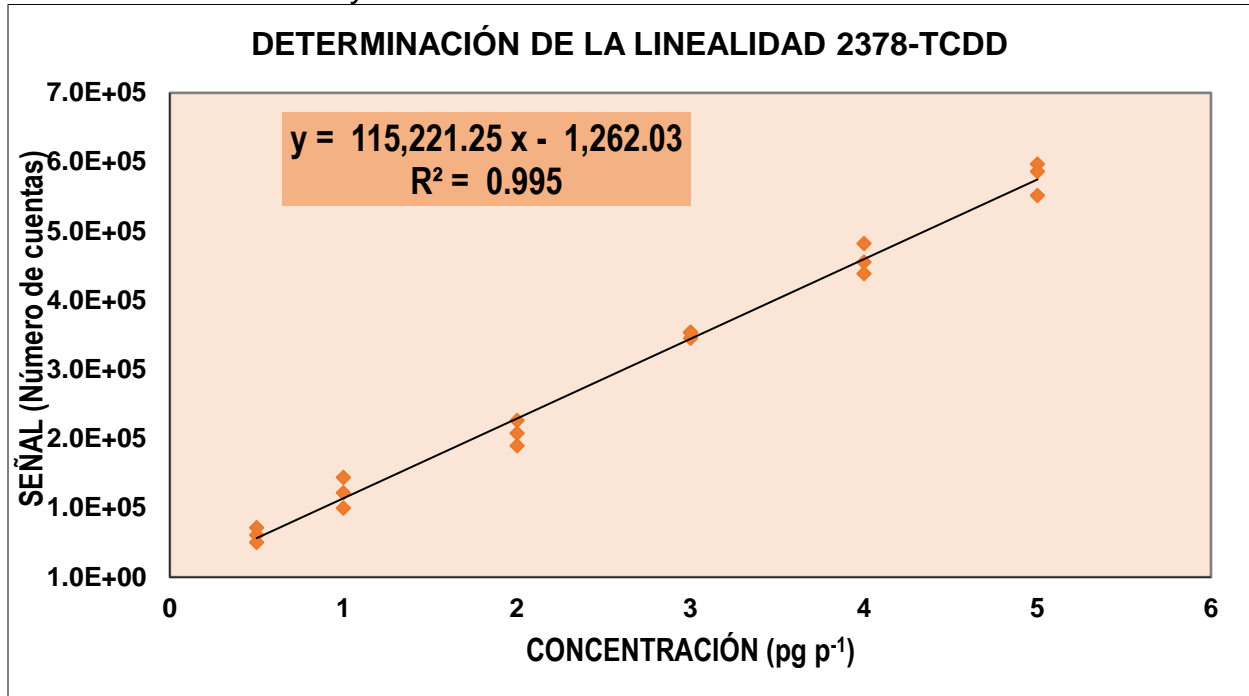
ANALITO	Analista							Promedio	s	s ²	Grados de Libertad	%R (50 %-150 %)						
	Orden de Trabajo																	
	L1 pg uL ⁻¹	L2 pg uL ⁻¹	L3 pg uL ⁻¹	L4 pg uL ⁻¹	L5 pg uL ⁻¹	L6 pg uL ⁻¹	L7 pg uL ⁻¹											
2378 TCDD	0,2462	0,2260	0,2296	0,2208	0,2283	0,2349	0,2287	0,2306	0,0081	0,0001	6	98	90	92	88	91	94	91
12378 PeCDD	0,2456	0,2129	0,2500	0,2252	0,2349	0,2223	0,2256	0,2309	0,0133	0,0002	6	98	85	100	90	94	89	90
123478 HxCDD	0,4701	0,5196	0,5027	0,5741	0,4243	0,4449	0,4493	0,4836	0,0520	0,0027	6	94	104	101	115	85	89	90
123678 HxCDD	0,4664	0,5585	0,4813	0,5060	0,5001	0,5196	0,5242	0,5080	0,0302	0,0009	6	93	112	96	101	100	104	105
123789 HxCDD	0,4718	0,4624	0,4195	0,5075	0,4205	0,5649	0,5313	0,4825	0,0550	0,0030	6	94	92	84	101	84	113	106
1234678-HpCDD	0,9788	1,0613	0,8890	0,9857	0,9248	0,8772	0,7962	0,9304	0,0867	0,0075	6	98	106	89	99	92	88	80
OCDD	1,5454	0,9015	1,3380	0,8941	1,2697	1,0585	1,4182	1,2036	0,2561	0,0656	6	155	90	134	89	127	106	142
2378 TCDF	0,5518	0,5585	0,5063	0,5116	0,4997	0,5763	0,5181	0,2363	0,0084	0,0001	6	95	96	99	95	89	91	97
12378 PeCDF	0,4932	0,5293	0,4905	0,4893	0,4767	0,4968	0,5486	0,5035	0,0256	0,0007	6	99	106	98	98	95	99	110
23478 PeCDF	0,4884	0,5542	0,5580	0,5379	0,5039	0,5295	0,4824	0,4390	0,0099	0,0001	6	87	90	86	87	89	85	90
123478-HxCDF	0,5367	0,5597	0,5775	0,5513	0,4581	0,5797	0,5403	0,5433	0,0411	0,0017	6	107	112	115	110	92	116	108
123678-HxCDF	0,5088	0,4214	0,4805	0,4555	0,4490	0,5136	0,4690	0,4711	0,0330	0,0011	6	102	84	96	91	90	103	94
123789-HxCDF	0,4394	0,4582	0,4504	0,4818	0,4316	0,4781	0,4276	0,4524	0,0215	0,0005	6	88	92	90	96	86	96	86
234678 HxCDF	0,4832	0,5507	0,4300	0,5104	0,4736	0,5293	0,5664	0,5062	0,0475	0,0023	6	97	110	86	102	95	106	113
1234789-HpCDF	0,5437	0,4351	0,4994	0,4704	0,4419	0,4935	0,4153	0,4713	0,0444	0,0020	6	109	87	100	94	88	99	83

OCDF 0,4564 0,5134 0,5292 0,4438 0,4433 0,4185 0,4339 0,4626 0,0419 0,0018 6 91 103 106 89 89 84 87

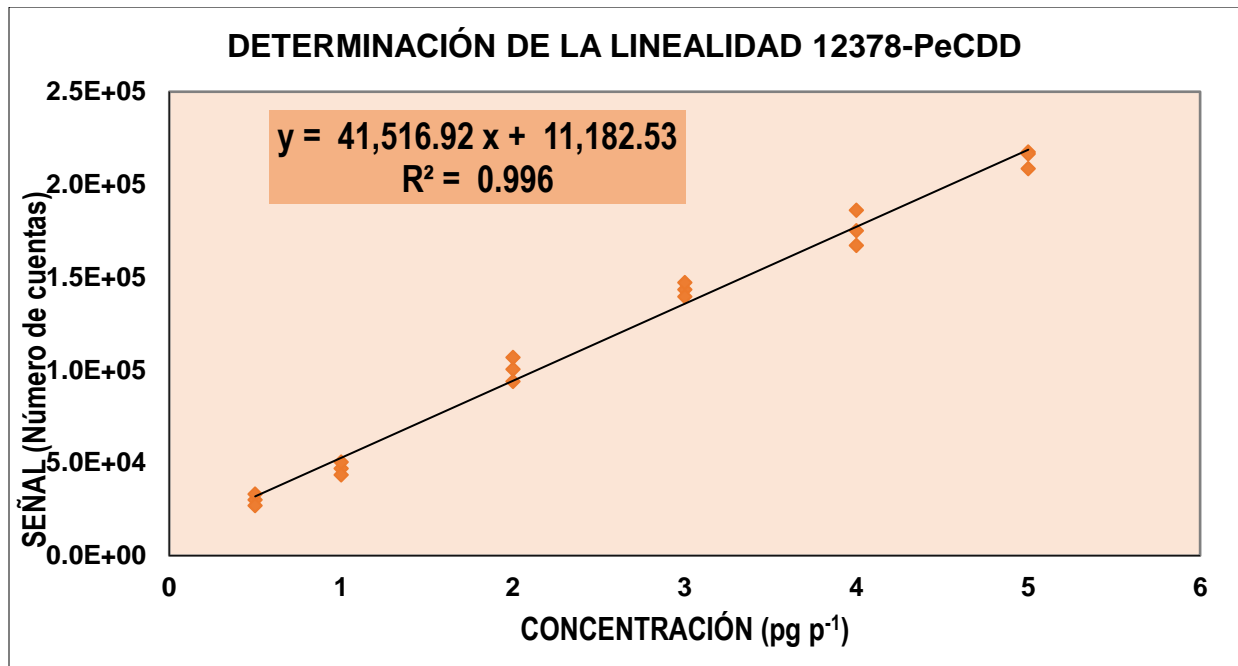
ANALITO	s-pooled	LDM pg μL^{-1}	LCM pg μL^{-1}	LDM actual pg μL^{-1}	LCM actual pg μL^{-1}	LDM actual pg g^{-1}	LCM actual pg g^{-1}
2378 TCDD	0,0027	0,0084	0,0269	0,157	0,5	0,25	0,75
12378 PeCDD	0,0030	0,0095	0,0303	0,157	0,5	0,25	0,75
123478 HxCDD	0,0092	0,0289	0,0920	0,314	1	0,5	1,5
123789 HxCDD	0,0079	0,0247	0,0787	0,314	1	0,5	1,5
123789 HxCDD	0,0089	0,0279	0,0888	0,314	1	0,5	1,5
1234678-HpCDD	0,0218	0,0684	0,2178	0,628	2	1	3
OCDD	0,0468	0,1469	0,4678	0,628	2	1	3
2378 TCDF	0,0031	0,0099	0,0315	0,314	1	0,5	1,5
12378 PeCDF	0,0060	0,0187	0,0596	0,314	1	0,5	1,5
23478 PeCDF	0,0023	0,0073	0,0233	0,314	1	0,5	1,5
123478-HxCDF	0,0072	0,0227	0,0724	0,314	1	0,5	1,5
123678-HxCDF	0,0073	0,0229	0,0730	0,314	1	0,5	1,5
123789-HxCDF	0,0067	0,0211	0,0673	0,314	1	0,5	1,5
234678 HxCDF	0,0099	0,0310	0,0986	0,314	1	0,5	1,5
1234789-HpCDF	0,0069	0,0216	0,0689	0,314	1	0,5	1,5
OCDF	0,0092	0,0288	0,0916	0,314	1	0,5	1,5

Anexo 6

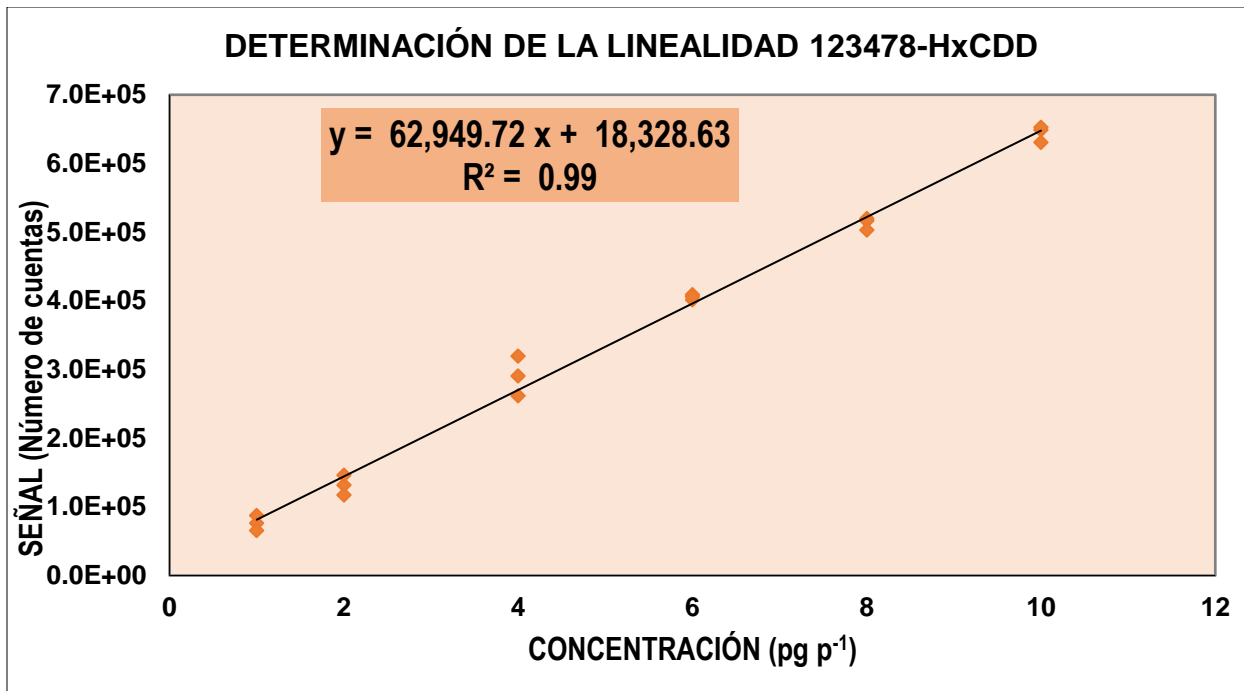
Linealidad de las dioxinas y furanos



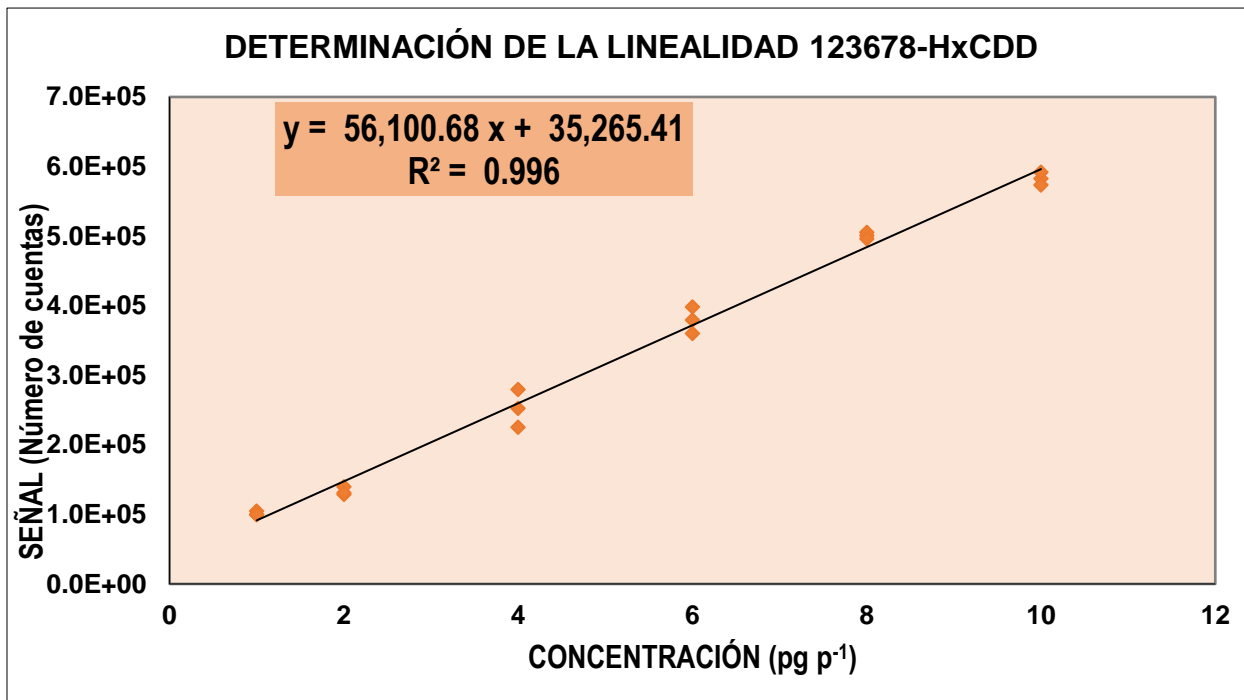
Linealidad 2378-TCDD



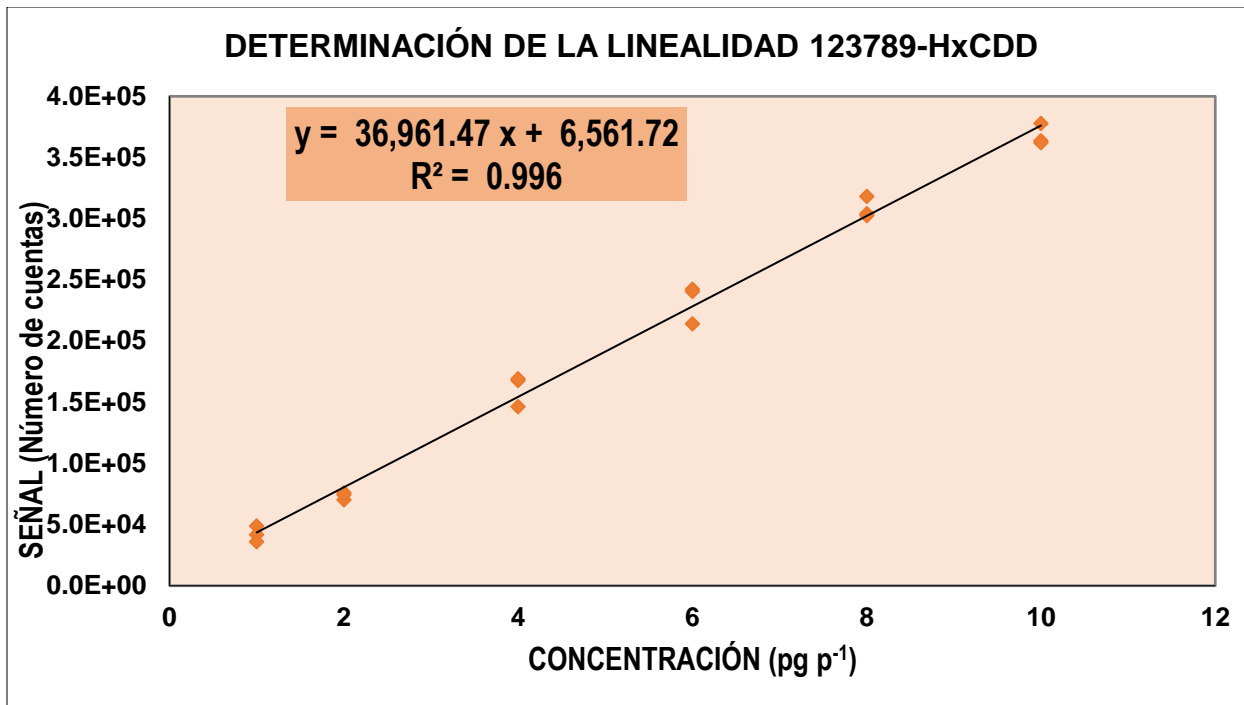
Linealidad 12378-PeCDD



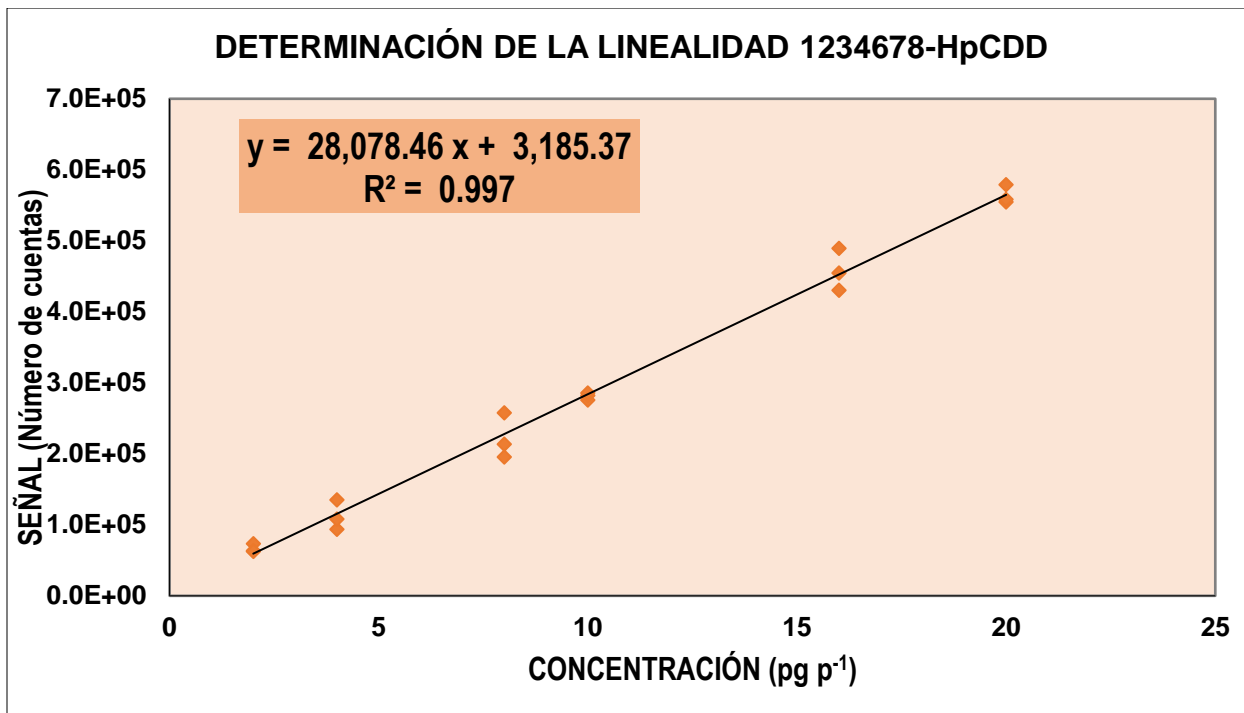
Linealidad 123478-HxCDD



Linealidad 123678-HxCDD

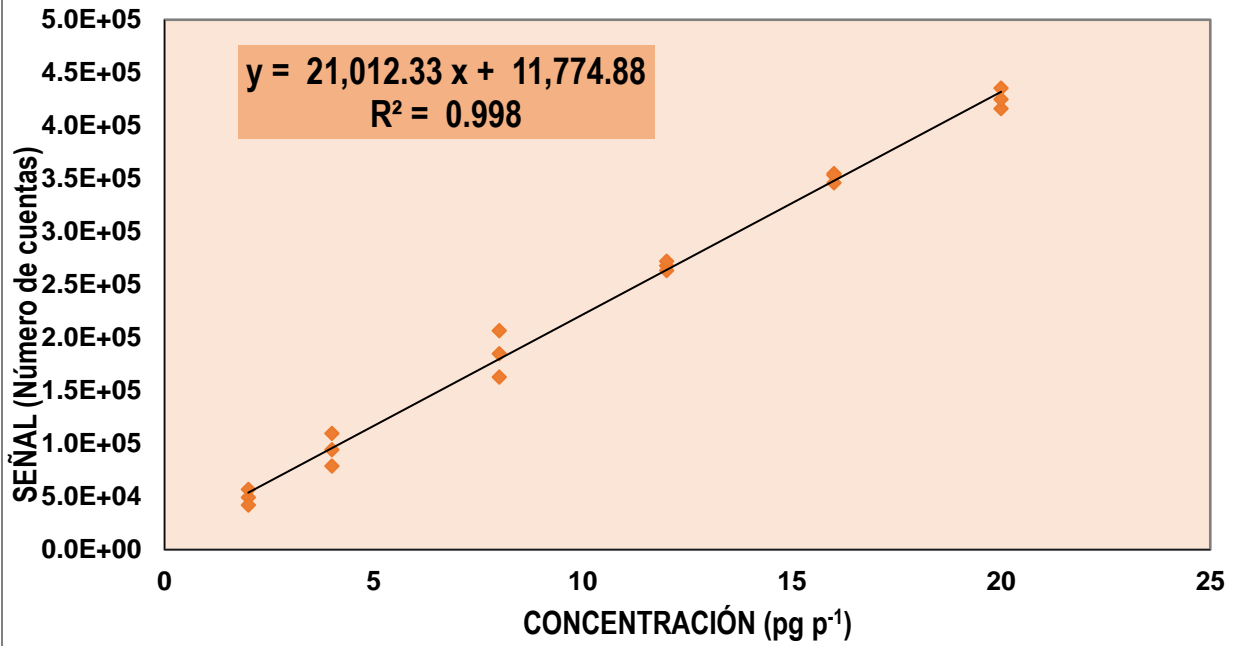


Linealidad 123789-HxCDD



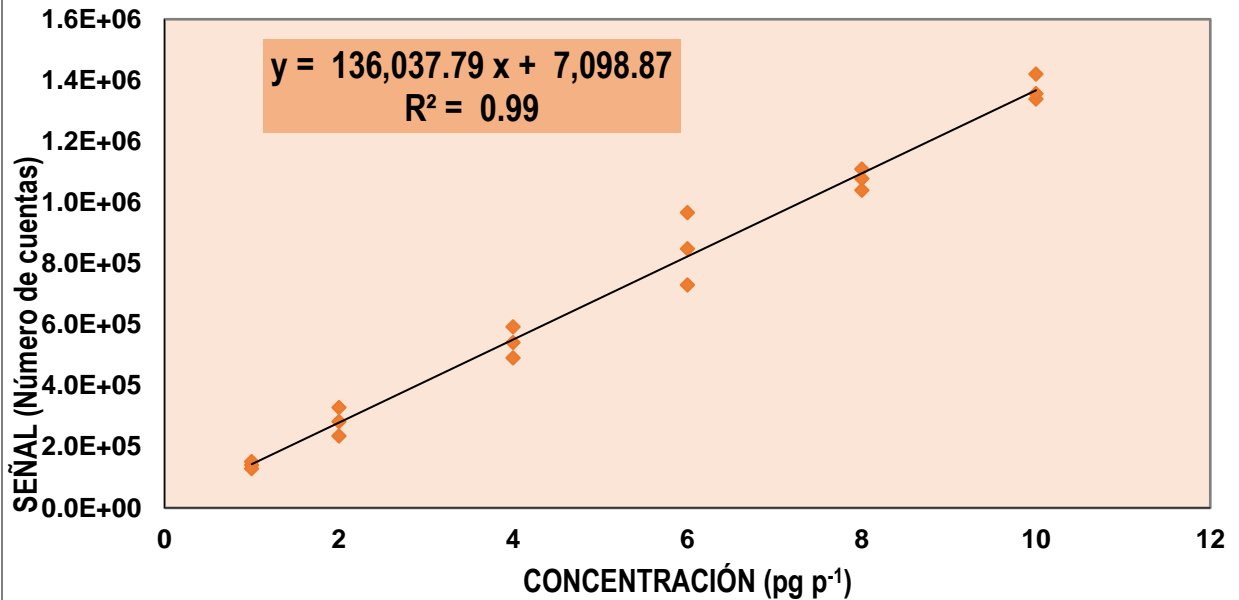
Linealidad 1234678-HpCDD

DETERMINACIÓN DE LA LINEALIDAD OCDD

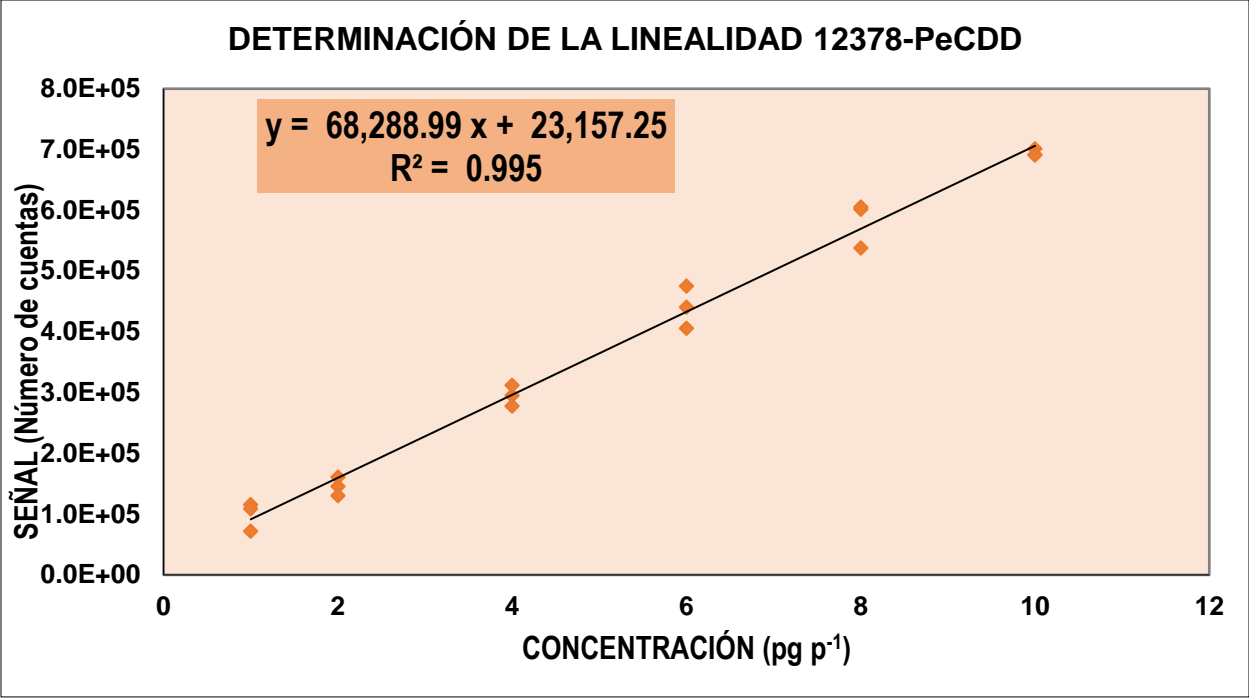


Linealidad OCDD

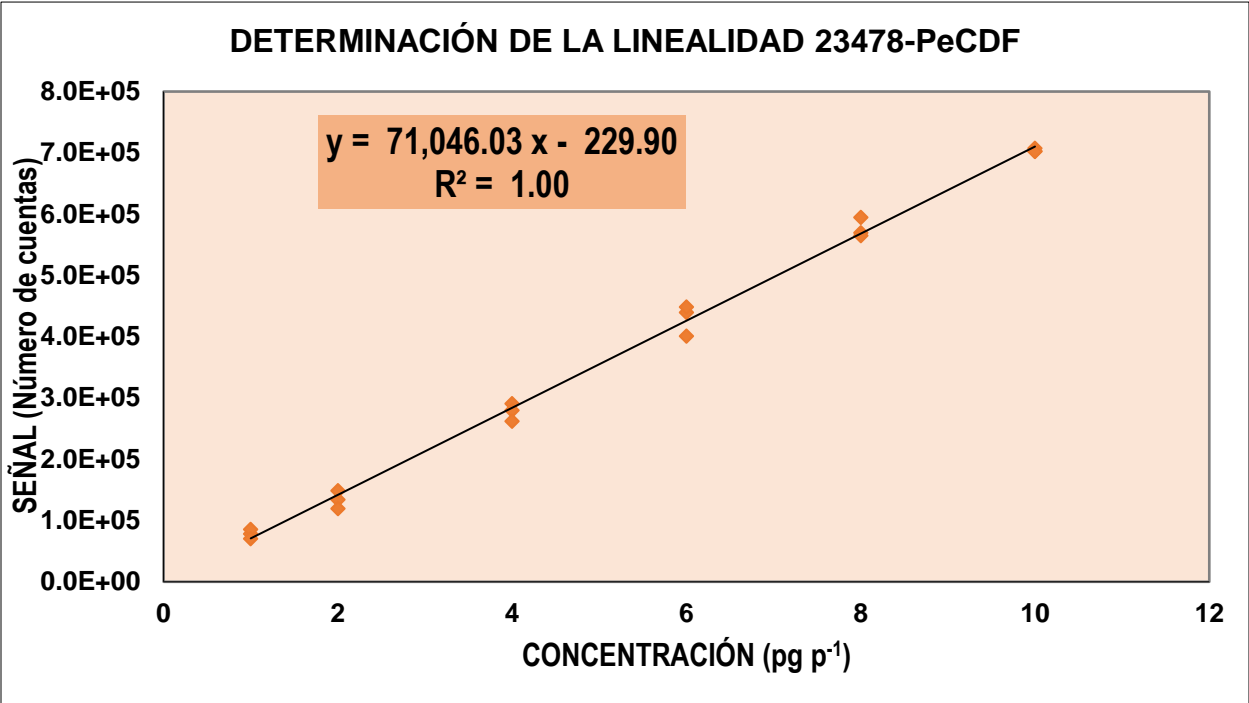
DETERMINACIÓN DE LA LINEALIDAD 2378-TCDF



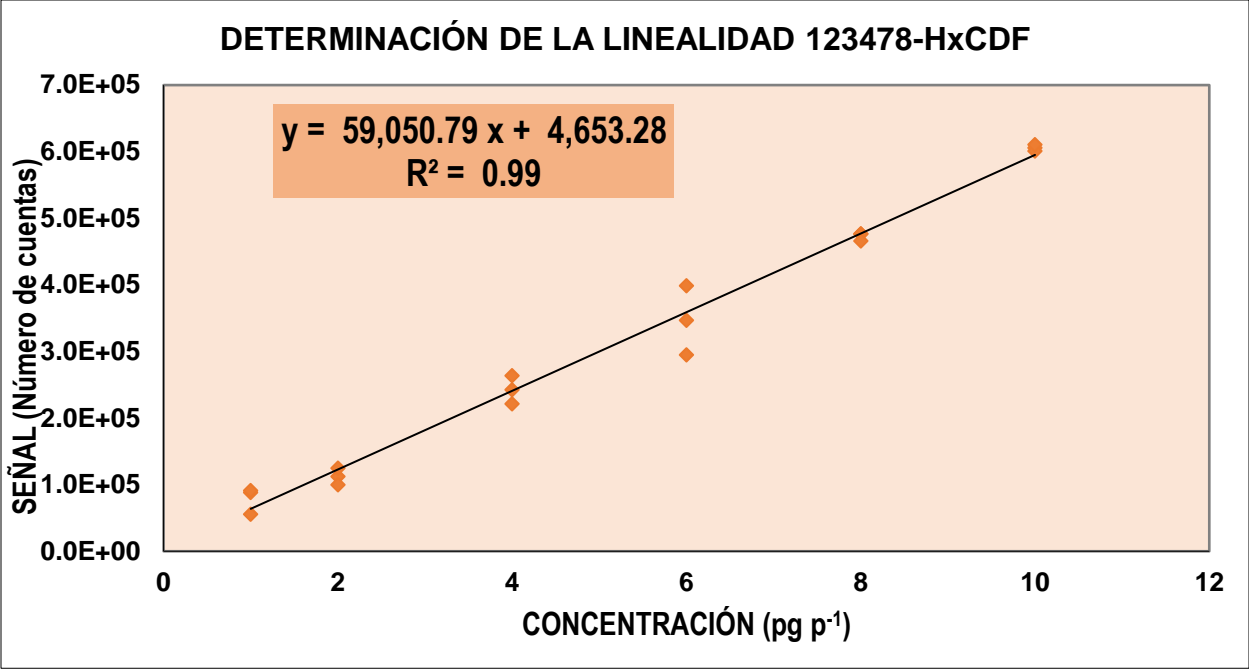
Linealidad 2378-TCDF



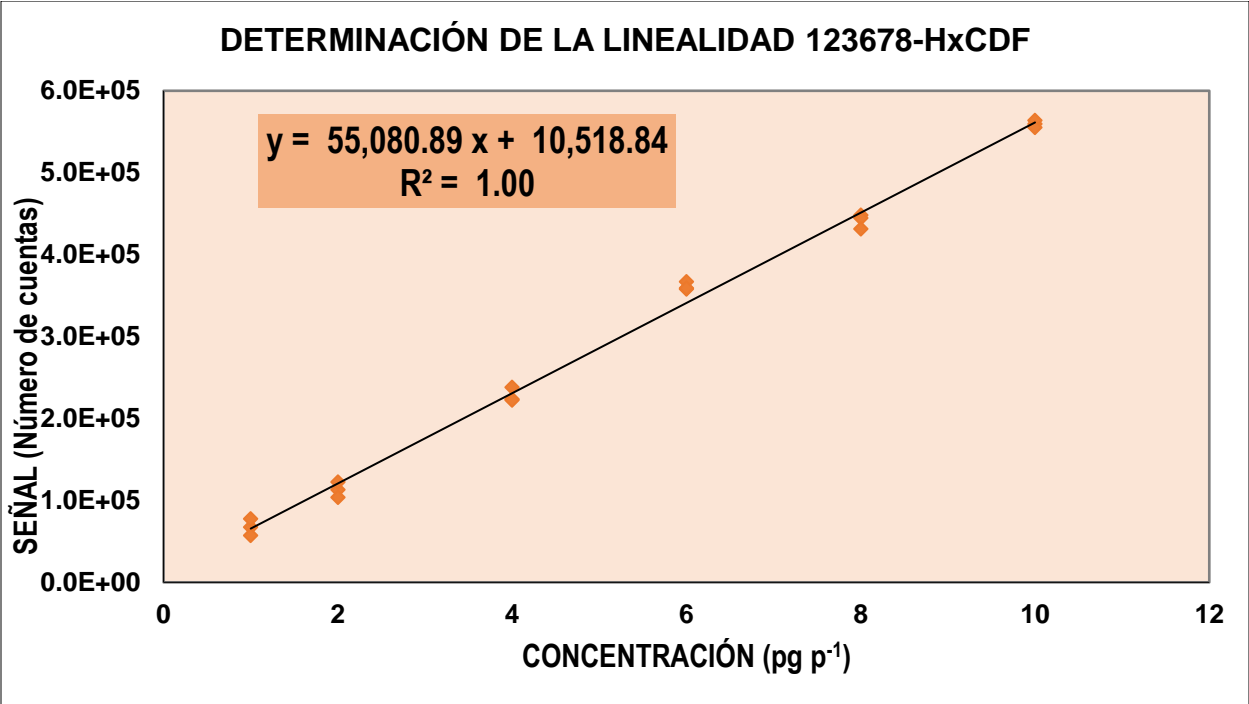
Linealidad 12378-PeCDF



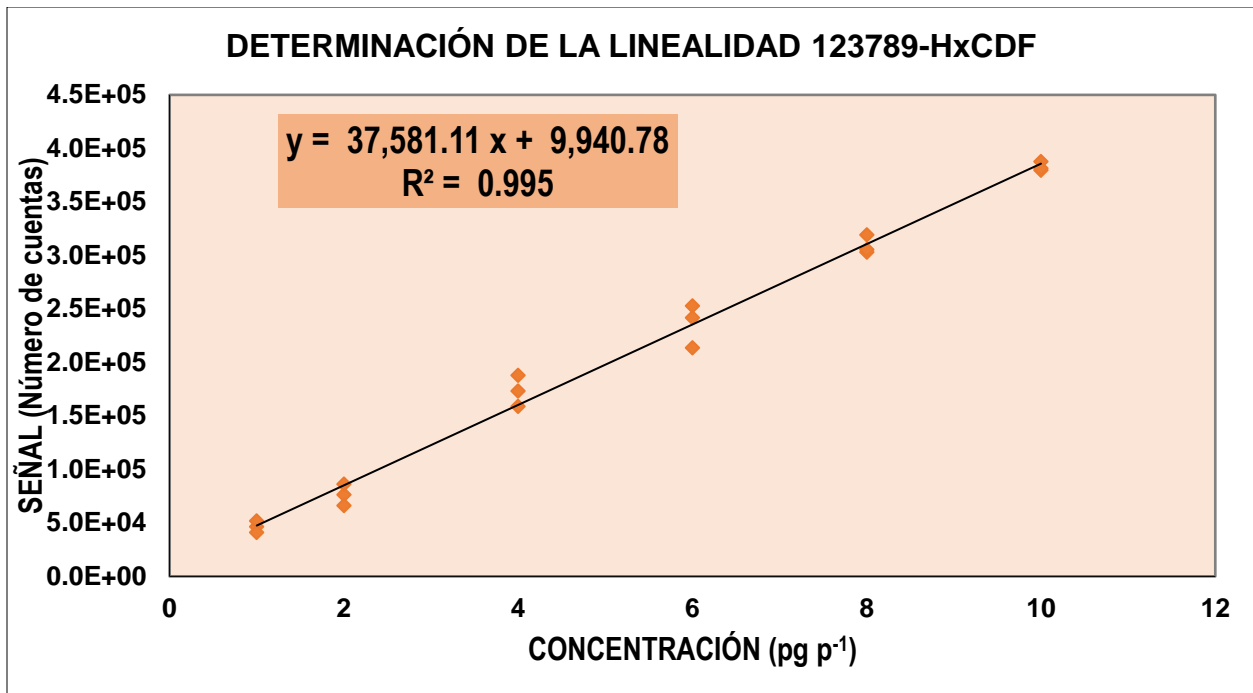
Linealidad 23478-PeCDF



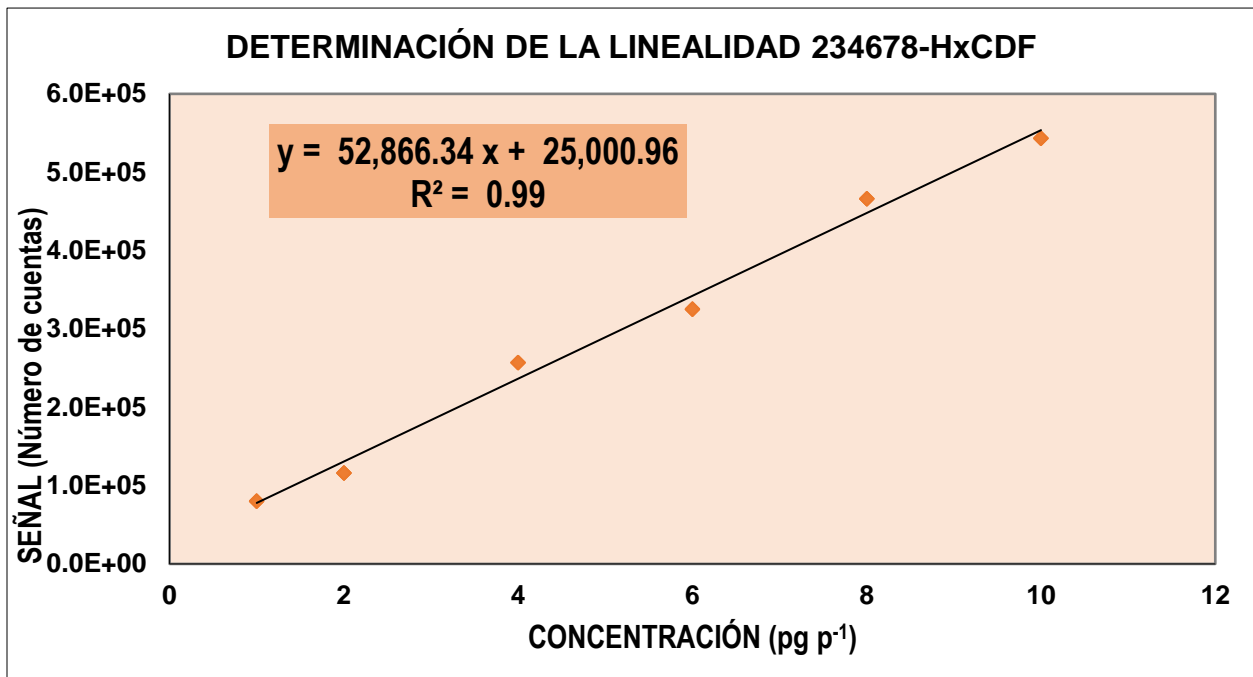
Linealidad 123478-HxCDF



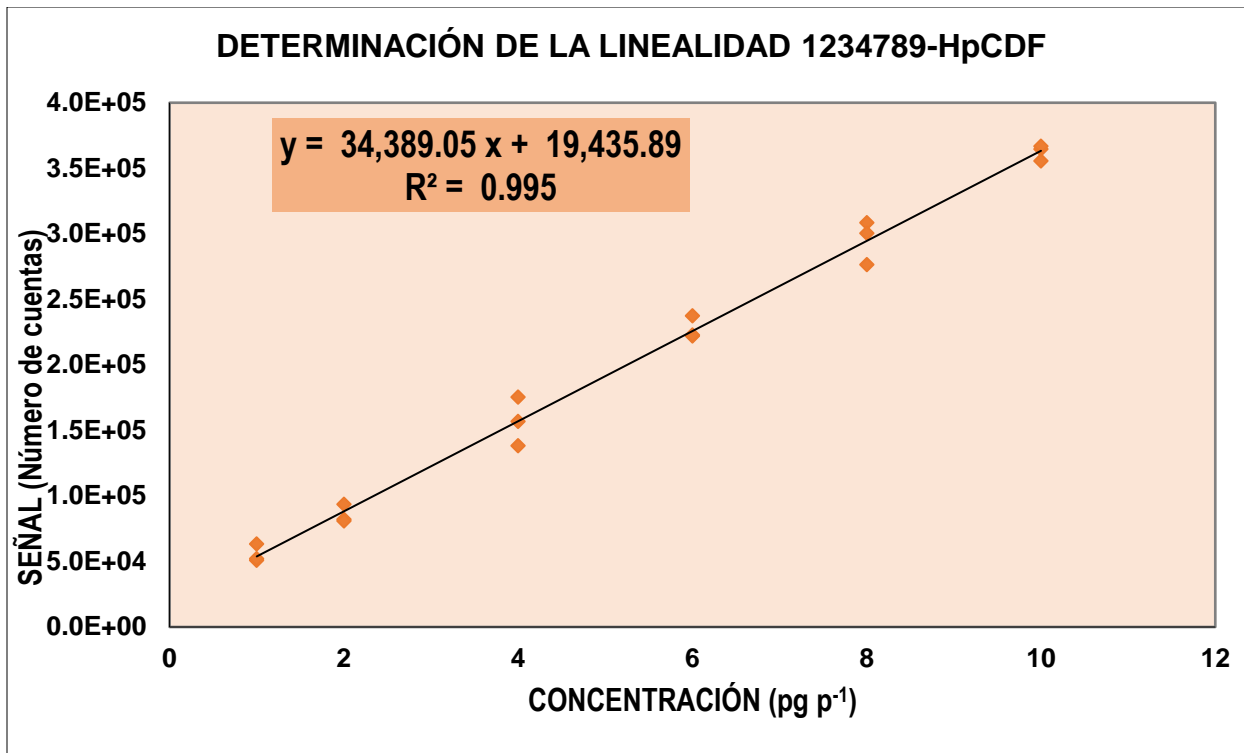
Linealidad 123678-HxCDF



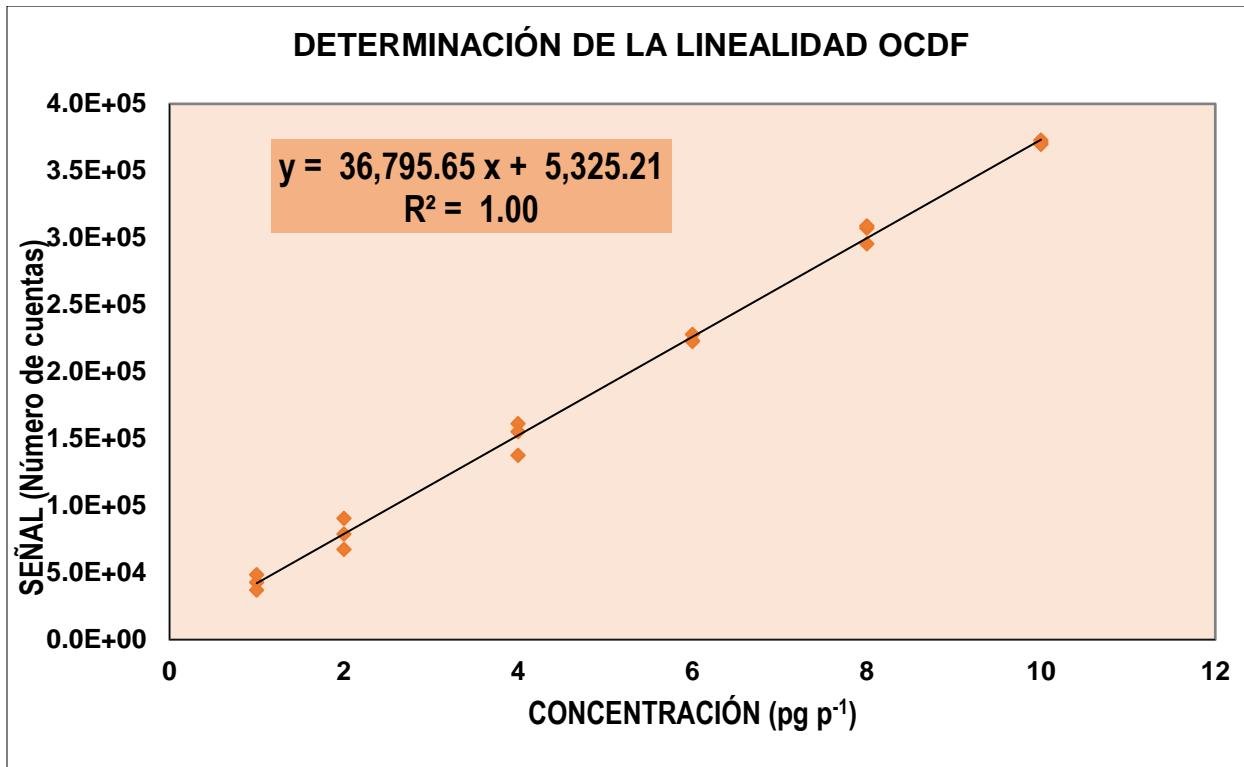
Linealidad 123789-HxCDF



Linealidad 234678-HxCDF



Linealidad 1234789-HpCDF



Linealidad OCDF

Anexo 7*Tiempos de retención de las dioxinas y furanos*

ANALITO	TR (min)
2378 TCDF	15,43
2378 TCDD	15,56
12378 PeCDF	17,44
23478 PeCDF	17,89
12378 PeCDD	18,21
123478-HxCDF	20,35
123678-HxCDF	20,43
234678 HxCDF	20,89
123478 HxCDD	21,01
123678 HxCDD	21,18
123789 HxCDD	21,42
123789-HxCDF	21,89
1234789-HpCDF	23,49
1234678-HpCDD	24,74
1234789-HpCDF	25,51
OCDD	28,72
OCDF	29,13

Anexo 8*Transiciones para el análisis de selectividad*

Nombre	Transición	
	CUANTIFICACION	CALIFICACION
2,3,7,8-TCDD	319.9 -> 256.9	321.9 -> 258.9
1,2,3,7,8-PecDD	355.9 -> 292.9	353.9 -> 290.9
1,2,3,4,7,8-HxCDD	389.8 -> 326.9	391.8 -> 328.8
1,2,3,6,7,8-HxCDD	401.9 -> 337.9	391.8 -> 328.8
1,2,3,7,8,9-HxCDD	389.8 -> 326.9	391.8 -> 328.8
1,2,3,4,6,7,8-HpCDD	423.8 -> 360.8	425.8 -> 362.8
OCCD	457.7 -> 394.7	459.7 -> 396.7
2,3,7,8-TCDF	303.9 -> 240.9	305.9 -> 242.9
1,2,3,7,8-PeCDF	339.8 -> 277.0	337.8 -> 275.0
2,3,4,7,8-PeCDF	351.9 -> 287.9	337.9 -> 274.9
1,2,3,4,7,8-HxCDF	373.8 -> 310.8	375.8 -> 312.8
1,2,3,6,7,8-HxCDF	373.8 -> 310.9	375.8 -> 312.9
1,2,3,7,8,9-HxCDF	373.8 -> 310.9	321.9 -> 258.9
2,3,4,6,7,8-HxCDF	373.8 -> 310.9	375.8 -> 312.9
1,2,3,4,6,7,8-HpCDF	407.8 -> 344.8	409.8 -> 346.8
1,2,3,4,7,8,9-HpCDF	407.8 -> 344.8	409.8 -> 346.8
OCDF	441.7 -> 378.8	443.7 -> 380.8