

67  
2 ej



# Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Química

**-2,3,7,8- TETRACLORODIBENZO PARA DIOXINA**  
**"DIOXINA"**

**TRABAJO MONOGRAFICO**  
**Que para obtener el Título de**  
**Ingeniero Químico**  
**P r e s e n t a**

**JOSE MANUEL MEDINA HUERTA**



**México, D. F.**

**1985**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



## **UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso**

### **DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

INDICE:

I	INTRODUCCION	1
II	GENERALIDADES	4
III	METODOS DE ANALISIS	45
IV	CONCLUSIONES	68
V	RECOMENDACIONES GENERALES EN RELACION CON LA PRESENCIA DE DIOXINA	71
VI	BIBLIOGRAFIA.	73

## ABREVIATURAS

2,4,5-T	Acido Triclorofenoxiacético
2,4-D	Acido Diclorofenoxiacético
ppm	Partes por millón = $\frac{\text{miligramo}}{\text{Kilogramo}}$
ppb	Partes por billón = $\frac{\text{microgramo}}{\text{kilogramo}}$
ppt	Partes por trillón = $\frac{\text{nanógramo}}{\text{kilogramo}}$
GC	Cromatografía de Gases
SM	Espectrometría de Masas
GC/SM.	Método acoplado de GC/SM
GC/HRMS	Cromatografía de Gases / Espectrometría de Masas de Alta resolución.
mg	miligramos
ng.	nanogramos

... ..

**CAPITULO I**

**INTRODUCCION**

## D I O X I N A

Hablar de la Dioxina, es comentar un problema de salud a nivel mundial, que a todos nos concierne porque, La Dioxina es una sustancia altamente tóxica aún en el nivel de concentración de partes por trillón, la que se produce como subproducto en la síntesis de fenoles clorados y en la producción del "Agente Naranja" (mezcla 50:50 de los butil ésteres del ácido 2,4-diclorofenoxiacético y del ácido 2,4,5-Triclorofenoxiacético ). Este "Agente Naranja", fué utilizado como defoliante o pesticida durante la década de los 60' en la Guerra de Vietnam y produjo grandes problemas de salud a la Población Vietnamita. Aunque al principio se resistieron varias Instituciones encargadas de la salud a aceptar que la Dioxina era el causante de esos daños, los estudios han continuado y se ha demostrado la peligrosidad de esta sustancia, aún por los mismos que antes la habían negado. Los reportes de intoxicaciones, daños ambientales, desequilibrios ecológicos y pérdidas de vidas humanas, así como abortos por exposición al herbicida dejaban muy poco lugar para la controversia de que la Dioxina fuera la causa de todo-ésto, ya que estos males se incrementaron cuando se incrementó el uso del Herbicida Naranja, según datos reportados de varios Hospitales Vietnamitas.

En 1974, en U.S.A., se hizo una reunión de los diferentes grupos del Gobierno ( U.S. Air Force), de las Universidades ( Harvard, Missouri, etc. ) y de la Salud ( E.P.A. Environment Protection Agency ); para saber hacia donde dirigir los estudios acerca de la

Dioxina y se concretó lo siguiente:

10.- Hacer una metodología analítica apropiada para la detección y cuantificación de la Dioxina en muestras biológicas, ambientales y en productos químicos derivados del 2,4,5-Triclorofenol.

20.- Realizar monitoreos continuos del ambiente y hacer estudios a largo plazo, para afirmar el carácter mutagénico teratogénico y carcinogénico de la Dioxina.

En 1978, una Estación afiliada a la CBS en Chicago, sacó una fil-mación titulada " Agente Naranja, La Niebla Mortal de Vietnam ", - en la que se hace un estudio de los riesgos de exposición al her- bida naranja y se da un pronóstico de que los soldados veteranos de Vietnam, sufrirán riesgos de exposición a largo plazo. Este pro-nóstico parece haberse cumplido ( ya que en mayo de 1984, en el - Periódico "El Excelsior", publica un artículo cuestionando que se indemnizará a los soldados de Vietnam por qu-brantos de salud, cau- sados por la exposición a la Dioxina ).

Para detectar la Dioxina, se requieren métodos analíticos muy sen-sibles y específicos. La Cromatografía de Gases, en combinación - con la Espectrometría de Masas, ha demostrado ser el principal -- Método que reúne estos requisitos.

LOS OBJETIVOS DE ESTE TRABAJO MONOGRAFICO SON:

- 10.- Informar de la Metodología Analítica apropiada para la detección y determinación de Dioxina - en muestras ambientales.
  
- 20.- Dar a conocer los riesgos de salud a los que están expuestos los trabajadores o personal -- que manipule productos sospechosos de contener como impureza a la Dioxina. O bien a personas que hayan estado expuestas a la Dioxina y tratar de que las Autoridades Sanitarias Nacionales y Extranjeras inicien, impulsen o continúen los estudios de la Dioxina, según sea el caso.



**CAPITULO            II**

**GENERALIDADES**

## 2.- GENERALIDADES

### 2.1.- PLAGUICIDA:

#### 1.- Concepto de Plaguicida.

Demoninamos plaguicida a las sustancias que sirven para combatir parásitos de los cultivos, del ganado y de los animales domésticos así como del hombre y del ambiente; reguladores del crecimiento de vegetales y defoliantes.

#### 2.- Clasificación.

Los pesticidas se clasifican según el tipo de organismo al que atacan.

Los insecticidas son productos químicos, tóxicos para los insectos, los acaricidas para los ácaros, los fungicidas combaten los hongos, los antibióticos combaten el desarrollo de microorganismos, los herbicidas, atacan a las malas hierbas, los rodenticidas, matan a los roedores, los atrayentes y repelentes de insectos, coadyuvan a su destrucción, por medio de estas acciones.

#### 3.- Cualidades exigibles a un plaguicida comercial.

Destacan las siguientes:

##### a).- Efectividad:

- El Plaguicida debe ser eficaz en la destrucción de la plaga contra la cual se aplica.

b).- Selectividad:

- El plaguicida debe destruir a determinados insectos o plagas, sin perjudicar a la flora o a la fauna beneficiosa.

c).- Economía:

- El uso de plaguicida, debe producir beneficios que superen los costos que supone su utilización. Por regla general se considera que el uso de un plaguicida es recomendable cuando el gasto a realizar es inferior al 20% de incremento sobre la cosecha que se obtendría sin combatir la plaga. También se considera económico cuando siendo efectivo el costo del tratamiento, representa un 5% del valor de la cosecha. Además en todo caso debe resultar competitivo con respecto a los otros medios de lucha.

d).- Seguridad:

- El plaguicida no puede ser fitotóxico no constituir un peligro para salud del hombre o de los animales domésticos.

e).- Posibilidad de formulación:

- El plaguicida debe ser compatible con alguno

de los posibles soportes y diluyentes, dando lugar a formulaciones estables, selectivas y efectivas

f).- Estabilidad:

-El plaguicida debe conservar su capacidad de acción durante un tiempo suficiente.

4.- Problemas planteados por el desarrollo de los plaguicidas:

El uso racional de los plaguicidas exige el conocimiento de -- los problemas biológicos relacionados con el control de plagas problemas que son numerosos y en algunos casos de difícil solución.

" Los plaguicidas alteran el balance de la naturaleza, desequilibrando los sistemas ecológicos; además algunos insectos y otros parásitos desarrollan razas resistentes a los plaguicidas, lo que hace necesario utilizar mayores dosis o productos de mayor efectividad. Por otra parte han de considerarse detalladamente los posibles efectos tóxicos para personas y animales " .

5.- Desequilibrio Ecológico:

La eliminación de una especie en un sistema ecológico, da como resultado la multiplicación de las que compiten con ella. Otros desequilibrios ecológicos se producen a causa de la dispersión de los tratamientos que al afectar a la fauna selvática

ca dan lugar a la disminución continua de la población de algunas especies.

#### 6.- Determinación de la Toxicidad:

La toxicidad en los plaguicidas se establece mediante experimentación con animales. La expresión cuantitativa de la toxicidad es representada mediante la dosis letal media ( $DL_{50}$ ), que corresponde a la cantidad necesaria para causar la muerte al 50% de los individuos que constituyen el lote de ensayo. La dosis letal media se expresa en mg. de plaguicida por kg. de animal tratado en ensayo.

Las toxicidades ( $DL_{50}$ ) pueden hacer referencia a toxicidad oral aguda es la que resulta de la ingestión en una sola ocasión de una cantidad determinada, de tóxico.

La toxicidad crónica se expresa como las partes por millón de tóxico presente en la dieta alimenticia durante los días que se especifiquen, y que produce los efectos que se señalen. Se establece incorporando el producto estudiado, a la dieta de varios lotes de animales, en una proporción determinada para cada lote; después de observar los efectos tóxicos producidos ( mortanda; alteraciones anatomopatológicas, desarrollo defectuoso, etc. )- en espacios de tiempo determinados.

La toxicidad dérmica se establece mediante la absorción del tóxico por pincelación sobre la piel con el producto en estado puro ó diluído en disolventes apropiados o a la concentración que se indique en cada caso. Es de mucho interés debido a que valo-

ra las posibilidades de intoxicación por absorción del plaguicida a través de la piel. Se determina sobre lotes de animales - aplicando igual cantidad a todos los de un lote, con objeto de establecer la dosis que produce la muerte del 50% de los individuos, y se expresa también en miligramos de plaguicida por - kg. del animal. En ocasiones también se indican los efectos - tóxicos observados y el grado de penetración del plaguicida.

## 2.2.- DIOXINA.

### 1.- Historia de la Dioxina:

La 2,3,7,8-Tetracloridibenzo-p-Dioxina ( otros nombres --- son Dioxina , 2,3,7,8-TCDD y TCDD ), es una sustancia quí mica que históricamente ha sido asociado con cualquier -- proceso que use 2,4,5-Triclorofenol como materia prima. Se ha encontrado Dioxina como contaminante, en gran pro-- porción en la síntesis del ácido 2,4,5-Triclorofenoxiacé-- tico ( 2,4,5-T ); que emplea como materia prima el - - - 2,4,5-Triclorofenol.

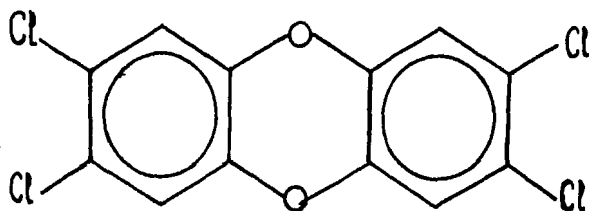
Durante la década de los 60', la producción de 2,4,5-T -- fué de 48'264,740.00 kg, el año de mayor producción fué - el de 1968 con 7'945,000.00 kg. ( que constituye el 16% - del total aproximadamente, del período de los 10 años de producción ) y en 1969, declinó a 2'270,000.00 Kg.

La producción del período de los 10 años se muestra en la Fig. 1

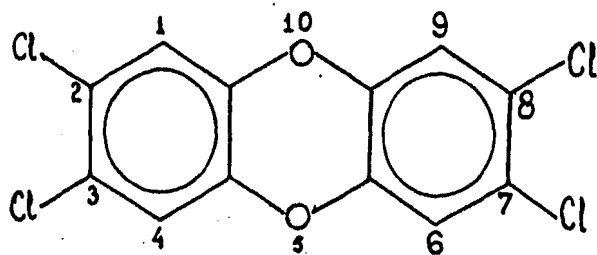
### 2.- Dioxina y el Agente Naranja:

La mejor estimación sobre el contenido de la Dioxina en - el Agente Naranja, proviene de los estudios realizados -- por la Fuerza Aérea de los EE.UU. en 20 muestras del "Her-- bicida Naranja", que es una muestra 50:50 de los butil -- ésteres del 2,4,5-T y del 2,4-D ( ácido 2,4-Diclorofenoxi-- acético ). Las observaciones no se publicaron pero el pro-- medio aritmético del contenido de Dioxina en la mezcla, - fué 1.91 ppm.

## 3.- ESTRUCTURA Y NUMERACION



## ESTRUCTURA

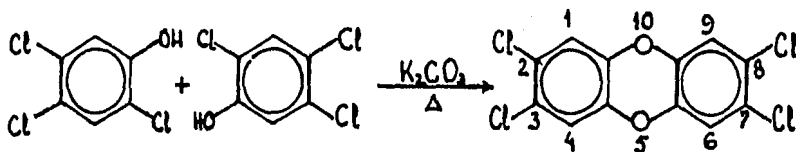


## NUMERACION



## 4.- METODOS DE OBTENCION:

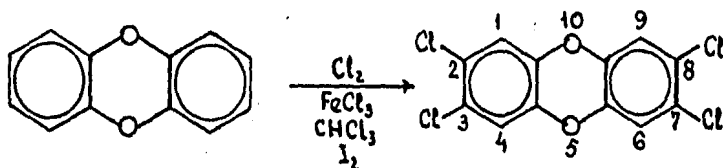
## a).- Reacción de condensación:



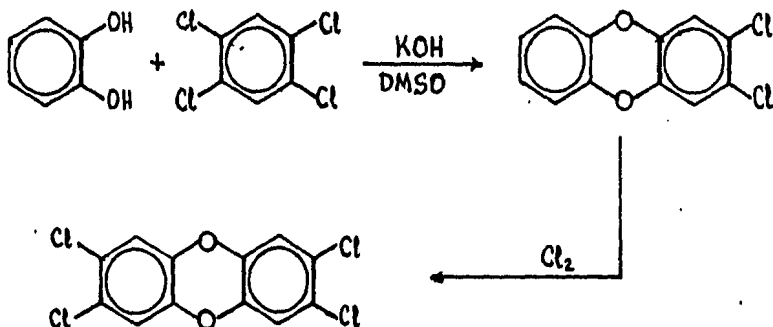
Esta reacción implica la condensación de dos moléculas entre sí en presencia de una base alcalina o de su sal, esta técnica es bastante difícil y exige un calentamiento prolongado a una temperatura alrededor de  $230^\circ C$ , ella conduce a un producto con muchas impurezas, lo cual disminuye el rendimiento de la reacción, se ha podido, sin embargo obtener el laboratorio por modificación de los procedimientos una gran mejoría en el rendimiento de la reacción, dando con ello una mejoría en la pureza de la TCDD sintetizada.

b).- Cloración del núcleo preformado:

Por acción del crolo gaseoso en presencia de Iodo y cloruro férrico en el  $\text{CHCl}_3$ , este método también da mezclas de derivados clorados de la Dioxina, pero se puede evitar fácilmente la formación de productos parásitos operando en condiciones suficientemente suaves y controlando el curso de la reacción.



c).- Condensación de sales de potasio de catecol sobre, 1,2,3,4-Tetraclorobenceno, seguido de la cloración del producto obtenido.

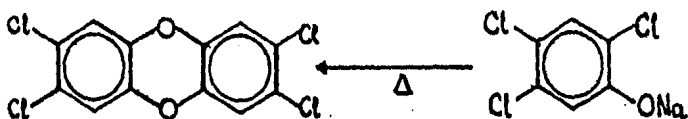
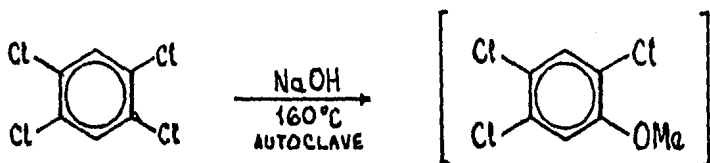


La utilización de dicloro 4,5 catecol forma directamente la --  
Dioxina, pero el rendimiento es menor.

d).- Formación accidental de la Dioxina.

Resulta del primer modo de síntesis de la Dioxina visto antes --  
en el inciso a), cada vez que el tricloro 2,4,5-fenol, se ha --  
llevado a temperaturas iguales o mayores de 300°C, en medio --  
alcalino hay riesgo de formación de Dioxina. Esto es lo que da  
una explicación de la presencia de Dioxina, en proporciones más  
o menos grandes en Triclorofenol Industrial y, en los deriva--  
dos de éste, tales como 2,4,5-T y 2,4,5-Triclorofenol y de ---  
otros compuestos a base de este fenol: ( Nota: Es sin duda el-  
caso del Hexaclorofeno que se deriva de este último ).

El Triclorofenol es preparado industrialmente según esquema --  
que se muestra en la siguiente página ). Por acción de Meta--  
nol en presencia de sosa cáustica, sobre Tetracloro 1,2,4,5-Ben-  
ceno a 160°C y presión baja. Basta un elevamiento de la tempe-  
ratura de reacción para que se formen cantidades más o menos -  
grandes de Dioxina. De hecho en las preparaciones industriales  
corrientes, esta concentración de Dioxina, puede varias de 1-30  
y hasta 40 ppm.



#### 5.- Propiedades Químicas y Físicas:

La Dioxina es un hidrocarburo aromático-clorado el más tóxico representante de un grupo de Dibenzo Dioxinas Cloradas.

Aspecto:	La Dioxina se presenta en forma de cristales incoloros.
Fórmula Condensada:	$\text{C}_{12}\text{H}_4\text{Cl}_4\text{O}_2$
Peso Molecular:	322 g/mol.
Punto de fusión:	305-306°C
Temperatura de descomposición.	800°C
Solubilidad:	Aunque TCDD es lipofílico, es débilmente soluble con la mayoría de los compuestos orgánicos. ( Ver Tabla 1)
	Aunque es insoluble en agua y etanol se disuelve fácilmente con acetona - cloroformo y dimetilsulfóxido (DMSO)
Número de Isómeros:	22

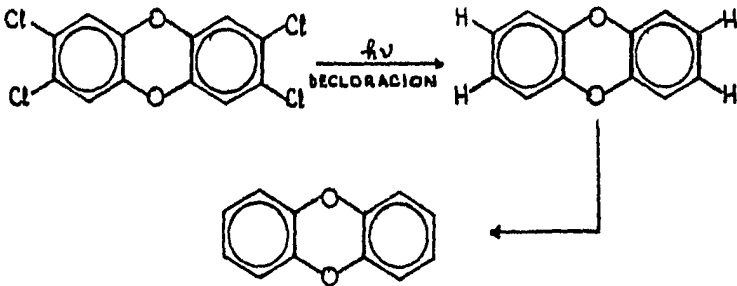
## 6.- Reacción de Identificación:

I.- La Dioxina, reacciona con los ácidos fuertes ( $H_2SO_4$ , Tri-fluorometano-Sulfónico, etc. ), en presencia de un oxidante como  $H_2O_2$  ó  $KNO_3$  para dar una colocación azul específica; propiedad que permita agroso modo un primer ensayo-para confirmar la presencia de la Dioxina.

## II- Reacción fotolítica:

En solución alcalina, la Dioxina se degrada más o menos -lentamente por la acción de la luz natural o artificial - la reacción de fotodescomposición se realizó a una longitud de onda de absorción máxima para TCDD 307 nm. en metanol.

Según la reacción:



Por radiación ultravioleta con una intensidad de 100 Mw/cm<sup>2</sup>.

Ver. Figura No. 2.

La fotólisis fué ejecutada en un frasco de vidrio de boro silicato sellado y el cambio de concentración fué determinado por cromatografía de gases, como se esperaba, la decoloración reductiva ocurre durante la irradiación, y así los tetra ó los octa-cloro compuestos han desaparecido - (picos de retención más cortos se registraron en la cromatografía de gases / espectrometría de masas. )

La Octa-Cloro-Dibenzo-p-Dioxina, fué fotolizada mucho más lentamente que TCDD ( Figura No. 2 ). La rapidez de fotólisis de la Dioxina se incrementa si el número de átomos de cloro decrece.

Se obtuvieron resultados similares cuando la Dioxina en Metanol fué expuesta a la luz del sol durante 36 Hrs., en un tubo de vidrio borosilicato ( Fig. No. 3 )

La actividad biológica de diversos herbicidas halogenados en agua es destruída por la radiación ultravioleta. Esta radiación parece ser un método promisorio para quitar contaminación en cantidades pequeñas de pesticidas algunos - de estos pesticidas se mencionan en la Tabla 2.

La similitud química entre las Dioxinas Cloradas y -- otros compuestos aromáticos sugiere que tuvieron una -- conducta paralela, en cuanto a su fotoquímica. La luz - solar puede destrozarse Dioxina en el ambiente.

### 7.- Estudio de Difracción de Rayos "X"

- Por causa del interés biológico, químico y ecológico de las propiedades de la Dioxina, se han aplicado métodos de di-- fracción de Rayos "X" y sus estudios se han ampliado en estas tres razones:

- 1.- Absoluta identificación de la estructura del material - estándar primario por técnicas de cristalografía.
- 2.- Correlación de los resultados de la estructura de la -- Dioxina, con el polvo de difracción patrón, estableciendo un polvo de difracción de Rayos "X" como un conveniente y poderoso medio de identificación de isómeros: y,
- 3.- Generación de una ( usualmente ) precisa y detallada -- figura de la geometría molecular que permite futuras correlaciones entre su estructura características y su -- actividad biológica.

Como conclusiones de este estudio, se puede decir que el método de difracción de Rayos "X", es un método conveniente para identificar muestras de Dioxina y en particular para una información dada sobre los isómeros presentes.

El polvo patrón observado para la 2,3,7,8-TCDD se da en la Tabla No. 3.

#### 8.- Toxicidad;

##### a).- Animales de Laboratorio;

- La Dioxina, es sumamente tóxica en niveles de ppt. --- tiene una toxicidad acumulativa y es poco metabolizada y excretada.

Los efectos teratogénicos, fitotóxicos y genéticos han sido demostrados en animales de laboratorio.

El puerco de Guinea es el más sensible a los efectos - de la Dioxina . Tabla No. 4

En la rata y conejo, el hígado es el primer órgano ata cado; en los primates, el nivel de Dioxina en el tejido adiposo es mayor que en el hígado.

##### b).- Humanos:

- El cloracné es una de las primeras manifestaciones de la exposición a TCDD y, en casi todos los casos ha re sultado por la exposición ocupacional y ambiental.

Otro tipo de enfermedades reportadas han sido traqueo bronquitis, polineuritis, nefritis tóxica, elevada -



retención de líquidos (hinchazón general ), enfermedades del hígado y de los riñones.

Durante la Década 1960 y 1970, fué el período de máximo rociado en Vietnam ( 1968 al año pico ) del "Agente Naranja" . Se reportaron de diversos Hospitales de Vietnam que el índice de abortos y niños malformados (fisiicamente ) se había incrementado; pero a este respecto - hay controversias desde ese tiempo, según estudios médicos realizados durante ése período , no revelaron ni - cual es la dosis letal de Dioxina en humanos, ni se logró probar que efectivamente la Dioxina fuera culpable de esos abortos; sin embargo en Oregón y Wisconsin, en los Centros de Investigación de primates, se probó --- TCDD para ver el índice de abortos y su toxicidad, -- así como su posible relación a la exposición en humanos. Los resultados fueron alto índice de abortos y muerte - de la madre.

La E.P.A. en 1975, fué la primera en proponer la metodología analítica apropiada para determinar niveles de -- TCDD. Y en segundo lugar, determinar niveles reales de Dioxina en muestras ambientales y estudios toxicológicos que involucran: exposición de TCDD a largo plazo, teratología, mutagenicidad y estudios farmacodinámicos. Las investigaciones toxicológicas, incluyen reproducción

de primates no humanos, estudios de teratología, peces y vida salvaje, estudios de reproducción gestionados en -- otras Dioxinas y el monitoreo ambiental respaldado por - la DOW CHEMICAL CO, EPA, USA AIR FORCE, que incluyen:

- 1.- Investigación de patrones de uso de Erbon, Silvex, Ro<sub>u</sub>nnel y 2,4,5-Triclorofenol ( otros pesticidas sospecho<sub>u</sub>sos de contener Dioxina ).
- 2.- Establecer índices de exposición para poblaciones humanas seleccionadas.
- 3.- Monitorear peces corriente abajo, a partir de torres de enfriamiento.
- 4.- Monitorear la vida acuática en áreas tratadas con --- arroz.
- 5.- Monitorear sitios acuáticos tratados con Silvex.
- 6.- Monitorear bosques y tramos de camino
- 7.- Monitorear tejido adiposo ó leche humana a partir de áreas de alta exposición.
- 8.- Monitorear Dioxina en grasa de rumiantes domésticos - en rastros.
- 9.- Determinar Dioxina en leche de vaca.

c.- Estudios epidemiológicos, mortalidad y morbilidad;

Las enfermedades más frecuentemente observadas en trabajadores comprometidos en la manufactura de triclorofenol, 2,4,5-T y -

tes, se observa después del transcurso de la enfermedad. En la ruptura del quiste folicular se observa un extraño material granulado.

La distribución de esta lesión es predominantemente facial, y cubre particularmente las mejillas, detrás de las orejas y éstas; en los más severos casos, la nariz, el abdomen y los genitales. (20 )

El cloracné ha sido conocido por su relación con las enfermedades ocupacionales.

Una de las primeras manifestaciones poblacionales, ocurrió con trabajadores encargados de la hidrólisis de --  
1,2,4,5-Tetraclorobenceno a 2,4,5-Triclorofenol (62)

El triclorofenol fué usado como material de partida para la producción de 2,4,5-Acido Triclorofenoxiacético y sus ésteres. Un total de 31 trabajadores enfermaron. Las primeras manifestaciones de la piel fueron hinchazón seguida por erupciones en forma de acné en la cara y en otras partes del cuerpo. Las lesiones en forma de acné, fueron completamente persistentes y el máximo resentimiento de la enfermedad fué en el período de 15 a 20 meses después de la exposición. Estos autores también reportaron un trabajo experimental y dieron posteriormente una técnic de laboratorio en casos en que TCDD ha desarrollado severos casos de cloracné. Este accidente ha llevado a los -

productos relacionados, es una enfermedad de la piel llamada "Cloracné", esta enfermedad ha sido llamada también - - - - "Pernakranheit" ( ó cera acné halogenada ), Esta enfermedad de la piel se observó desde 1899 (44). Junto con los fenoles clorados, el cloracné ha sido causado por un número de compuestos clorados como son los bifenilos clorados y naftaleno clorados (60). La más distintiva lesión del cloracné es una ampulla con una elevación clorada de la piel, que mide entre 1 mm y 1 cm, de diámetro interior. Esta tiene una abertura central, la cual puede dificultarse en detección. Cerca de la cúpula contiene material oscuro o negro. Puede existir una reacción secundaria inflamatoria y se pueden presentar la melanosis, así como la hiperqueratosis. Estos cambios en la piel pueden ser producidos por una franja roja en la piel, que a veces es acompañada con síntomas de sarna. Estas lesiones de la piel se parecen a las reacciones de fotosensibilidad y dan mucha comezón.

El examen microscópico de las lesiones de la piel, demuestra una marcada dilatación en los folículos capilares, los cuales se llenan de material queratinoso. Las glándulas sebáceas están total o parcialmente atrofiadas. La hiperqueratosis y acantosis de la dermis de los alrededores usualmente acompaña a estas lesiones. La atrofia del epitelio y el adelgazamiento de las paredes epiteliales circundantes a estos quis-

autores a concluir que TCDD aparece como un contaminante en el Triclorofenol y que fué la TCDD, el agente causante del cloracné. Otro grupo de trabajadores que desarrollaron conjuntivitis crónica también se quejaron de la pérdida del apetito, fatiga, náuseas, sin embargo, no se descubrieron orígenes de enfermedades sistémicas (91) .

En 1961, reportaron un estudio sobre trabajadores que desarrollaron cloracné en tres diferentes sitios y además de éste, se presentaron otro tipo de enfermedades, tanto físicas como mentales y en diferente grado en cada uno de los trabajadores. (5)

-- En una explosión 17 trabajadores que habían sido --- empleados en la producción de pentaclorofenol en la Cía. en Nordrhein-Westfale. 11 de estos trabajadores inicialmente tuvieron bronquitis; 5 daños miocárdiales; 2 cirrosis hepática; 1 murió. En 9 casos, síntomas de neuropatía ( 7 con severo dolor en extremidades inferiores y 4 con disturbios sensoriales, 2 con parálisis parcial moderada, sin atrofia y 2 con un decremento en los reflejos del tendón de aquiles ). 7 de los trabajadores se quejaban de disturbios psicológicos, así como fatiga, manía depresiva, inercia, nerviosismo, dolor de cabeza, insomnio, decrecimiento de la lívido é impotencia. --

En otra explosión ocurrida en Alemania en dos plantas separadas, encargadas de la producción de 2,4,5-Triclorofenol, partiendo de 1,2,4,5-Tetraclorobenceno. Un grupo de trabajadores sufrieron exposición, en este grupo de trabajadores las enfermedades sistémicas aparecieron después de algún tiempo de la exposición.

Otro grupo de trabajadores, desarrollaron cloracné al estarse encargando de la producción del ácido 2,4,5-Triclorofenoxiacético partiendo de 2,4,5-Triclorofenol en una planta de Hamburgo, - Alemania. En este estudio más de 100 trabajadores fueron examinados. En 31 trabajadores expuestos en Hamburgo, en la exposición ocurrida 5 años antes.

El tiempo entre la exposición inicial y el estudio para los otros trabajadores no se reporta en este reporte particular.

Dentro del grupo de estudio las enfermedades progresaron como sigue:

- Dermatitis inicial.
- Irritación de la cara, acompañada de conjuntivitis, seguida por una gradual evolución del cloracné,
- Alteración de la pigmentación de la piel. En algunos casos hay irritación de la membrana mucosa, lo cual ocasiona taponamiento del aparato respiratorio.
- En la continuidad del estudio un determinado número de-

casos de daños al hígado, fueron observados sobre una biopsia y un típico pigmento gris, también se observó en las secciones del hígado, las cuales no fueron positivas para el fierro. Unos pocos casos de bronquitis crónica y daños al miocardio.

- En todos los casos de fatiga fué la principal queja --- así como debilitamiento muscular, particularmente en las proximidades de los músculos de las extremidades inferiores y trastornos psicológicos y neurológicos también se observaron.
- Un síndrome psicovegetativo ocurrió en la mayoría de -- los trabajadores. Otros síntomas recordados, fueron inhabilidad al concentrarse, memoria deficiente, incremento del insomnio é intolerancia del alcohol, ( 5,23,24,36,- 46,50,52,53,63,87).

### 9.- Rociado del Agente Naranja.

De 1960 a 1969, el Agente Naranja, se usó como defoliante en Vietnam y se encontró experimentalmente que estaba contaminando, con concentraciones de Dioxina que variaron de 0.5 -- ppm a 47 ppm.

Las áreas rociadas con el Agente Naranja fueron:

<u>PERIODO:</u>	<u>AREA EN M2.</u>
1960	mínimo ( no hay datos numéricos )
1966	$3.24 \times 10^5$
1967	$6.885 \times 10^9$
1968	$5.265 \times 10^9$
1969	$4.850 \times 10^9$

En 1970, se hizo un estudio para determinar los efectos de exposición al Herbicida Naranja que sufrió el pueblo de Vietnam, entre los periodos de 1960-65 ( periodo de mínimo rociado ), y de 1966-69 ( periodo de máximo rociado ).

Para este estudio se realizaron encuestas en algunos Hospitales Vietnamitas, obteniendose los siguientes datos: Para el periodo de 1960-65, el Hospital Long Dien, reporta un incremento de abortos que varió de 1.4/1000 nacimientos en 1962 a 13.4/1000 nacimientos en 1965. También se reunieron datos de 8 hospitales entre los que se encuentra: Hospital Long Dien, Hospital Provincial Baria, Hospital Provincial Da lat, Hospital Maternidad tu-Du, Hospital Maternidad Hung-Vuong, -



Hospital Provincial Bien Hoa, Hospital Provincial Tan-An. En los dos Hospitales de Saigón ( Hospital Maternidad -- Hung Vuong y Hospital Provincial Bien Hoa ), se realizaron aproximadamente el 59% de los nacimientos y contaron un total de 9,477 abortos y 1,802 malformaciones.

En 1966 a 1969 el Hospital Provincial Qui Nhon, reporta un mayor incremento de abortos que variaron de 51/1000 a - - 75/1000 nacimientos.

Otros datos aunque incompletos fueron reunidos de 15 Hospitales de los cuales se obtuvo un total de 99,906 nacimientos con un índice de abortos que varió ampliamente de ---- 4.7/1000 nacimientos a 62/1000 nacimientos (76)

El estudio anterior debe ser ampliamente descrito, para ver hasta que punto los datos son verídicos y cuales deben descartarse (22). También discute el hecho de que los Chinos, quienes representan una porción significativa de la población de Vietnam, fueran completamente omitidos en este estudio y que no fueron examinados en los Hospitales antes mencionados. También hubo el problema, en el estudio anterior, de que los registros no fueron llevados en forma totalmente ordenada, principalmente a lo que a deformaciones congénitas, se refiere (71 ).

En Hanoi, reportaron un incremento de tumores en el hígado de la gente vietnamita, en el período de 1955-61 de 5,492 casos de cáncer 159 fueron de cáncer hepático, y de 1962-68

de 7,911 casos de cáncer 791 fueron de cáncer hepático. Los datos epidemiológicos discutidos anteriormente no sostienen de ninguna manera la conclusión de que los tumores - en el hígado, sean ocasionados por la Dioxina. Al contrario se discute que el incremento de tumores hepáticos aparentemente ocurrió antes de que hubiera inducción debida a la Dioxina.

#### 10.- Operación Disposición:

- En abril de 1972 el inventario del Herbicida Naranja en Vietnam, fué puesto en tambores de 208 Lts. y transportado a la Isla de Johnston. El inventario total del Herbicida Naranja, fué de  $8.7 \times 10^6$  Lts. guardados en 42,000 tambores de 208 Lts. cada uno.

Para su disposición se propusieron en noviembre de 1974, los siguientes métodos:

- 1o.- Retorno a la manufactura.
- 2o.- Uso en forestación
- 3o.- Destilación
- 4o.- Reprocesamiento
- 5o.- Clorinólisis
- 6o.- Biodegradación en el suelo
- 7o.- Enterrarlo profundamente
- 8o.- No actuar y, mantener el inventario
- 9o.- Incinerarlo.

A continuación se da una leve descripción de cada opción:

1o.- Retorno a la manufactura:

-Esta acción de disposición incluye contacto con diversas manufacturas del Herbicida Naranja, para reprocesar el inventario, con lo cual las impurezas de Dioxina, podrían diluírse y eliminarse. Pero todas -

las Industrias indicaron que los costos sería demasiado altos para reprocesar el Herbicida Naranja, para propósitos de agricultura.

2o.- Uso en forestación:

El Herbicida Naranja no fué registrado en la EPA como un -- pesticida. Aunque fórmulas comerciales de los mismos herbicidas están disponibles, El Herbicida Naranja pudo haber tenido un uso potencial sobre millones de hectáreas, para limpieza de caminos y reforestación; pero el registro no fué -- obtenido por la EPA para su uso, y la decisión final quedo -- pendiente sobre el estado de 2,4,5-T. Sin embargo se hizo -- un estudio que obtuvo suficiente Herbicida Naranja de la -- Fuerza Aérea, para una prueba experimental y de reforesta-- ción por dos años, que el Herbicida Naranja contiene menos -- de 0.1 ppm de TCDD.

" Parece satisfactorio para disturbios mínimos, el manejo -- en el Noroeste del Pacífico, donde el objetivo del manejo -- fué la producción de coníferas con mantenimiento continuo -- de un habitat salvaje ".

### 3o.- Destilación:

- Fué la destilación un proceso propuesto para convertir el Herbicida Naranja en sus componentes ácidos. Este proceso fué diseñado para separar n-butil éster de 2,4-D y - - - 2,4,5-T puede entonces tener formulación y el TCDD puede ser destrozado por métodos químicos, biológicos o de incineración.

### 4o.- Reprocesamiento:

- El reprocesamiento del Herbicida Naranja en sus productos comerciales aceptables y la disminución de TCDD parecía factible en el Verano de 1975. El proceso incluye, filtración del Herbicida Naranja a través de un filtro canasta con cartón activado, para quitar TCDD. La técnica mostró ser efectiva en la reproducción de TCDD a concentraciones menores de 0,1 ppm. Aunque estos datos sugieren que es una viable opción, no fueron seguros para la EPA; además no se supo que hacer con las canastas filtro que fueran generadas en este proceso.

### 5o.- Clorinólisis:

- La clorinólisis es un proceso que rompe las moléculas de TCDD para producir  $\text{CCl}_4$ , fosgeno y  $\text{HCl}$ -(Anhidro). Un estudio de factibilidad ha demostrado que la clorinólisis bajo condiciones propias, efectivamente ha convertido a la TCDD en los productos mencionados arriba. La destrucción de TCDD

fué completa. El costo y la incertidumbre con el desarrollo del proceso a amplia escala ( $8.7 \times 10^6$  lts. del Herbicida - Naranja ), hacen dudosa la selección de este método.

60.- Biodegradación del suelo:

Esto incluye incorporación del Herbicida al suelo y subsecuente rompimiento por los microorganismos del suelo.

La biodegradación no fué aceptada como opción primaria de disposición porque se necesita aislar el terreno por un período de tres a cinco años, mientras se realizara la operación-disposición.

70.- Sepultar la disposición: ( inyección)

En este proceso se entierra el Herbicida completamente. La construcción se hace de manera que el herbicida no fluya a la superficie (ni hacia arriba ni hacia abajo), y la detección al herbicida pueda hacerse. La policía de la EPA, se opone a todo almacenaje o disposición de desperdicios en pozos profundos sin un estricto control y una demostración clara de que la superficie y abajo de ella, la contaminación no ocurra ni para el agua ni para el suelo y que ocurra la degradación de TCDD en el pozo. ( la degradación debe ser demostrada en general para cualquier producto del herbicida ). La Fuerza Aérea no pudo dar semejante seguridad, por lo tanto este método no se aprobó.

80.- No actuar:

- En una entrevista con un oficial del proyecto para la operación disposición, se dijo que: " Continuará almacenado - hasta que el problema de disposición pase "...

90.- Incineración:

Este método fué aceptado a pesar de tener los siguientes problemas:

Las unidades de incineración en los EE.UU. fueron localizadas en Centros Poblacionales, Los Gobiernos Locales y Estatales- se opusieron a la importación y transporte para disposición- en sus jurisdicciones.

La incineración sobre la Isla de Johnston puede requerir mayor eficiencia que en el mar, por causa de la ecología de la Isla. El tiempo requerido para incinerar el inventario puede - ser aproximadamente 200 días.

La opción eventual adoptada por la Fuerza Aérea de los EE.UU fué la destrucción del Herbicida Naranja por incineración en el mar.

El buque selccionado para la incineración fué el "VULCANUS"- el cual fué equipado para transportar é incinerar productos- químicos líquidos riesgosos de Puertos del Norte de Europa;- fué aprobado por participar en incineraciones de desperdicios del mar del Norte.

El sistema de incineración consiste en dos cámaras de combustión instaladas directamente a la popa sobre la cubierta. Cada uno de los incineradores enladrillados tuvo un diámetro externo de 5.50 mts., y un diámetro interno de 4.8 mts. y una altura total incluyendo la bodega de 10.45 mts. El volumen de cada cámara de combustión fue calculado para ser de 87.9 mts. <sup>3</sup>. Cada cámara de combustión tuvo tres mecheros con sistema de inyección de copa rotatoria el cual provee un remolino de turbulencia y distribución de la alimentación de combustible a lo largo de la cámara total.

La incineración fue conducida en un área designada de 80 a 96 Kms. libres de navíos y sobre el mar tropical abierto y bajo el viento de la Isla de Johnston. El combustible diesel fue llevado a las cámaras para alcanzar la temperatura requerida de 1400°C ( la máxima temperatura de operación reportada fue de 1600°C ).

La alimentación de desperdicios y el reflujo de aire fue cuidadosamente controlado, hasta alcanzar la combustión completa. Cuando las cámaras alcanzaron su temperatura de combustión, fueron alimentados con el Herbicida Naranja concentrado.



El Herbicida Naranja fué bombeado a todas las cámaras de 9-10 Tons. métricas / hora para un total de bombeo diario de 524 - Tons. Métricas. Por lo tanto se requirió de 26 días de incineración continua para quemar (  $8.7 \times 10^6$  lts. ) el inventario. Por la capacidad del barco, se requirieron 3 viajes, en el primer viaje se quemaron 3'505,750 Lts. y el remanente -- más los disolventes empleados para su limpieza fueron quemados en el tercer viaje.

En la terminación de la incineración del herbicida naranja - en Septiembre de 1977, se despertó el interés militar de los Herbicidas, pero esta cuestión, no está totalmente concluida.

REPORTE DE 1978 DE LA FUERZA AEREA  
DE EE, UU.

=====

El reporte incluye una revista de la literatura mundial del destino ambiental, toxicología, accidentes industriales y -- otros episodios asociados con la exposición al herbicida fenoxi y compuestos químicos relacionados. En adición se incluye una revista de herbicidas usadas en Sudvietnam y una descripción de la higiene industrial y ambiental, programas de monitoreo conducidas por el herbicida naranja y operaciones de disposición durante el verano de 1977 ( Proyecto Pacer HO)

El objetivo de este reporte fué dar una perspectiva de los riesgos de salud entre el personal Militar de EE.UU. quienes estaban asociados con el uso del herbicida naranja en Sudvietnam.

Un resumen del reporte técnico , con sus conclusiones es:

- Los dos herbicidas fenoxi 2,4,5-T y 2,4-D, fueron extensamente usados en la agricultura desde mediados de 1940 durante el período de 9 años de 1961 a 1966 aproximadamente ---  $35.412 \times 10^6$  kg. de 2,4,5-T fueron de uso doméstico en --- EE.UU. entre 1961-1971, aproximadamente  $10.976 \times 10^6$  kg. de 2,4,5-T 7% fueron herbicidas púrpura, rosa y verde. El 2,4,5-T en estos últimos herbicidas mantenía concentraciones relativamente altas de TCDD, representante de una tercera parte de TCDD diseminado en Sudvietnam. El herbicida púrpura , verde y rosa, fueron realmente poco aplicados en el Sureste asiático en áreas forestales, pero pequeñas -- fuerzas militares de EE.UU, en un período de tres años, -- El uso del Herbicida Naranja en Sudvietnam, fué con el -- propósito de descubrir al enemigo en el follaje de la densa jungla.

Las áreas rociadas era semipobladas y forestales.

La exposición del personal activo encargado directamente del manipuleo y diseminación pudo tener absorción percutánea por un contacto continuo y por la inhalación de valores/aerosoles. La absorción percutánea puede ser mínima por el

uso de sistemas de transferencia cerrados y el uso del equipo protectivo empleado en las operaciones en tierra: como son mascarillas especiales y ropa de aleación especial.

TABLA 1

TABLA DE SOLUBILIDAD DE 2,3,7,8-TETRACLORODIBENZODIOXINA.

DISOLVENTE:	SOLUBILIDAD	
	g/100 ml,	% en peso
0-Diclorobenceno	0.18	0.14
Clorobenceno	0.080	0.072
Percloroetileno	0.068	0.048
Cloroformo	0.055	0.037
Benceno	0.047	0.057
Acetona	0.009	0.011
Dimetilsulfóxido (a)	0.01	0.01
Metanol.	0.001	0.001
Agua	0.0000002	0.0000002 (0.2 ppb)

## OBSERVACIONES:

El DMSO, disminuye la sensibilidad  
al ensuciar el detector.

TABLA No. 2

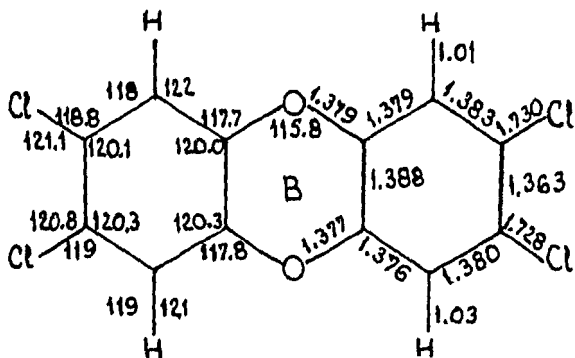
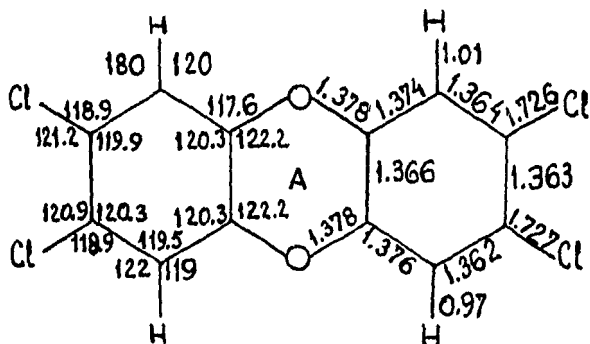
## ALGUNOS PESTICIDAS BASADOS EN POLICLOROFENOLES.

NOMBRE COMUN	USO	NOMBRE QUIMICO
2,4-D	Herbicida	AC- 2,4-Diclorofenoxiacético
2,4,5-T	Herbicida	AC 2,4,5-Triclorofenoxiacético.
Nitrofen	Herbicida	2,4-Diclorofenil y nitrofil-eter.
Genita	Acaricida	2,4-Diclorofenil Benzensulfo nato.
Silvex	Herbicida	AC 2-(2',4'-5'-Triclorofe--noxi-Propiónico. )
PCP	Herbicida Insecticida Preservativo de madera	Pentaclorofenol.
Erbón	Herbicida	2-(2',4',5'-Triclorofenoxi) etil. 2,2-Dicloropropionato.
Ronnel	Insecticida	0,0-Dimetil 0-2,4,5-Triclorofenil fosforotioato

TABLA No. 3

ANGULOS Y ENLACES ATOMICOS DE LA DIOXINA, OBTENIDOS POR DIFRACCION

DE RAYOS " X "



Las moléculas A y B son de la Dioxina y presentan el siguiente rango de variación :

ENLACES ( AMSTRONG )

C-C  $\pm$  0.003  
 C-O  $\pm$  0.005  
 C-Cl  $\pm$  0.003  
 C-H  $\pm$  0.002

ANGULOS ( GRADOS )

C-C-C  $\pm$  0.2  
 C-O-O  $\pm$  0.2  
 C-C-Cl  $\pm$  0.3  
 C-O-C  $\pm$  0.2

TABLA 4

## NIVELES DE TCDD DANDO VARIOS EFECTOS BIOLÓGICOS

E F E C T O	CANTIDAD DE DIOXINA, HASTA - OBTENER EFECTOS, PPT/PESO DE CUERPO.
<u>LETALIDAD:</u>	
Rata hembra, dosis oral simple LD <sub>50</sub> (Observaciones terminadas en 44 días)	45,000
Rata macho, dosis oral simple LD <sub>50</sub> (Observaciones terminadas en 44 días)	23,000
Puerco Macho de Guinea, dosis oral simple LD <sub>50</sub> (Observaciones terminadas en 50 días)	600
<u>TERATOGENICIDAD:</u>	
Hemorragia intestinal y edema subcutáneo en 50% ( en 6-15 días ). Dosis oral diaria.	125- 500
Edema y muerte de pollo embrión. Inyección única.	20
<u>CAPTURA MITOTICA:</u>	
Lirio endosperma, concentración ambiental.	2,000
<u>LETALIDAD:</u>	
Conejo Hembra y macho. Dosis oral de 6 a 39 días. Dosis cutánea. ( 12 a 22 días ).	115,000 275,000

FIGURA 1.- Producción y consumo de 2,4,5-T en EE.UU. (1960/1970)

Año	Consumo (Millones de Kg/año $\times 10^6$ )	Producción (Millones de Kg/año $\times 10^6$ )
60	2.59	2.90
61	2.36	3.10
62	3.63	3.80
63	3.27	4.18
64	4.00	5.13
65	3.27	5.10
66	7.72	6.90
67	6.95	6.67
68	6.99	7.95
69	7.45	2.18
70	-	2.18

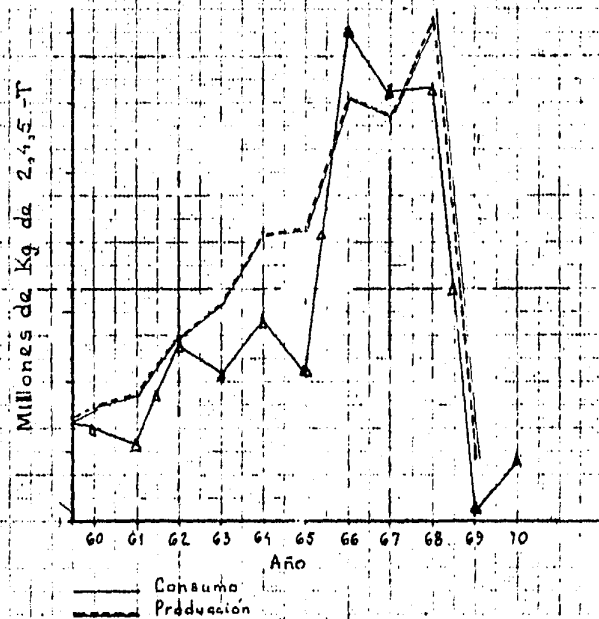
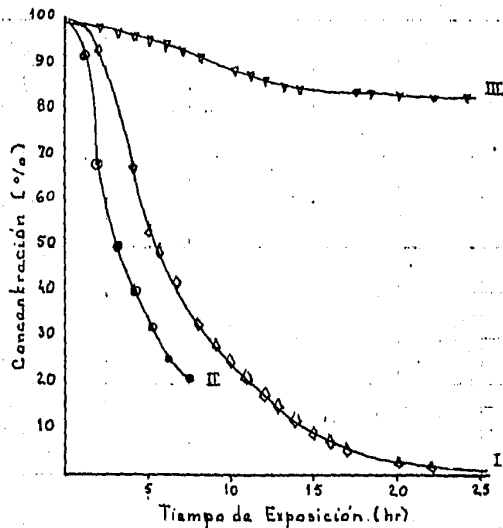




FIGURA 2.- FOTOLISIS DE DIOXINAS CLORADAS EN METANOL BAJO LUZ ULTRAVIOLETA

Tiempo de Exposición (hr)	Concentración		
	I	II	III
0	100	100	100
1	99	91	99
2	90	69	98
3	82	60	97
4	68	42	96
5	54	32	95
6	50	25	94
7	42	21	93
8	33		91
9	29		90
10	25		89
11	22		88
12	18		87
13	16		85
14	12		84
15	9		84
16	7		84
18	5		84
20	2		83
22	1		83
24	0		83



I.- 1,2,7,-TCDD, 5 mg/lit.

II.- 2,7- Dicloracloridibenzo-p-Dioxina, 5 mg/lit.

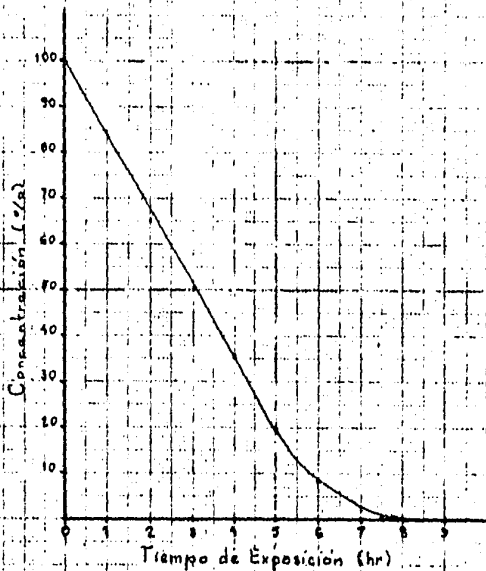
III.- 1,2,3,4,6,7,8,9-Octacloridibenzo-p-Dioxina, 2.2 mg/lit.

FIGURA.3.- Velocidad de fotólisis de 2,3,7,8-TCDD  
( 5 mg/lit. en Metanol), con luz solar.

Tiempo de  
Exposición (hr)

Concentración  
(%)

0	100
1	83
2	65
3	50
4	36
5	19
6	8
7	2
7.5	0



**CAPITULO III**  
**METODOS DE ANALISIS**

Hay varios métodos Analíticos posibles para la determinación de Dioxina. Sin embargo, después de la revisión de varios artículos se ve que el método más utilizado es el de la Cromatografía - de gases combinado con la espectrometría de masas por ser altamente sensible y específico, estas propiedades del método son de importancia fundamental en la determinación de Dioxina en mezclas - de Herbicidas organo-clorados con sustratos ambientales (suelo, - agua, tejido, biológico, etc.) por que la Dioxina se encuentra en concentraciones que varían de ppt a ppm y por que en el momento de la determinación espectrométrica otras sustancias (generalmente - Bifenilos policlorados) causan interferencia si no fueron eliminados durante el procedimiento de limpieza de la muestra.

La Cromatografía de gases - Espectrometría de masas (GC-MS), es un método que presenta variantes en cuanto a la preparación, extracción y limpieza de la muestra como veremos a continuación.

METODOS DE DETERMINACION DE 2,3,7,8-TCDD, EN MUESTRAS AMBIENTALES  
( CROMATOGRAFIA DE GASES - ESPECTROMETRIA DE MASAS )

METODO I

1.1.- Preparación de la muestra:

- Se toman de 20 a 50 g. de una muestra y se le hace la extrac  
ción con 100 ml. de una mezcla ( 1:1 ) de n-Hexano-acetona,  
agitando fuertemente durante 60 minutos.

El extracto se divide en 2 porciones y se les agregan 50 y  
100 ml. de agua, respectivamente, a una de las porciones se  
le agrega 1 ml. de LiOH 5N. En caso de formación de emul--  
sión , se agrega  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anh. para romperla.

Se toma una alícuota de la fase orgánica de 25 ml. que co--  
rresponde a una concentración de 10-25 g. de la muestra y -  
se pasa a través de una columna de prelavado ( con dimensio  
nes de 20 cm. de largo X 1 cm. de diámetro ), conteniendo -  
una capa de sulfato de sodio anh. de 3 cm. de grueso, otra--  
capa de celita -  $\text{H}_2\text{SO}_4$  de 5 cm. de gruesa y por último, ---  
otra capa de 3 cm. de sílica de malla 70.

NOTA: La mezcla celita- $\text{H}_2\text{SO}_4$  se prepara con una mezcla homo  
génea de 3 ml. de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  concentrado y 20 grs. de celita. Se  
aplica presión a la columna para no tener emulsión. La co--  
lumna se lava con 20 ml. de Hexano. Los eluatos, son combi--  
nados y se concentran a 1 ó 2 ml. y se cromatografían sobre

una microcolumna.

Una vez obtenido el extracto, se procede a trabajar con Cromatografía de Gases, utilizando las siguientes condiciones:

#### 1.2.- Equipo:

- Cromatógrafo de Gases, Equipado con columna capilar de 30 - mts. de longitud, empacada con OV-101 ó OV-17 y de .35 a .37 milímetros de diámetro interno.
- Espectrómetro de Masas.

#### 1.3.- Condiciones del Equipo

##### I.- Condiciones del Cromatógrafo de Gases

- Temperatura de inyección 207-220°C
- Temperatura del Horno 275°C
- Temperatura del Detector 275°C

##### II.- Condiciones del Espectrómetro de Masas

- Temperatura de la fuente de ionización 250°C
- Presión de la fuente  $5 \times 10^{-6}$  Torr.
- Corriente del Filamento 1 mili-amper.
- Temperatura del separador 270°C
- Temperatura conexión- separador 250°C
- Energía de electrón 70 e.v.
- Voltaje de aceleración específica 3 KV. máx.

1.4.- Compuestos de referencia:

- 2,3,7,8-TCDD puro.
- 1,2,3,4 y 1,2,3,8-TCDD como estándares.

## 1.5.- Cromatogramas Obtenidos:

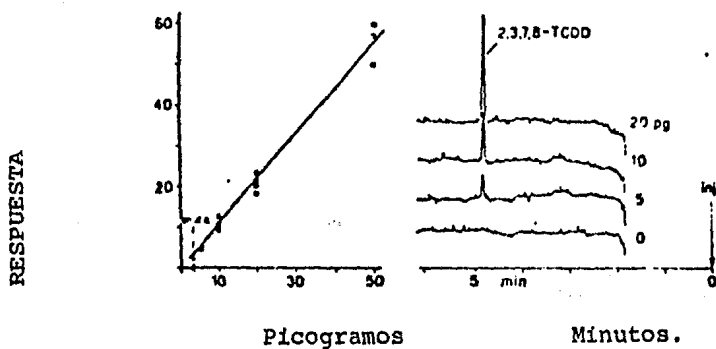


Figura No. 4

Curva de calibración ( a )

Cromatograma (b), de 2,3,7,8-TCDD, en cantidad de pg. realizada sobre una columna 25-mOV-17 a 220°C ( m.d.q. es la cantidad mínima - detectable; en este caso resulta ser aproximadamente 3 picogramos).



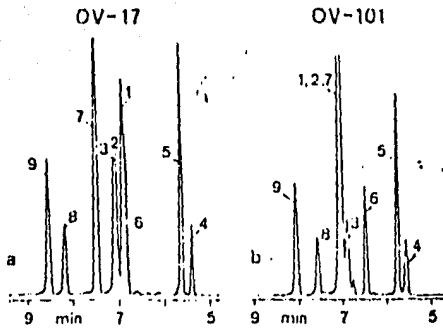


Fig. No. 5

Cromatogramas mostrando separación de 9 isómeros de la Dioxina sobre una columna capilar de vidrio operada a 207°C: (a) OV-17, 25 m, 0.37 mm. de diámetro interno, (b) OV-101, 27 m. 0.35 mm. diámetro interno.

Pico 1 = 2,3,7,8-; Pico 2 = 1,2,3,8-; Pico 3 = 1,2,3,4,-TCDD; Pico 4 y 5 = 1,3,6,8- y 1,3,7,9-TCDD o viceversa, de 2,3,5-Triclorofenol; Pico 6 y 7 = 1,4,6,9- y 1,2,6,9-TCDD o viceversa, provenientes de 2,3,6-Triclorofenol; Pico 8 y 9 = 1,2,6,7- y 1,2,8,9-TCDD o viceversa provenientes de 2,3,4-Triclorofenol.

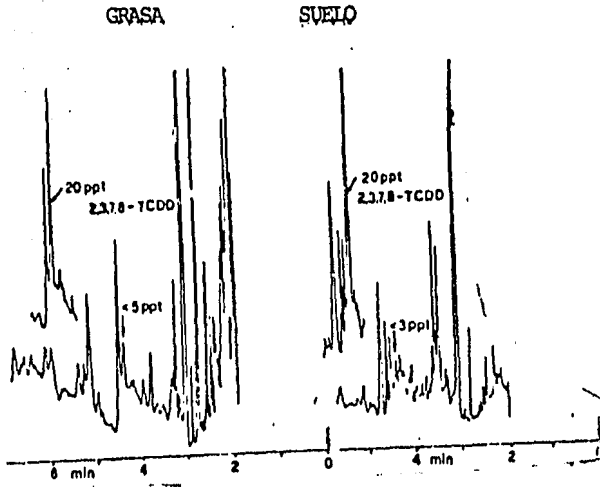


Figura No. 6

Cromatograma de grasa y suelo, muestreado en Suiza, en ausencia y presencia de 2,3,7,8-TCDD equivalente de 4-5 grs. de muestra, se inyectaron; sobre una columna capilar de vidrio 25-m OV-17.

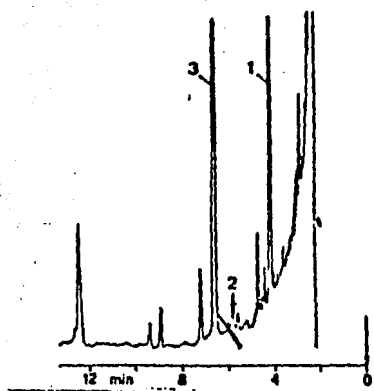


Figura No. 7

Cromatograma de muestras de suelo de Seveso, Italia, equivalente de 160 miligramos de muestra, se inyectaron sobre una columna capilar de vidrio 25-m OV-17. Las señales son: Pico 1= Triclorodibenzodioxinas . Pico 2 y 3 = Tetraclorodibenzodioxinas.

## 1.6.- Espectros de Masas:

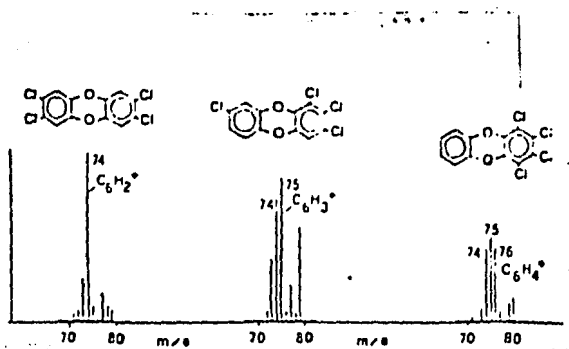


Figura No. 8.

Espectros parciales de masas 2,3,7,8-, 1,2,3,8- y 1,2,3,4-TCDD.

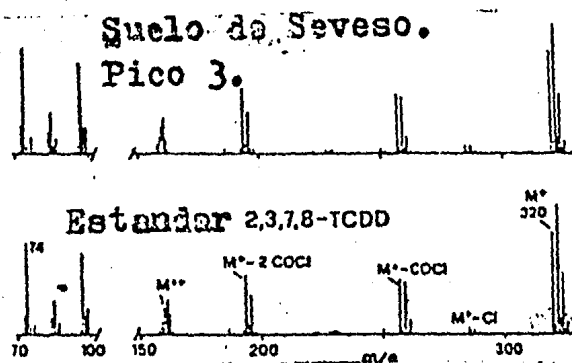


Figura No. 9

Espectros de masas de muestras de suelo ( Pico 3 ) Seveso, It.  
y espectro del estándar de 2,3,7,8-TCDD.

METODO II

## 2.1.- Preparación de la muestra:

- La muestra se pesa y se homogeniza con una o dos partes de etanol. ( hasta mezcla homogénea )
- La mezcla homogénea, se transfiere a un matraz redondo, equipado con condensador de reflujo y se fortifica con 1000 ppt de  $^{37}\text{Cl}$ -TCDD, se adicionan dos partes de KOH al 40% en agua y, la mezcla se pone a reflujo por dos -- horas.
- La mezcla se enfría y se adiciona 20 ml. de Hexano.
- Se transfiere a un embudo de separación; las fases son - separadas. A la fase acuosa se le hacen tres extracciones con porciones de Hexano iguales. Los extractos de Hexano - se combinan con un matraz y se lava dos veces con 5 ml. - de Etanol y dos veces con 5 ml. de Hexano.
- La fase de Hexano se transfiere a un embudo de separación y se extrae con hidrógeno de sodio 1N 4 veces.  
Las emulsiones fueron rotas por unas cuantas gotas de solución saturadas con carbonato de sodio y se filtra a través de una columna de carbonato de sodio y se concentra a 3 ó 4 ml.
- El residuo se cromatografía sobre alúmina activada y se eluye con 12 ml. de tetracloruro de carbono al 20% en n-Hexano, posteriormente con 1 ml. de Hexano y finalmente - con 4 ml. de Cloruro de Metileno al 20% en n-Hexano.

- La fracción de cloruro de metileno al 20%, se concentra a 50 micro litros aproximadamente y, se le adicionan de 100 a 200 microlitros de Benceno y repetir la concentración a 20 microlitros.
- Se adicionan 10 microgramos de m-terfenilo en Benceno al residuo y la mezcla se sujeta a la cromatografía preparativa.
- El producto que contiene la Dioxina se analiza por la cromatografía de gas líquido, adicionando una cantidad conocida de --- Dioxina. La cantidad de Dioxina adicionada por fracción, puede ser tres o cuatro veces la cantidad que se espera esté presente.

#### 2.2.- Equipo:

Es el mismo que se utilizó en el Método I

#### 2.3.- Condiciones del Equipo:

Similares a las del Método I

#### 2.4.- Compuestos de referencia:

Los mismos que se emplearon en el Método I

## 2.5.- Cromatograma obtenido:

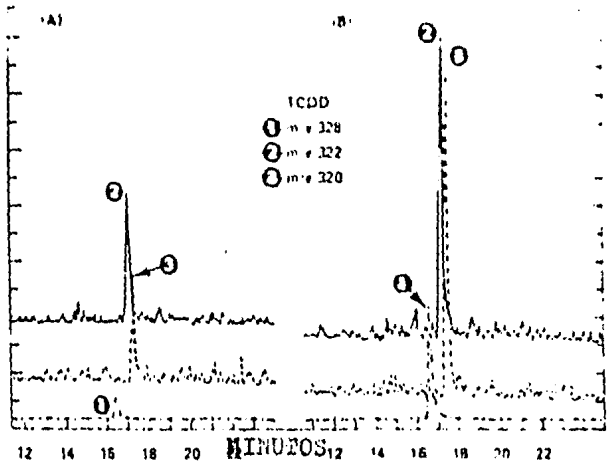


Figura No. 10

Cromatograma obtenido de un extracto de Carpa del Océano (a) -- Muestra; (B) Muestra fortificada con  $^{37}\text{Cl}$ -TCDD y TCDD ( estándar de cuantificación ). La muestra se fortificó con 5 ng.  $^{37}\text{Cl}$ -TCDD- y 37 ppt. de TCDD. Los resultados experimentales fueron 50% de recuperación de  $^{37}\text{Cl}$ -TCDD y 34 ppt. de TCDD se detectaron. El límite de detección fué de 4 ppt.



## 2.6.- Espectro de Masas

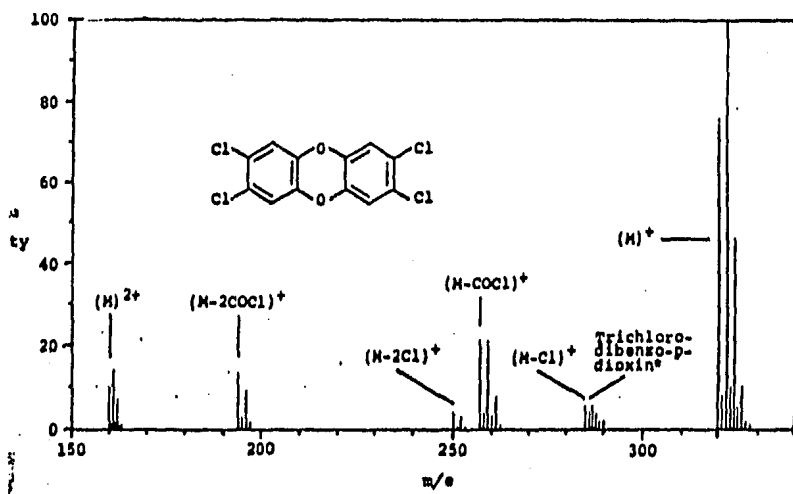


Figura No. 11

Espectro de masas de la Dioxina.

METODO III

## 3.1.- Preparación de la muestra:

- Se toman de 10-20 grs. de muestra y se muelen hasta obtener una mezcla homogénea y se transfiere a un matraz, se agregan de 5 a 10 ng. de  $^{37}\text{Cl}$ -TCDD ( como solución estándar ), 20 ml. de etanol y, 40 ml. de KOH al 45%, el cual se pone a reflujo con agitación por 2.5 Hrs., después se enfría, se transfiere a un embudo de separación y se lava con 10 ml. de etanol, enseguida con 20 ml. de n-Hexano. La solución se extráe con 4 porciones de 25 ml. de n-Hexano cada una; y los extractos de n-Hexano son combinados y coleccionados.

En el caso de que la muestra no se muele, como en el caso de leche humana, se procede de la siguiente forma:

- 10 grs. de muestra se sujetan al procedimiento de extracción similar al de la Sección anterior.

La muestra se fortifica con 2.5 ng. de  $^{37}\text{Cl}$ -TCDD y -- con 5 ppt, de Dioxina. Los análisis se hacen por triplicado, en la muestra y en la muestra fortificada.

- Agua:

Un Litro de muestra bien agitada ( incluyendo también material disuelto ), se fortifica con 2.5 ng. de ---  $^{37}\text{Cl}$ -TCDD ( solución estándar ) y se hace la extracción con tres porciones de Cloruro de Metileno. Las -

tres porciones de Cloruro de Metileno ( extractos ) son evaporados a sequedad por medio de un baño de vapor. -- 100 ml. de n-Hexano se adicionan al residuo y el n-Hexano resultante se lava con 50 ml. de potasa 1 normal --- acuosa, después se lava con ácido sulfúrico concentrado.

-- Tierra y Sedimentos.

De 10 a 20 grs. de muestra bien mezclada se fortifica con 2.5 ng. de  $^{37}\text{Cl}$ -TCDD y se pone a reflujo KOH/etanol después se enfría la solución, se decanta a un embudo de separación, por medio de un embudo de filtración empacado con fibra de vidrio. El frasco de reflujo y el embudo de filtración, se lava con dos porciones de 10 ml. de etanol c/u, seguido por 20 ml. de Hexano, la solución es extraída con 4 porciones de 25 ml. de Hexano el cual fué previamente usado en lavar el frasco de reflujo y el embudo de filtración. Los extractos combinados se someten al procedimiento de limpieza.

En cualquier tipo de muestra, una vez obtenidos los extractos, se procede de la siguiente forma:

Procedimiento de Limpieza Acido-Base, para los Extractos.

- Los extractos obtenidos, se lavan con 25 ml. de KOH ( solución 1 normal ), seguidos por 4 porciones de 50 ml. de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  concentrado y posteriormente se hace un lavado con 25 ml. de agua. --

Las capas de agua y de n-Hexano se neutralizan por la adición de carbono de sodio (polvo) . Las capas acuosas se descargan y el n-Hexano se seca pasándolo por una columna que contenga  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  ( polvo anhidro ). El Hexano se colecta en un evaporador hasta en un volumen de 3 ml. este concentrado se transfiere a una columna de alúmina que ha sido prehumedecida con 1 ml. de Hexano y es eluido con 6 ml. de tetracloruro de carbono, los cuales son desechados y, en seguida por 4 ml. de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  ( colectados en un receptor de destilación de 12 ml. ) El receptor se tapa y el  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  se evapora a sequedad con vapor . Las dos porciones separadas de 2 ml. de n-Hexano se adicionan al receptor de destilación y se evaporan a sequedad -- el residuo es disuelto en 3 ml. de n-Hexano y cromatografiado en una columna de alúmina. El Cloruro de Metileno, eluido de la columna de alúmina, se evapora a sequedad, se adicionan 2 ml. de Benceno y la solución se concentra a 100 microlitros y se transfiere cuantitativamente a un tubo graduado de 200 microlitros, usando una corriente de nitrógeno seco, se concentra a 60 microlitros y se sella y se almacena a temperaturas por debajo de los  $0^\circ\text{C}$  hasta que sea analizado por Espectrometría de Masas.

- Extracción utilizando el procedimiento neutral:

Una muestra de 15 grs. se mezcla con 150 grs: decarbonato de sodio ( polvo anhidro ) por 1 minuto y después se agrega hielo seco y se mezcla hasta que la muestra esté totalmente machacada " Pulverizada". Este "polvo" , se transfiere a un matraz y

se adicionan 10 ng, de  $^{37}\text{Cl}$ -TCDD directamente sobre el "polvo", el matraz se lava con acetonitrilo varias veces hasta completar un volumen de 150 ml. después se agita vigorosamente por dos Hrs. La muestra se filtra a través de 30 grs. de sulfato de sodio anhidro,

- Procedimiento de Limpieza para los extractos obtenidos por Método Neutral;
- Una alícuota de 100 ml. del extracto de Acetonitrilo que se obtuvo en la sección anterior, se extrae con 50 ml. de acetonitrilo saturado con n-Hexano, El n-Hexano se extrae con 2 porciones de 100 ml. cada una, seguida por una de 50 ml. de n-Hexano saturado con Acetonitrilo, Todas las fracciones de Acetonitrilo se combinan y se vuelven a extraer con 10 ml. de Acetonitrilo saturado con n-Hexano. El acetonitrilo se concentra a un volumen de 10 ml. sobre una parrilla con agitación. El residuo se divide en dos porciones de 5 ml. y se diluyen a 100 ml. con n-Hexano y cada porción se concentra a un volumen de 5 a 10 ml. el residuo de n-Hexano se pasa a través de una columna Florisil usando tres porciones de 5 ml. de n-Hexano cada vez. La columna se lava con 100 ml. de Cloruro de Metileno al 10% en n-Hexano (V/V) y el lavado se desecha, La columna se eluye con 100 ml. de Cloruro de Metileno en n-Hexano al 25% (V/V) - El eluyente se conecta a un evaporador y se concentra a un volumen de 3 ml. usando un baño de vapor. El residuo se disuelve en 100 ml. de n-Hexano y se concentra a un volumen de 3 ml

El residuo de n-Hexano se transfiere a una columna de alúmina y el procedimiento de limpieza es similar al procedimiento -- Acido-Base. El extracto, se analiza por Cromatografía de Gases y Expectrometría de Masas.

### 3.2.- Equipo:

- Cromatógrafo de gases, equipo con columna capilar de vidrio de 30 mts. de largo X 0.25 mm. de diámetro interior-empacado con SE-30 WCOT.
- Espectrómetro de masas con sistema de vacío y dispositivo de control manual para la selección múltiple de iones (MIS) de 8 canales.

### 3.3.- Condiciones del Equipo:

#### I.- Condiciones del Cromatógrafo de Gases:

- Temperatura de inyección de la muestra 260°C.
- Temperatura delHorno 265°C
- Flujo del hielo 5 ml. por minuto.
- Temperatura de línea de transferencia GC-225°C.

#### II.- Condiciones del Espectrómetro de Masas:

- Temperatura de la fuente de ionización 240°C
- Voltaje de aceleración específica 3 KV Máx.
- Filamento de emisión, caída de corriente 1 miliamper.

### 3.4.- Compuestos de referencia;

- Son los mismos que se emplearon en el Método I.

## 3.5.- Cromatograma Obtenido:

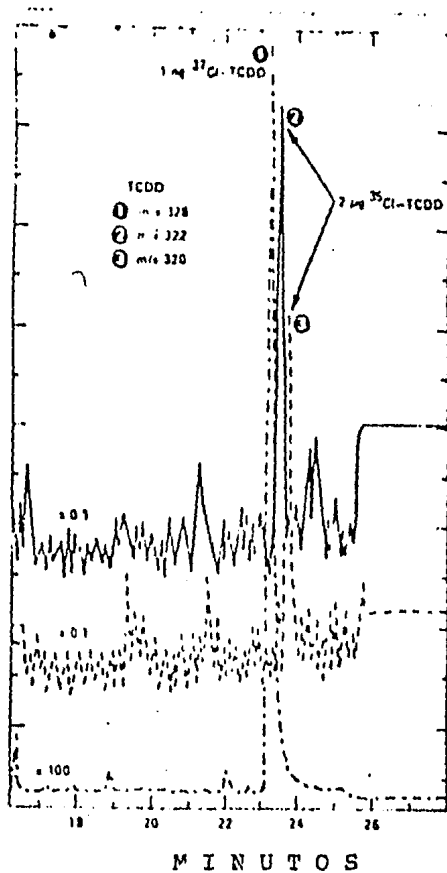


Figura No. 12

Cromatograma obtenido de la selección múltiple de iones en la GC/HRMS con columna capilar representando un nanogramo de  $^{37}\text{Cl}$ -TCDD y 2 picogramos del estándar de TCDD.



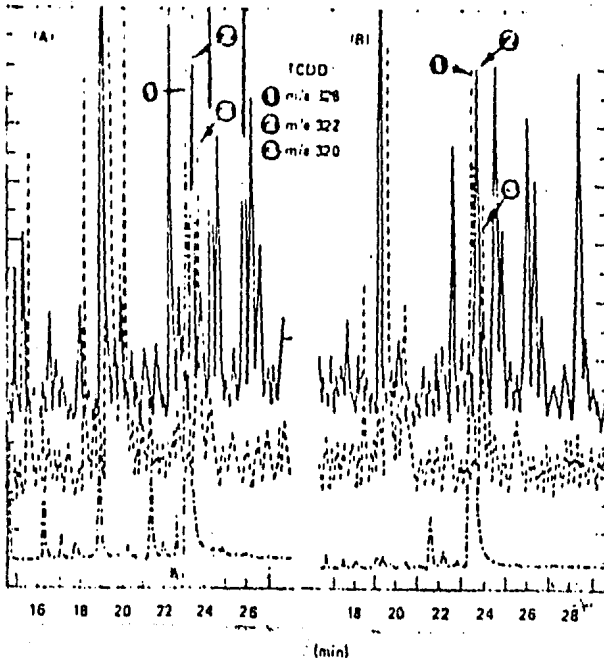


Figura No. 13

Cromatograma obtenido de un extracto de leche humana: (A) 2 micro litros de muestra; (B) 1 microlitro de muestra fortificada con --  $^{37}\text{Cl}$ -TCDD estandar ( niveles de fortificación, 1 ppt. resultados- experimentales son 1.2 ppt. de TCDD )

## 3.6.- Combinación de Cromatogramas y Fragmentogramas de Masas:

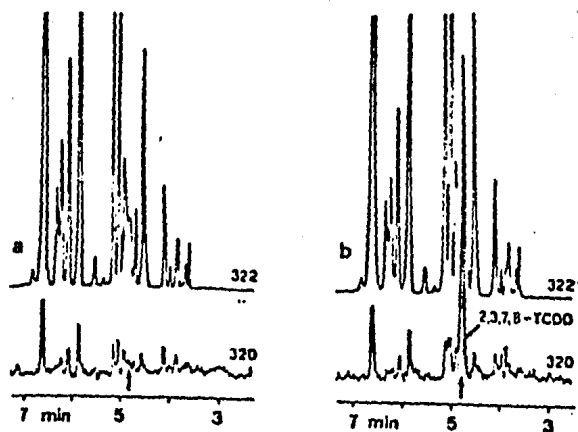


Figura No. 14.

Cromatogramas y Fragmentogramas parciales de masas en m/e 320 y 322 de (a) aroclor 1254 ( 8 microgramos ) y (b) aroclor 1254 -- ( 8 microgramos con 2,3,7,8-TCDD (200 pg) adicionados ).

**CAPITULO IV**

**CONCLUSIONES**

## a).- La Dioxina como subproducto de reacción:

- La contaminación de Dioxina como subproducto de reacción que aparece durante la síntesis de fenoles altamente clorados, - clorofenatos y los productos finales de estos productos clorofenólicos, es variable, dependiendo de la técnica empleada y, de las condiciones de reacción que intervengan en dicha - síntesis y además del método de purificación de los productos de reacción; lo que ha impedido hacer un balance global de la concentración de Dioxina que se arroja al ambiente . Algunos estudios han concluido que la presencia de Dioxina en el ambiente proveniente del Triclorofenol y sus derivados es insignificante; y si la concentración de Dioxina en - productos comerciales se mantiene por abajo de 0.1 ppm, el - uso de estos productos puede no crear riesgos ambientales.

## b).- Significado Ambiental:

## Niveles de Aire, Suelos, Agua y Vegetales:

- La transmisión de Dioxina al aire es causada principalmente por la combustión incompleta de productos organoclorados y - por la aplicación de pesticidas fenólicos clorados.
- Al adicionar Dioxina con un átomo de  $^{14}\text{C}$  al suelo es absorbida por los vegetales, los cuales tienden a acumular en pequeñas cantidades ( máximo 0.15% del presente en el suelo ) en las hojas o en las partes aéreas, pero no se encontró Dioxina en estos mismo vegetales cuando ya estuvieron maduros y - cosechados. Esto quiere decir que la Dioxina aunque esté acumulada en el tejido vegetal aéreo, sufre reacciones de foto-descomposición.

- La fotodescomposición es insignificante en suelos secos, pero es importante en suelos húmedos y mantos acuíferos, debido a la insolubilidad de la Dioxina en el agua. Puesto que la TCDD es insoluble en agua, si estuviera presente en ríos de poca profundidad o en caminos que tengan agua, se encontraría principalmente en el lodo o en partículas suspendidas

El tiempo de estabilidad de la Dioxina se ve modificada por las condiciones climatológicas.

Bajo condiciones de laboratorio se ha encontrado que la --- Dioxina adicionada al suelo desaparece aproximadamente con una rapidez del 50% año, pero esta condición se ve modificada por el tipo de suelo en que se aplique.

#### c).- Toxicidad:

La Dioxina al igual que la mayoría de los compuestos organoclorados, tiende a acumularse en el tejido adiposo de los primates, y el órgano más afectado, estadísticamente se ha encontrado que es el hígado.

En los humanos la exposición a la Dioxina, ha resultado en la mayoría de los casos, una enfermedad llamada Cloracné Ocupacional o Cloracné, otras de las manifestaciones por exposición a TCDD han sido teratogenicidad, mutagenicidad, carcinogenicidad.

#### d).- Aspectos Analíticos.

Los Métodos de Análisis de la Dioxina, son costosos, tardados y dificultosos, sin embargo, son altamente específicos y efi-

cientes por la manera de preparación de la muestra y por el resultado cuantitativo y cualitativo que se obtiene.

De esta manera se pueden llegar a detectar concentraciones -- de ppt. Uno de los Métodos más empleado y ya estandarizado -- por la E.P.A., es el de Cromatografía de Gases en combinación con la espectrometría de masas.

**CAPITULO V**

**RECOMENDACIONES GENERALES EN RELACION  
CON LA PRESENCIA DE DIOXINA.**

5.- RECOMENDACIONES GENERALES EN RELACION  
CON LA PRESENCIA DE DIOXINA.

- 1.- Prohibir o restringir el uso de herbicidas fenólicos clorados - especialmente los que tengan como materia prima 2,4,5-Tricloro-fenol.
- 2.- Monitorear el ambiente para determinar niveles de Dioxina y determinar su destino relativo a ocurrir y posible medio de degradación molecular auxiliándose para estos fines de una técnica - segura y sensible en extremo.
- 3.- Que se evalúe los efectos bioquímicos de los plaguicidas fenólicos clorados en células y tejidos tanto vegetales como animales. Así mismo evaluar la persistencia de TCDD en los tejidos - anteriores.
- 4.- Buscar sustitutos de los plaguicidas que tiendan a ser más degradables desde el punto de vista químico y biológico.
- 5.- No habitar en áreas en donde se hayan detectado niveles de Dioxina, por insignificantes que sean dichos niveles.
- 6.- Continuar la evaluación teratogénica, mutagénica y efectos carcinogénicos de los plaguicidas fenoxi solitarios y en combinación con TCDD y otras impurezas para disminuir controversias -



en estos aspectos, y de esta manera ir dando un aspecto más - real de lo que en realidad es la Dioxina relacionada con los- efectos antes mencionados y que tan culpable sea ella de los mismos.

- 7.- El personal que trabaja con pesticidas fenólicos clorados debe rá observar las precauciones que se tienen para materiales -- radiactivos. Asimismo el personal que maneje estos productos- debe ser personal entrenado y consiente de los riesgos a que- se enfrenta.

**CAPITULO VI**

**BIBLIOGRAFIA**

## BIBLIOGRAFIA:

- 1) Adams, E.M. Irish, D.D., Spencer, H.C. and Rowe, V.K. ( 1941 ).  
The Response of Rabbit Skin to Compounds Reported to Have  
Caused Acneform Dermatits. Ind. Med., 2, 1-4
- 2) Allen, J.R., ( Manuscript - To Be Published ). Morbidity and  
Mortality in Primates Resulting from Picogram Doses of 2,3,7,  
8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin.
- 3) Allen, J.R., and Lalich, J.J. ( 1962 ). Response of Chickens-  
to Prolonged Feeding of Crude "Toxic Fat". Proc. Soc. Exp. --  
Biol. Med., 109, 48-51.
- 4) Allen, J.R., Van Miller, J.P. and Norback, D.H. ( 1975 ), --  
Tissue Distribution, Excretion and Biological Effects of - --  
(<sup>14</sup>C) tetrachlorodibenzo-p-dioxin in Rats. Food Cosmet. Toxi  
col, 13, 501-5.
- 5) Bauer, H. Schulz, K.H., and Spiegelberg, U (1961). Berufliche  
Vergiftungen bei der Herstellung von Chlorphenol-Verbindungen.  
Arch.Gewerbepathol. Gewerbehyg., 18, 538-55
- 6) Baughman, R., and Meselson, M. ( 1973 ). And Analytical Method  
for Detecting TCDD ( Dioxin ): Levels of TCDD in Samples from-  
Vietnam. Environ. Health Perspect, Exp. Issue #5, 27-35
- 7) Beale, M.G., Shearer, W.T., Karl, M.M., and Robson, A.M. (1977)  
Long-term Effects of Dioxin Exposure. Lancet, I, 748
- 8) Bleiberg, J., Wallen, M., Brodtkin, R. and Applebaum, I.L.(1964)  
Industrially Acquired Porphyria. Arch. Dermatol., 89, 793-7
- 9) Breau, W. ( 1970 ). Die Chlorakne. Ther Umsch., 27, 541-6:
- 10) Buser, H.-R. (1975). Analysis of Polychlorinated Dibenzo-p- --  
Dioxins and Dibenzofurans in Chlorinated Phenols by Mass Frag-  
mentography.  
J. Chromatogr., 107, 295-310
- 11) Buser, H.-R. Bosshardt, H.-P. ( 1974 ). Determination of - - -  
2,3,7,8-tetrachlorodibenzo- 1,4-dioxin at Parts Per Billion Levels

- 12) in Technical-Grade 2,4,5-Trichlorophenoxyacetic acid, in -  
2,4,5-T Alkyl Ester and 2,4,5-T Amine Salt Herbicide Formu-  
lations By Quadrupole Mass Fragmentography, J. Chromatogr.-  
90, 71-7.
- 13) Buu-Hoi N.P., Hien, D.P., Saint-Ruf, G. and Servoin-Sidoine  
J. ( 1971 ). Tetrachlorodibenzodioxin-Intimations of Carci-  
nogenicity ?  
C.R. Hebd. Seanc. Acad. Sci., Paris, 272, 1447
- 14) Buu-Hoi, N.P., Chanh, P.-H., Sesque, G., Azum-Gelade, M.C.  
and Saint-Ruf, G. ( 1972 ). Organs as Targets of "Dioxin"-  
( 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin ) Intoxication. Nat-  
urwissenschaften, 59, 174-5.
- 15) Carter, C.D., Kimbrough, R.D., Liddle, J.A., Cline, R.E.,  
Zack, M.M., Jr., Bartherl, W.F., Koehler R.E. and Phillips,  
P.E. ( 1975 ).  
Tetrachlorodibenzodioxin : An Accidental Poisoning Episod-  
in Horse Arenas. Science, 188, 738-40.
- 16) Courtney, K.D., and Moore, J.A. ( 1971 ), Teratology Stu-  
dies with 2,4,5-Trichlorophenoxyacetic Acid and 2,3,7,8-Te-  
trachlorodibenzo-p-dioxin. Toxicol. Appl. Pharmacol., 20,-  
396-403.
- 17) Crosby D.B., and Wong, A.S. ( 1977 ). Environmental Degrada-  
tion of 2,3,7,8- Tetrachlorodibenzo-p-dioxin ( TCDD ). ---  
Science, 195, 1337-8.
- 18) Crosby, D.G., Wong, A.S., Plimmer, J.R., and Woolson, E.A.,  
(1971).  
Photodecomposition of Chlorinate Dibenzo-p-dioxins.  
Science, 173, 748-9.
- 19) Crosby, D.G., Moilanen, K.W., and Wong, A.S., ( 1973 ). En-  
vironmental Generation and Degradation of Dibenzodioxins -  
and Dibenzofurans.  
Environ. Health Perspect., Exp. Issue #5, 259-66.
- 20) Crow, K.D., ( 1970 ). Chloracne. A Critical Review Inclu-  
ding a Comparison of Two Series of Cases of Acne from Chlor-  
naphthalene and Pitch Fumes. Trans. St. Johns Hosp. Dermo-  
tol. Soc., 56, 79-99.

- 21) Crummett, W.B., and Stehl, R.H. ( 1973 ). Determination of - Chlorinated Dibenzo-p-dioxins and Dibenzofurans in Various - Materials. Environ. Health Perspect., Exp. Issue #5, 15-25.
- 22) Cutting, R.T., Phuoc, T.H., Ballo, J.M., Benenson M.W., and Evans, C.H. ( 1970 ). Congenital Malformations Hydatidiform Moles and Stillbirths in the Republic of Vietnam 1960-1969, December, 1970.
- 23) Dugois, P., and Colomb, L. ( 1956 ) Acné Chlorique au 2-4-5 Trichlorophenol. Lyon Med., 88, 446-7.
- 24) Duverne, J., Thivolet, J. and Bernard, J. ( 1964 ). Acné -- Chlorique Profuse Avec Epanchement Pleural Recidivant Chez-un Sujet a Reactions Tuberculiniques Negatives. Bull. Soc.-Fram. Dermatol. Syphil., 71, 649-52.
- 25) Edmunds, J.W., Lee, D.F., and Nickels, C.M.L. (1973 ). De-- termination of 2,3,7,8- Tetrachlorodibenzo-1,4-dioxin in -- 2,3,5- Trichlorophenoxyacetic Acid and 2,4,5-T Alkyl Ester- Herbicides . Pestic. Sci., 4, 101-5.
- 26) Elvidge D.A. ( 1971 ). The Gas-chromatographic Determination of 2,3,7,8- Tetrachlorodibenzo-p-dioxin in 2,4,5- Trichloro phenoxyacetic Acid ( " 2,4,5-T " ), 2,4,5-T Ethylhexyl Ester. Formulations of 2,4,5-T Esters and 2,4,5-Trichlorophenol. -- Analyst, 96, 721-7
- 27) Fara, G.M. ( 1977 ). Introductory Report on the Epidemiological Aspects. In: Proceedings of the Expert Meeting on the Problems Raised by TCDD Pollution, Milan, 30 September and 1 October, 1976, pp. 39-46.
- 28) Firestone, D., Ress, J. Brown, N.L., Barrón, R.P., and Damico, J.N., ( 1972 ). Determination of Polychlorodibenzo-p- dioxins and Related Compounds in Commercial Chlorophenols.- J. Assoc. Offic. Anal. Chem., 55,85-92
- 29) Firestone, D., ( 1973 ). Etiology of Chick Edema Disease. - Environ. Health Perspect., Exp. Issue #5, 59-66.
- 30) Flick, D.F., Firestone, D., and Higginbotham, G.R. (1972).- Studies of the Chick Edema Disease. 9. Response of Chicks - Fed or Singly Administered Synthetic Edema-producing Compounds. Poultry Sci., 51, 2026-34.

- 31) Flick, D.F., Firestone, D., Ress, J. and Allen, J.R. (1973) Studies of the Chick Edema Disease. 10. Toxicity of Chick - Edema Factors in the Chick, Chick Embryo, and Monkey. Poultry Sci., 52, 1637-41.
- 32) Food Additive Regulations, April 22, 1960. ( Code of Federal Regulations, (CFR), Title 21, Section 121.86 ); see also -- CFR, Title 21, Section 121.1070.
- 33) Fowler, B.A., Lucier, G.W., Brown, H.W., and McDaniel, O.S. (1973 ).  
Ultrastructural Changes in Rat Liver Cells Following a Single Oral Dose of TCDD. Environ. Health Perspect., Exp., --- Issue No. 5, 141-8.
- 34) Fries, G.F., and Marrow, G.S. ( 1975 ). Retention and Excretion of 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin by Rats. J. Agr. Food Chem., 23, 265-9.
- 35) Giovanardi, A. ( 1977 ). Introductory Report on the Decontamination Problems. In: Proceedings of the Expert Meeting on the Problems Raised by TCDD pollution, Milán, 30 de September and 1 October, 1976 pp. 49-50.
- 36) Goldmann, P.J. ( 1972 ). Schuerste Akute Chlorakne Durch Trichlorphenol-Zersetzungsprodukte. Arbeitsmed. Sozialmed. Arbeitshyg., 7, 12-18.
- 37) Goldstein, J.A., Hickman, P., Bergman, H., and Vos., J.G. -- (1973 ).  
Hepatic Porphyria Induced by 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin.  
Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol., 6, 919-28
- 38) Greig., J.B. ( 1977 ). Personal Communication date 14 February, 1977.
- 39) Greig, J.B. ( 1972 ), Effect of 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-1,4-Dioxin on Drug Metabolism in the Rat. Biochem. Pharmacol., 21, 3196-8.
- 40) Greig, J.B., and De Matteis, F ( 1973 ). Effects of 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin on Drug Metabolism and Hepatic - Microsomes of Rats and Mice. Environ. Health Perspect., Exp. Issue # 5, 211-19.

- 41) Greig, J.B., Jones G., Butler, W.H. and Barnes, J.M. ( 1973 )  
Toxic Effects. of 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin. Food  
Cosmet. Toxicol., 11, 585-95
- 42) Gupta, B.N., Vos, J.G., Moore, J.A., Zinkl, J.G., and Bullock  
B.C., ( 1973 )  
Pathologic Effects. of 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin in  
Laboratory Animals. Environ. Health Perspect., Exp. Issue #5,  
125- 40.
- 43) Harris, M.W., Morre, J.A., Vos, J.G., and Gupta, B.N., ( 1973 )  
General Biological Effects of TCDD in Laboratory Animals.  
Environ. Health Perspect., Exp. Issue #5, 101-9.
- 44) Herxheimer, K. ( 1899 ). Uber Chloracne. Nunch. Med. Wochenschr.,  
46, 278.
- 45) Higginbotham, G.R., Huan, A., Firestone, D., Varrett, J., Ress  
J. and Campbell, A.D. ( 1968 ). Chemical and Toxicological Eva  
luations of Isolated and Synthetic Chloro Derivatives of Diben  
zo-p-dioxin. Nature, 220,702-3.
- 46) Hofmann, H. Th. ( 1957 ). Neuere Erfahrungen mit Hochtoxischen  
Chlorkohlenwasserstoffen. Arch. Exp. Pathol. Pharmacol., 232,  
228-30.
- 47) Hollaway, T. ( 1977 ), Personal Communication dated 15 March-  
1977.
- 48) Hussain, S., Ehrenberg, L., Lofroth, G., and Gejvall, T. (1972)  
Mutagenic Effects of TCDD on Bacterias Systems. Ambio. 1,32-3
- 49) Jackson, W.T., ( 1972 ). Regulation of Mitosis. III. Cytologi  
cal Effects of 2,4,5-Trichlorophenoxyacetic Acid and of Dioxin  
Contaminants in 2,4,5-T Formulations. J. Cell Sci., 10, 15-25.
- 50) Jensen, N.E., and Walker, A.E. ( 1972 ). Chloracne: Three Ca  
ses.  
Proc. Roy. Soc. Med., 65, 687-8.
- 51) Jensen, S. and Renberg, L. ( 1973 ). Various Chlorinated Di  
mers Present in Several Technical Chlorophenols. Used As Fun  
gicides.  
Environ. Health Perspect., Exp. Issue #5, 37-9.

- 52) Jirasek, L., Kalensky, J., Kubec, K., Pazderova, J., and Lukas E., ( 1976 ) .  
Acne Chlorina, Porphyria Cutanea Tarda a Jine Projevy Celkove Intoxikace Pri Vyrobe Herbicid. Cesk. Dermatol., 49, 145-57.
- 53) Jirasek, L., Kalensky, K. Kubec, K., Pazderova J. and Lukas - E. ( 1976 )  
Chlorakné, Porphyria Tarda and Andere Intoxikationen. Durch Herbizide. Hautarzt, 27, 328-33.
- 54) Jones, E.L., and Krizek, H. ( 1962 ). A Technic for Testing - Acnegenic .  
Potency in Rabbits, Aplied to the Potent Acnegen, 2,3,7,8- Te trachlorodibenzo-p-dioxin. J. Invest. Dermatol., 39, 511-17.
- 55) Jones, G. ( 1975 )., A Histochemical Study of the Liver Lesion Induced by 2,3,7,8-Tetraclorodibenzo-p-dioxin ( Dioxin ) in - Rats. J. Pathol., 116, 101-5.
- 56) Jones, G., and Butler, W.H., ( 1974 ), A Morphological Study- of the Liver Lesion Induced by 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin in Rats. J. Pathol, 112, 93-7.
- 57) Kearney, P.C., Woolson, E.A., and Ellington, C.P., Jr. (1972) Persistence and Metabolism of chlorodioxins in Soils. Environ. Sci. Technol., 6, 1017-19.
- 58) Kearney, P.C., Woolson, E.A., Isensee, A.R., and Helling.,C.S. ( 1973 ).Tetrachlorodibenzodioxin in the Environment: Sources, Fate, and Decontamination. Environ. Health Perspect., Exp., - Issue #5, 273-7.
- 59) Khara, K.S., and Ruddick, J.A. ( 1973 ). Polychlorodibenzo-p-dioxins ( sic ); Perinatal Effects and the dominant Lethal - Test in Wistar Rats.  
Adv. Chem. Ser., 120, 70-84.
- 60) Kimbrough, R.D. ( 1974 ). The Toxicity of Polychlorinated Po lycyclic.  
Compounds and Related Chemicals. CRC Crit. Rev. Toxicol., 2, 445-98



- 61) Kimbrough, R.D., Carter, C.D., Liddle, J.A., Cline, R.E. - and Phillips, P.E. ( 1977 ). Epidemiology and Pathology of a Tetrachlorodibenzodioxin Poisoning Episode. Arch. Environ. Health, 32, 77-86.
- 62) Kimming, J. and Schulz, K.H. ( 1957 ). Berufliche Akne --- ( sog. Chlorakne ) Durch Chlorierte Aromatische Zyklische Ather. Dermatologica, 115, 540-6.
- 63) Kleu, G. and Goltz, R. ( 1971 ). Spat und Dauerschaden Nach Chronisch-gewerblicher Einwirkung von Chlorophenolverbindun gen. Med. Klin., 66, 53-8.
- 64) Kociba, R.J., Keeler, P.A., Park, C.N., and Gebring, P.J. - ( 1976 ). 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin, (TCDD) ; Results of a 13-Week Oral Toxicity Study in Rats. Toxicol. -- Appl. Pharmacol., 35, 553.74
- 65) Kouri, R.E., and Ratrie, H., III ( 1974 ). Aryl Hydrocarbon Hydroxylase Induction in Human Lymphocyte Cultures by - - - 2,3,7,8- Tetrachlorodibenzo-p-dioxin. Life Scie., 15:1585-95.
- 66) Langer, H.G., Brady, T.P., and Briggs, P.R. ( 1973 ). Formation of Dibenzodioxins and Other Condensation Products from Chlorinated Phenols and Derivatives. Environ. Health Perspect., Exp. Issue #5, 3-7.
- 67) Lynn, G.E. ( 1972 ). Personal Communication date 30 de November, 1972.
- 68) Lucier, G.W., McDaniel, O.S., Hook, G.E.R., Fowler, B. Sonawane, B.R., and Faeder, E. ( 1973 ). TCDD-induced Changes in Rat Liver Microsomal Enzymes. Environ. Health Perspect., Exp. Issue #5, 199-209.
- 69) Matsumura, F., and Benezet, H.J., ( 1973 ). Studies on the Bioaccumulation and Microbial Degradation of 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin. Environ. Health Perspect., Exp. Issue #5, 253-8.
- 70) May, G. ( 1973 ) Chloracne from the Accidental Production - of Tetrachlorodibenzodioxin. Brit J. Ind. Med. 30, 276-83.
- 71) Meselson, M.S. ( 1972 ). Preliminary Report of Herbicide -- Assessment Commission of the American Association for the Advancement of Science. Congressional Red., 118, 6806-13.

- 72) McCune, E.L., Savage, J.E. and O'Dell, B.L. ( 1962 ). Hydropericardium and Ascites in Chicks Fed a Chlorinated Hydrocarbon. Poultry Sci., 41, 295.
- 73) Miller, R.A., Norris, L.A., and Hawkes, C.L. ( 1973 ). Toxicity of, 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin ( TCDD ) in --- Aquatic Organisms. Environ. Health Perspect., Exp. Issue #5, 177-86.
- 74) Milnes, M.H. ( 1971 ). Formation of 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzodioxin by Thermal Decomposition of Sodium 2,4,5,-Trichlorophenate. Nature, 232, 395-6.
- 75) Moore, J.A., Gupta, B.N., Zinkl, J.G., and Vos J.G. ( 1973 ) Postnatal Effects of Maternal Exposure to 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxins ( TCDD ). Environ. Health Perspect., Exp. Issue # 5, 81-5.
- 76) Neubert, D. Zens, P., Rothernwallner, A., and Morker, H.J. - ( 1973 ). A Survey of the Embryotoxic Effects of TCDD in Mammalian Species. Environ. Health Perspect., Exp. Issue #5, - 67-69.
- 77) Nilsson, C.-A., Andersson, K., Rappe, C. and Westermark, S.-O. (1974). Chromatographic Evidence for the Formation of Chlorodioxina from Chloro-2-phenoxyphenols. J. Chromatogr., 96, 137-47.
- 78) Norback, D.H., and Allen, J.R., ( 1973 ). Biological Responses of the Nonhuman Primate, Chicken, and Rat to Chlorinated Dibenzo-p-dioxina Ingestion. Environ. Health Perspect., Exp.- Issue # 5, 233-40.
- 79) Norris, L.A., and Miller, R.A., ( 1974 ). The Toxicity of -- 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin ( TCDD ) in Guppies (Percilia reticulatus Peters ). Bull. Environ. Contam. Toxicol., 12, 76-80.
- 80) Oliver, R.M. ( 1975 ). Toxic Effects of 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo 1,4 Dioxin in Laboratory Workers. Brit. J. Ind. Med. 32, 49-53.
- 81) Piper, W.N., Rose, J.Q., and Gehring, P.J. ( 1973 ). Excretion and Tissue Distribution of 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo--p-dioxin in the Rat. Adv. Chem. Ser., 120, 85-91

- 82) Pohland, A.E., Yang, G.C., and Brown, N. ( 1973 ). Analytical and Confirmative Techniques for Dibenzo-p-dioxins Based Upon-Their Cation Radicals. Environ Health Perspect., Exp. Issue - #5, 9-14.
- 83) Poland, A. and Glover, E. ( 1973 a). Studies on the Mechanims of Toxicity of the chlorinated Dibenzo-p-dioxins. Environ. -- Health Perspect., Exp. Issue #5, 245-51.
- 84) Poland, A. and Glover, E. ( 1973 b). 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin: A potent Inducer of Aminolevulinic Acid Synthetase. Science, 179, 476-7
- 85) Poland, A. and Glover, E, (1973 c). Chlorinated Dibenzo-p---Dioxins: Potent Inducers of  $\delta$  - aminolevulinic Acid Synthetase and Aryl Hydrocarbon Hydroxylase. II. A Study of the Structure-Activity Relationship. Mol. Pharmacol., 9, 736-47.
- 86) Poland, A., and Glover, E, ( 1974 ). The Induction of Aryl Hydrocarbon Hydroxylase by 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin: Evidence for a Receptor Mutation in Genetically Nonresponsive Mice. Pharmacologist, 16, 240 ( Abstract. #282 )
- 87) Poland, A.P., Smith, D., Metter, G. and Possick, P. ( 1971 ). A Health Survey of Workers in a 2,4-D and 2,4,5-T Plant. --- Arch. Environ. Health, 22, 316-27
- 88) Rawis, R.L. and O'Sullivan, D.A., ( 1976 ). Italy Seeks Answers Following Toxic Release. Chem. Eng. News, 54, 27-8 , - 33, 35.
- 89) Rowe, V.K., Morris, J.M., Sparschu, G.L., Schwrtz , B.A., -- and Gehring, P.J. Presented at the 162nd ACS National Meeting Washington, D.C., September, 1971. Abstract #86.
- 90) Sanger, V.L., Scott, L., Hamdy, A., Gale, C. and Funden, W.D. ( 1958 ) . Alimentary Toxemia in Chickens. J. Amer. Vet. Med. Assoc., - 133, 172-6.
- 91) Schulz, K.H., ( 1957 ). Kliniscne und Experimentelle Untersuchungen. Zur Atiologie der Chloracne. Arch. Klin. Exp. Dermatol., 206,

589-96.

- 92) Schwetz, B.A., Norris, J.M., Sparschu, G.L., Rowe, V.K., Gehring, P.J., Emerson, J.L., and Gerbig, C.G., ( 1973 ). Toxicology of Chlorinated Dibenzo-p-Dioxins. Environ Health Perspect., Exp. Issue #5, 87-99.
- 93) Shapley, D. ( 1973 ). Herbicides: AAAS Study Finds Dioxin in Vietnamese Fish. Science, 180, 285-6.
- 94) Simpson, C.F., Pritchard, W.R., and Harms, R.H., ( 1959 ). An Endotheliosis in Chickens and Turkeys Caused by an Unidentified Dietary Factor. J. Amer. Vet. Med. Assoc., 134, 410-16.
- 95) Sinclair, P.R., and Granick, S. ( 1974 ). Uroporphyrin formation Induced by Chlorinated Hydrocarbons ( Lindane, Polychlorinated Biphenyls, Tetrachlorodibenzo-p-Dioxin ). Requirements for Endogenous Tron, Protein Synthesis and Drug-Metabolizing-Activity. Biochem. Biophys. Res. Commun., 61, 124-33

96. Sparschu, G.L., Dunn, F.L., and Rowe, V.K., ( 1971 ). Study of the Teratogenicity of 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin in the Rat. Food Cosmet. Toxicol., 9, 405-12.
97. Stehl, R.H., Papenfuss, R.R., Bredeweg, R.A., and Roberts, R.W., ( 1973 ). The Stability of Pentrachlorophenol and Chlorinated Dioxins to Sunlight, Heat, and Combustion. Adv. Chem. Ser., 120, -- 119-25
98. Tomita, M., Ueda, S., and Narisada, M. ( 1959 ). Dibenzo-p-dioxin. Derivatives. XXVII. Synthesis of Polyhalodibenzo-p-dioxin. Yakugaku Zasshi, 79, 186-92.
99. Tung, T.T. ( 1973 ). Le cancer primaire du Foie au Viet-nam. Chirurgie, 99, 427-36.
- 100) Van Miller, J.P., and Allen, J.R., ( 1977 ). Chronic Toxicity of 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin in Rats. Fed. Proc., 36, Abstract No. 673.
- 101) Van Miller, J.P., and Marljar, R.J., and Allen, J.R. (1976) Tissue Distribution and Excretion of Tritiated Tetrachlorodibenzo-p-dioxin in Non-human primates and rats. Food Cosmet. Toxicol., 14, 31-4.
- 102) Vinopal, J.H., and Casida, J.E., ( 1973 ). Metabolic Stability of 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin in Mammalian Liver Microsomal Systems and in Living Mice. Arch. Environ. Contam. Toxicol., 1.
- 103) Vos., J.G., and Moore, J.A., ( 1974 ) Suppression of Cellular Immunity in Rats and Mice by Maternal Treatment with 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin. Int. Arch. Allergy, 47, 777-94
- 104) Vos., J.G., Moore, J.A., and Zinkl, J.G., ( 1973 ). Effects of 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin on the Immune System of Laboratory Animals. Environ. Health Perspect., Exp. Issue No. 5 149-62.
- 105) Weissberg, J.B., and Sinkl, J.G., ( 1973 ). Effects of ---- 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin Upon Hemostasis and Hematologic Function in the Rat. Environ. Health Perspect., Exp. Issue No. 5, 119-23.
- 106) Wilson, J.G. ( 1971 ). Report of the Advisory Committee on -- 2,4,5-T to the Administrator of the Environmental Protection Agency, Submitted, May 7, 1971. 76 pp.
- 107) Woolson, E.A., Thomas, R.P. and Ensor, P.D.J. ( 1972 ). Survey of Polychlorodibenzo-p-dioxin Content, in Selected Pesticides. J. Agr. Food Chem., 20, 351-4.

- 108) Young, A.L., Thalken, C.E., and Ward, W.E. ( 1975 ). Studies of the Ecological Impact of Repetitive Aerial Applications - of Herbicides on the Ecosystem of Test Area C-52A, Eglin AFB, Florida. Air Force Armament Laboratory, Eglin Air Force Base, Florida, Final Report., October 1975, 127 pp.